

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Frères Mentouri Constantine 1

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des
Technologies Agroalimentaires
INATAA



N° ordre: 69/DS/2022
N° Serie: 07//INA/2022

Thèse

en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD en Sciences Alimentaires

Spécialité : Technologies Agro-Alimentaires

Valorisation des protéines du lactosérum: Impact de l'hydrolyse enzymatique et du traitement par Détente Instantanée Contrôlée (DIC) sur leur propriétés fonctionnelles

Présentée par: **KHEROUFI Afaf**

Soutenue le 12/07/ 2022

Devant le jury :

Président :	Zidoune M.N.	Professeur	INATAA Université Frères Mentouri Constantine 1
Rapporteur :	Boughellout H.	Professeur	INATAA Université Frères Mentouri Constantine 1
Co- Rapporteur :	Pintado M. E.	Professeur	CBQF – Centro de Biotecnologia e Química Fina Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto
Examineurs:	Allaf K.	Professeur	Laboratoire des sciences de l'ingénieur La SIE UMR 7356 CNRS, Université La Rochelle
	Benatallah L.	Professeur	INATAA Université Frères Mentouri Constantine 1
	Arris S.	Professeur	Département Génie de l'Environnement Faculté Génie des Procédés Université Salah Bounider Consatntine 3

Remerciements

Je tiens à remercier de tout cœur ma directrice de thèse, le Professeur **Boughellout H.** qui m'a offert cette unique occasion d'explorer la passion et les talents cachés que j'avais pour la recherche. Sa confiance, son calme et ses mots d'encouragements ne seront jamais oubliés. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu tout au long de la préparation de cette thèse.

Je tiens également à remercier le professeur **Pintado M.E.** de l'Université Catholica Portuguesa/Porto, Centre de Biotechnologie et Chimie Fine, de m'avoir accueillie dans son incroyable équipe. Sa disponibilité, ses bonnes capacités d'écoute, ses encouragements et son approche humoristique m'ont grandement aidé lors de cette expérience. Je dirais d'elle, un patron exceptionnel, car elle m'a appris à travailler de façon structurée et surtout comment gérer méthodiquement les imprévus de la recherche. Merci d'avoir fait de moi une scientifique aguerrie.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur **Allaf K.** de l'Université de la Rochelle, pour la réalisation des traitements par la technique DIC et pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Mes remerciements vont aux membres du jury qui ont bien voulu juger ce travail, Monsieur le professeur **Zidoune M.N.**, qui me fait l'honneur de présider ce jury, Madame le professeur **Benatallah L.** et Madame le professeur **Arris** qui ont bien voulu accepter d'évaluer et de juger ce travail.

Je remercie également les chercheurs portugais **Brassesco M.E., Campos D.A., Coscueta E. R.**, membres du laboratoire de Biotechnologie et Chimie Fine pour leur bonne humeur, leur patience, leur disponibilité, leur simplicité et surtout pour leur aide lors de la mise au point des protocoles et la réalisation des expériences au laboratoire, et lors des analyses des résultats.

Je tiens également à remercier l'équipe du laboratoire de Protéomique au Centre de Recherche de Biotechnologies de Constantine 1 pour leurs aides techniques au laboratoire.

Mes remerciements vont à tous mes amis et collègues qui n'ont cessé de me supporter tout au long de ces années à Nora, Amina, Rima, Meryem, Fairouz, Abdelghani, Taha et à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à l'avancement de ma thèse.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes chers parents de m'avoir donné l'opportunité

de connaître ce qu'est l'amour parental, et à

Leur sacrifice tout au long de mes études,

Je vous serai toujours reconnaissante.

A mes chères sœurs et cher frère, je vous aime

et vous souhaite beaucoup de bonheurs.

A tous mes ami (e) s, vous êtes précieux pour moi.

A mon petit adorable MAYAR.

RÉSUMÉ

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie laitière riche en matière organique spécialement en lactose et en protéines de très haute valeur nutritionnelle et fonctionnelle. Ce lactosérum est le premier polluant de l'industrie laitière. L'industrie de transformation du lait cherche des moyens innovants pour convertir cet effluent polluant en produits à forte valeur ajoutée. Notre étude visait à améliorer la valeur ajoutée des protéines du lactosérum en tant qu'ingrédient fonctionnelle soit par l'hydrolyse enzymatique ou bien par un traitement physique.

Le premier volet de ce travail a été consacré à l'étude de l'effet de l'hydrolyse enzymatique par des protéases d'origine végétal (ficine) et animal (pepsine du poulet) sur les propriétés biologiques et technologiques des protéines du lactosérum.

Les résultats obtenus ont montré que le degré d'hydrolyse (DH) des protéines du lactosérum par la ficine est significativement supérieur à celui de la pepsine. La caractérisation des hydrolysats par FPLC et par SDS-PAGE a montré que la ficine a présenté un pouvoir protéolytique très intéressant en hydrolysant complètement la protéine majeure et principal allergène du lait la β -Lg, protéine très résistante à tous types de protéases déjà connus.

L'identification des peptides de la fraction dont le poids moléculaire est inférieur à 3kDa par la LC Ms/Ms a montré que la ficine agit de manière plus spécifique sur les liaisons peptidiques de l' α -La que de celles de la β -Lg, et que la pepsine du poulet agit de manière étroitement spécifique sur l'extrémité N-terminale des liaisons peptidiques de la β -Lg et de l' α -La.

Les propriétés fonctionnelles des hydrolysats ont également été modifiées, la solubilité a été améliorée sur toute la gamme du pH en comparaison avec les protéines du lactosérum avec une nette amélioration pour les hydrolysats de la ficine. Les hydrolysats de la pepsine du poulet ont montré une amélioration des pouvoirs émulsifiant et moussant sur toute la gamme du pH, alors qu'une diminution de ces propriétés a été notée pour les hydrolysats de la ficine.

L'hydrolyse enzymatique a nettement amélioré les propriétés antioxydantes et antihypertensives des protéines du lactosérum. Les fractions inférieures à 3kDa ont présenté les meilleures activités. La prédiction de l'immunoréactivité a indiqué que l'hydrolyse réduit significativement l'immunoréactivité de la β -Lg et de l' α -La.

Le deuxième volet de ce travail a été consacré pour l'étude de l'effet du traitement de la Détente Instantanée Contrôlée » (DIC) par deux applications (à base sèche et humide) sur la structure et les propriétés technologiques des protéines de lactosérum. Les résultats obtenus ont montré que les poudres des protéines de lactosérum traitées par la DIC à base sèche présentaient des attributs de qualité plus élevés par rapport à celles obtenues à base humide. Les protéines traitées ont présenté une meilleure stabilité de la mousse, et une meilleure capacité absorption d'eau et d'huile et une diminution de la solubilité, du pouvoir moussant et émulsifiant.

Mot clés: Protéines du lactosérum; Hydrolyse; DIC, Propriétés biologique, Propriétés technofonctionnelles; Structure

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABREVIATIONS

CODE DES ACIDES AMINES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODOCTION GÉNÉRALE.....	1
-----------------------------------	----------

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
-----------------------------------	----------

CHAPITRE 1 :PROTÉINES DU LACTOSÉRUM	6
--	----------

1.1. Généralités sur le lactosérum	6
--	---

1.2. Protéines du lactosérum.....	7
-----------------------------------	---

1.2.1. β -Lactoglobuline (β -Lg)	8
---	---

1.2.2. α -Lactalbumine (α -La).....	12
--	----

1.2.3. Albumine Sérique Bovine (BSA)	14
--	----

1.2.4. Immunoglobulines (Igs).....	14
------------------------------------	----

1.2.5. Lactoferrine	15
---------------------------	----

1.2.6. Glycomacropeptide et les protéose-peptones.....	15
--	----

1.3. Méthodes de récupération des protéines du lactosérum.....	16
--	----

1.3.1. Précipitation sélective	16
--------------------------------------	----

1.3.2. Filtration membranaire.....	16
------------------------------------	----

1.3.3. Séparation chromatographique	17
---	----

1.4. Poudres du lactosérum	17
----------------------------------	----

CHAPITRE 2: PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES HYDROLYSATS DES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM.....	20
---	-----------

2.1. Enzymes protéolytiques.....	20
----------------------------------	----

2.1.1. Enzymes protéolytique d'origine animale	21
--	----

2.1.2. Enzymes d'origine végétale	23
---	----

2.1.3. Enzymes d'origine microbienne	24
--	----

2.2. Hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum et les enzymes utilisées	26
---	----

2.3. Effet de l'hydrolyse enzymatiques sur les propriétés techno-fonctionnelles.....	27
--	----

2.3.1. Solubilité.....	29
------------------------	----

2.3.2. Propriétés émulsifiantes	30
---------------------------------------	----

2.3.3. Propriétés moussantes	31
------------------------------------	----

2.4. Effet de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés biologiques	31
2.4.1. Activité antioxydante	32
2.4.2. Activité antihypertensive	34
2.4.3. Activité antimicrobienne.....	34
2.4.4. Réduction de l'allergénicité	35

CHAPITRE 3 : EFFET DES TRAITEMENTS PHYSIQUES SUR LA STRUCTURE ET LES PROPRIÉTÉS TECHNO-FONCTIONNELLES DES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM..... 40

3.1. Impact des traitements thermiques.....	40
3.2. Impact des Hautes Pressions	42
3.3. Impact des Ultrason.....	42
3.4. Impact de l'utilisation du champ électrique pulsé (CEP).....	43
3.5. Détente instantané contrôlée (DIC).....	44

MATÉRIEL ET MÉTHODES 29

Démarche générale de la thèse..... 46

1. Etude de l'impact de l'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum..... 49

1.1. Protéines du lactosérum.....	49
1.2. Enzymes.....	49
1.3. Extraction des enzymes.....	49
1.3.1. Ficine.....	49
1.3.2. Pepsine du poulet	51
1.4. Caractérisation des extraits enzymatiques.....	53
1.4.1. Détermination du pH, extrait sec total (EST) et rendement.....	53
1.4.2. Taux de protéines totales	53
1.4.3. Activité protéolytique	54
1.4.4. Activité spécifique	56
1.4.5. Profils électrophorétique (SDS-PAGE) des extraits enzymatiques	56
1.4.6. Détermination des conditions optimales d'hydrolyse.....	56
1.5. Cinétique de l'hydrolyse des protéines du lactosérum par les deux protéases.....	57
1.6. Caractérisation des produits de l'hydrolyse	57
1.6.1. Détermination du degré d'hydrolyse (DH).....	58
1.6.2. Détermination de la longueur moyenne de chaîne peptidique (LMCP)	59
1.6.3. Séparation électrophorétique en SDS-PAGE.....	60

1.6.4. Séparation chromatographique par gel de filtration (FPLC)	60
1.6.5. Identification des produits de l'hydrolyse par Spectrométrie de masse LC-Ms/Ms.....	61
1.7. Détermination des propriétés techno-fonctionnelles des hydrolysats	62
1.7.1. Solubilité.....	62
1.7.2. Indice de l'activité émulsifiante.....	62
1.7.3. Activité moussante.....	63
1.8. Détermination de l'activité antioxydante totale	63
1.8.1. Méthode ABTS	63
1.8.2. ORAC	64
1.8.3. Activité anti-hypertensive.....	65
1.8.4. Prédiction du potentiel allergène	66
2. Etude de l'impact du traitement par DIC sur la structure et les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum	67
2.1. Traitement de la DIC.....	67
2.2. Détermination des modifications de la structure des protéines du lactosérum	69
2.2.1. Quantification des protéines du lactosérum par FPLC	69
2.2.2. Détermination de la teneur en groupements thiols libres (SH).....	70
2.2.3. Profils électrophorétique par SDS-PAGE des protéines du lactosérum traitées par la DIC.....	71
2.3. Détermination des propriétés techno-fonctionnelle	72
2.3.1. Solubilité.....	72
2.3.2. Indice de l'activité émulsifiante (IAE)	72
2.3.3. Activité et stabilité moussante	72
2.3.4. Capacité d'absorption de l'eau (CAE) et de l'huile (CAH).....	73
3. Analyse statistique	73
RESULTATS ET DISCUSSION.....	74
1. Impact de l'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum	74
1.1. Caractéristiques des extraits enzymatiques.....	74
1.1.1. Caractéristiques physicochimiques	74
1.1.2. Profils électrophorétiques SDS-PAGE des extraits enzymatiques	75
1.1.3. Conditions optimales de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques	76
1.1.3.1. Effet du pH.....	76
1.1.3.2 Effet de la température.....	77
1.2. Caractéristiques des hydrolysats.....	79

1.2.1. Degré d'hydrolyse (DH)	79
1.2.2. Longueur moyenne de la chaîne peptidique (LMCP).....	81
1.2.3. Profil électrophorétique des hydrolysats.....	83
1.2.4. Suivi de l'évolution de l'hydrolyse FPLC	85
1.2.5. Taux des protéines non dégradées	90
1.2.6. Identification des fractions peptidiques par LC Ms/Ms.....	92
1.2.6.1. Peptides issus de l'hydrolyse par la ficine	92
1.2.6.2. Peptides issus de l'hydrolyse par la pepsine du poulet	93
1.3. Impact de l'hydrolyse sur les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum.....	93
1.3.1. Solubilité.....	94
1.3.2. Indice d'activité émulsifiante (IAE)	96
1.3.3. Activité moussante.....	97
1.4. Impact de l'hydrolyse sur les propriétés biologiques des protéines du lactosérum.....	98
1.4.1. Activité antioxydante	98
1.4.1.1. Activité antioxydante par la méthode ABTS	99
1.4.1.2. Activité antioxydante par la méthode ORAC	101
1.4.2. Détermination de la fraction responsable de l'activité antioxydante	102
1.4.3. Activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA).....	104
1.4.4. Prédiction du potentiel allergène	105
2. Impact du traitement par DIC sur la structure et les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum.....	107
2.1. Ajustement du modèle	107
2.2. Modifications de la structure des protéines du lactosérum par le traitement DIC.....	112
2.2.1. Effet de la DIC sur la structure quaternaire des protéines du lactosérum.....	112
2.2.2. Teneur en groupements thiols libres	116
2.2.3. Effet de la DIC sur la structure primaire des protéines du lactosérum (Tricine-SDS-PAGE).....	119
2.3. Impact de la DIC sur les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum	121
2.3.1. Solubilité.....	121
2.3.2. Indice de l'activité émulsifiante (IAE)	124
2.3.3. Activité moussante et stabilité de la mousse.....	126
2.3.4. Capacité d'absorption d'eau (CAE).....	129
2.3.5. Capacité d'absorption d'huile (CAH).....	131
2.4. Corrélation entre les facteurs de traitement et les variables étudiés	132

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	137
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	142
ANNEXES	167

الملخص

Abstract

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

LISTE DES ABREVIATIONS

AAPH	2,2'-azobis (2-méthylpropionamide) dihydrochloride
Abs	Absorbance
ABTS	2,20- azinobis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ABTS⁺	2,20- azinobis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
α-La	α -Lactalbumine
ANC	Aire Nette sous la Courbe
APS	Ammonium Persulfate (Persulfate d'Ammonium)
AM	Activité moussante
ANOVA	Analyse de variance
APC	Analyse principale des composants
β-Lg	β -Lactoglobuline
BSA	Bovin Serum Albumine (Albumine de Sérum Bovin)
CAE	Capacité d'absorption de l'eau
CAH	Capacité d'absorption de l'huile
CCD	Composite Central Design (Plan Composite Central)
CEP	Champ Electrique Pulsé
CPL	Concentré de protéine du lactosérum
DH	Degré d'hydrolyse
DIC	Détente Instantanée Contrôlée
DIC-S	Détente Instantanée Contrôlée à base sèche
DIC-H	Détente Instantanée Contrôlée à base humide
DTNB	5,5'-Dithiobis Acide Nitrobenzoïc (Acide 5,5'-Dithiobis Nitrobenzoïque)
ECA	Enzyme de Convesion de l'Angiotensine I
E: S	Enzyme: Substrat
EST	Extrait Sec Total
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acetic Acid
ET	Equivalent Trolox
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organisation)
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GMP	Glycomacropéptide
GRAS	Generally Recognized As Safe (Généralement reconnu comme sûr)
HPH	Haute Pression Hydrostatique
HPL	Hydrolysats de protéine du lactosérum
HPL.F	Hydrolysats des protéines du lactosérum de la ficine
HPL.PP	Hydrolysats des protéines du lactosérum de pepsine du poulet
HPL.P	Hydrolysats des protéines du lactosérum de pepsine porcine
HTST	High Temperature Short Time
IAE	Indice d'activité émulsifiante
Igs	Immunoglobulines
IPL	Isolat des protéines du lactosérum
LCMP	Longueur de chaîne moyenne des peptides
kHz	Kilo Hertz
MPa	Mega Pascal
MF	Microfiltration
MSR	Méthodologie de Surface de Réponse
MT	Marqueur de taille
OMS	Organisation mondiale de santé

ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween (Tampon Phosphate Salin Tween)
P	Pression
pHi	pH isoélectrique
PL.N	Protéines du lactosérum natives
PL.NT	Protéines du lactosérum non traité
REP	Rapport d'efficacité protéique
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	Électrophorèse Sur Gel de Polyacrylamide en présence de SDS
SH	Sulfhydryle
SM	Stabilité moussante
T	Temps
TR	Temps de rétention
TAH	Transfert d'atomes d'hydrogène
TCA	Trichloracétic Acid (Acide Trichloracétique)
TEMED	N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine
TE	Transfert d'électrons
TNBS	Trinitrobenzenesulfonic
Tris	Trisaminométhane
UF	Ultrafiltration

CODE DES ACIDES AMINÉS

Acide aminé	Abréviation 3-Lettres	Abréviation 1 -Lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Aspartate	Asp	D
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamate	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Illustration de l'interface associée à la formation de dimères de β -Lg telle que déterminée par rayons	9
Figure 2: Structure cristalline d'un monomère de β -Lg bovine	10
Figure 3: Etats associatif de la β -lg en solution aqueuse en fonction du pH selon)	11
Figure 4: Structure tridimensionnelle de la forme native de l' α - La (en présence d'ions Ca^{2+}) à pH 8	13
Figure 5: Gamme d'ingrédients à base de protéines du lactosérum ayant un potentiel commercial et des propriétés physiologiques fonctionnelles croissantes.....	19
Figure 6: Étapes du traitement DIC.....	45
Figure 7: Schéma récapitulatif de la méthodologie de recherche de la thèse.....	48
Figure 8: Concentré des protéines du lactosérum (CPL)	49
Figure 9: Récupération du latex du figuier.....	50
Figure 10: Diagramme d'extraction de l'extrait brut de la Ficine.....	51
Figure 11: Diagramme d'extraction de la pepsine du poulet selon Bohak	52
Figure 12: Courbe étalonnage de Tyrosine	55
Figure 13: Réaction de TNBS avec un acide aminé.....	58
Figure 14: Courbe étalonnage de Leucine.....	59
Figure 15: Courbe étalonnage de β -Lg et α -La	61
Figure 16: Courbe étalonnage de Trolox pour la méthode ABTS.....	64
Figure 17 : Présentation schématique d'un réacteur DIC typique.	68
Figure 18: Courbe étalonnage de β -Lg, α -La et BSA	70
Figure 19: Réaction de DTNB en présence de thiols	71
Figure 20: Profils électrophorétiques des extraits enzymatiques.. ..	75
Figure 21: Effet du pH sur l'activité protéolytique des extraits enzymatiques	77
Figure 22: Effet de la température sur l'activité protéolytique des extraits enzymatique	78
Figure 23: Degré d'hydrolyse (DH) en fonction de temps pour les trois enzymes aux deux ratios E/S.	80
Figure 24: Longueur moyenne de chaîne peptidique (LMCP) des hydrolysats des trois enzymes en fonction de temps pour les deux ratios E/S.. ..	83
Figure 25: Profils électrophorétiques des hydrolysats des protéines du lactosérum par les trois enzymes à différents temps d'hydrolyse (0, 0,5, 2 et 6h) pour les deux ratios E/S.....	84
Figure 26: Chromatogrammes exclusion de taille des protéines du lactosérum native, et des hydrolysats de la ficine	87
Figure 27: Chromatogrammes exclusion de taille des protéines de lactosérum native et des hydrolysats de la pepsine du poulet	88
Figure 28: Chromatogrammes exclusion de taille des protéines du lactosérum natives, et des hydrolysats de la pepsine porcine.	89
Figure 29: Le taux de la β -Lg et α -La après l'hydrolyse par les trois enzymes à différents temps d'hydrolyse (0, 0,5, 2 et 6h) pour les deux ratios E/S.	91
Figure 30 : Solubilité des protéines natives du lactosérum et des hydrolysats par les trois enzymes en fonction du pH.....	95
Figure 31: Indice d'activité émulsifiante (IAE) des protéines natives du lactosérum et des hydrolysats par les trois enzymes en fonction du pH.	96
Figure 32: Activité moussante des protéines natives du lactosérum et des hydrolysats par les trois enzymes en fonction du pH.	98

Figure 33: Activité antioxydant des hydrolysats à ratio E/S de 0,5 et 1% mesurées par piégeage ABTS par rapport au temps d'hydrolyse exprimé en heures des trois hydrolysats.....	100
Figure 34: Activité antioxydante des hydrolysats à ratio E/S de 0,5 et 1% mesurée par piégeage ORAC en fonction du temps d'hydrolyse des trois hydrolysats	102
Figure 35: Aspect de la poudre de protéines du lactosérum après traitement DIC pour les deux applications (Photographie) des deux applications de la DIC.....	111
Figure 36: Diagramme de Pareto et les effet directs normalisé avec le modèle de régression ajustée pour les concentrations des protéines restant intactes après le traitement de la DIC pour les deux applications	115
Figure 37 : Surfaces de réponses de l'effet de la DIC sur la concentration des protéines du lactosérum (β -Lg, α -La, et BSA) pour les deux applications.	115
Figure 38: Diagramme de Pareto et des effets directs pour les concentrations en groupement thiols libres des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications.....	117
Figure 39: Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la teneur en groupements thiols libres des protéines du lactosérum pour les deux applications de la DIC.	118
Figure 40: Profils électrophorétiques des protéines du lactosérum témoin et traités par la DIC pour les deux applications.....	120
Figure 41: Diagramme de Pareto et des effets directs pour la solubilité des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications	122
Figure 42: Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la solubilité des protéines du lactosérum pour les deux applications. S: Application de la DIC à base sèche (DIC-S); H: Application de la DIC à base humide (DIC-H)	123
Figure 43: Diagramme de Pareto et des effets directe pour l'indice de capacité émulsifiante (IAE) des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications	125
Figure 44: Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur l'indice d'activité émulsifiante (IAE) des protéines du lactosérum pour l'application de la DIC à base sèche (DIC-S).....	126
Figure 45: Diagramme de Pareto et des effets directs pour l'activité et la stabilité moussante des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications	128
Figure 46: Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la stabilité moussante des protéines du lactosérum pour l'application de la DIC à base sèche (DIC-S).....	129
Figure 47: Diagramme de Pareto et des effets directs pour la capacité d'absorption d'eau (CAE) des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications	130
Figure 48 : Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la capacité d'absorption d'eau (CAE) des protéines du lactosérum de l'application de la DIC a base sèche (DIC-S).	131
Figure 49: Diagramme de Pareto des effets directs pour la capacité d'absorption d'huile (CAH) des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications.	132

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques de la composition du lactosérum doux et acide	7
Tableau 2: Composition protéique et les principales caractéristiques des protéines du lactosérum	8
Tableau 3: Applications des protéases dans différents industries.....	20
Tableau 4: Microorganismes ayant une activité protéolytique	24
Tableau 5: Changement des propriétés fonctionnelles selon le type d'enzyme et conditions d'hydrolyse des protéines du lactosérum	28
Tableau 6: Peptides à activité antioxydante, antihypertensive et antimicrobienne issus des protéines du lactosérum.....	32
Tableau 7: Epitopes de β -Lg et α -La	36
Tableau 8: Synthèse des travaux sur la capacité de réduction de l'antigénicité et de l'allergénicité des protéines du lactosérum par l'hydrolyse enzymatique	38
Tableau 9: Composition des gels d'électrophorèse (SDS/PAGE).....	56
Tableau 10: Design expérimental du plan CCD pour le traitement de DIC	69
Tableau 11: Matrice du plan d'expérience CCD du traitement DIC (humide et sèche).....	69
Tableau 12: Caractéristiques des extraits enzymatiques bruts.....	75
Tableau 13: Peptides prédominants identifiés par LC Ms/Ms de la fraction < 3 kDa des HPL.F	93
Tableau 14: Peptides prédominants identifiés par LC Ms/Ms de la fraction < 3 kDa des HPL.PP	93
Tableau 15: Activité antioxydante par ORAC des fractions	103
Tableau 16: Activité inhibitrice de l'ECA des fractions	104
Tableau 17: Fréquence d'apparition des épitopes dans la séquence des protéines et le taux de réduction de l'allergénicité.....	105
Tableau 18: Modèles de régression pour les variables de réponse pour l'application de la DIC à base sèche (DIC-S).	108
Tableau 19: Modèles de régression pour les variables de réponse pour l'application de la DIC a base humide (DIC-H).	110
Tableau 20: Matrice de corrélation (Pearson) des propriétés chimique et techno-fonctionnelle des protéines du lactosérum traitées par la DIC à base sèche (DIC-S)	134
Tableau 21: Matrice de corrélation (Pearson) des propriétés chimique et techno-fonctionnelle des protéines de lactosérum traitées par la DIC à base humide (DIC-H).-	135

INTRODOCTION GÉNÉRALE

L'industrie laitière produit une grande quantité de sous-produits à forte teneur en matière organique, notamment en glucides, en protéines et en lipides (Demirel et al., 2005). L'un des principaux effluents de cette industrie est le lactosérum, qui est un co-produit de la caséinerie et de la fromagerie.

Le lactosérum est considéré comme le polluant le plus important de l'industrie laitière, non seulement en raison de sa charge organique élevée, mais aussi en raison de son volume important (Brandelli et al., 2015). La production de 1 kg de fromage génère environ 9 à 10 L de lactosérum (Pires et al., 2021). En général, le lactosérum de fromagerie présente une demande chimique en oxygène (DCO; 50-70 g/L) et une demande biologique en oxygène (DBO; 27-60 g/L) élevées parce qu'il peut conserver jusqu'à 55% de la totalité des nutriments du lait (Zotta et al., 2020). Lorsqu'il est rejeté dans la nature, il génère une diminution du contenu en oxygène dissous, des problèmes d'eutrophisation et de toxicité modifiant les propriétés physico-chimiques des écosystèmes (Carvalho et al., 2013; Yadav et al., 2015).

La valorisation du lactosérum et de ses constituants est devenue une obligation écologique et économique afin de réduire l'impact négatif qu'il produit sur l'environnement.

La production mondiale du lactosérum est d'environ 180 à 200 millions de tonnes/an contenant environ 1,5 million de tonnes par an de protéines de haute valeur nutritionnelle et fonctionnelle (Panghal et al., 2018; Rincón-Catalán et al., 2022). Chaque année, la production totale du lactosérum augmente de 1 à 2%, en revanche moins de 50% de la production totale du lactosérum est utilisée ou transformée. 50 % de la production mondiale est rejetée en tant qu'effluent laitier avec de sérieuses préoccupations environnementales (Panghal et al., 2018). En 2020, l'Europe a produit, à elle seule, près de 148 millions de tonnes de lait et près de 50% de ce lait a été utilisé pour la production de fromage, où 80 à 90% du volume du lait est expulsé sous forme de lactosérum, résultant en 54,8 millions de tonnes de lactosérum liquide (Tsermoula et al., 2021). En Algérie, la production du fromage a été estimée à 2 708 tonne/an en 2019 avec une moyenne de 2500 tonne/an durant les 10 derniers années équivalente à un rejet de 25000 tonne/an de lactosérum (FAO, 2021).

Depuis plus d'un siècle, l'industrie de transformation laitière cherche des moyens innovants pour convertir leurs effluents en produits à haute valeur ajoutée comme ingrédient ou comme produit à part entière soit en alimentation animale ou en alimentation humaine (Tavares et al., 2012).

Le lactosérum est composé principalement de protéines à haute valeur nutritionnelle (Ballatore et al., 2020). Les protéines du lactosérum sont un mélange de protéines globulaires composées de 50 à 60% de β -lactoglobuline (β -Lg), 15 à 25% d' α -lactalbumine (α -La), 6% de

sérum albumine bovine (BSA), moins de 10% d'immunoglobulines (Ig), et moins de 3% de lactoferrine (Corrochano et al., 2018).

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont déclaré, dans un rapport technique conjoint (1985) que les protéines du lactosérum sont hautement digestibles et offrent une composition protéique complète. Cette valeur nutritionnelle élevée des protéines du lactosérum est justifiée par sa concentration élevée en acides aminés essentiels tels que la Lys, le Try, Ile et Thr. Le rapport d'efficacité protéique (REP) est plus élevé pour les protéines du lactosérum (3,2) que pour les caséines (2,6) (Kumar et al., 2018). La valeur biologique des protéines du lactosérum est supérieure de 15% à celle de la protéine d'œuf, anciennes protéines de référence (Ryan & Walsh, 2016).

En outre, les protéines du lactosérum sans subir des traitements thermiques présentent des propriétés fonctionnelles intéressantes, comme une bonne solubilité, une bonne viscosité et des propriétés gélifiantes et émulsifiantes. Les concentrés protéiques sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire, elles sont utilisées pour la fabrication de préparations pour nourrissons ou pour augmenter la valeur nutritionnelle des produits laitiers et autres produits alimentaires (Bozanic et al., 2014).

Aujourd'hui, les ingrédients dérivés du lactosérum affichent la croissance la plus rapide du marché par rapport à tout autre ingrédient laitier, avec un marché évalué à 53,8 milliards de dollars en 2019 et des projections pour atteindre 81,4 milliards de dollars d'ici 2025 (Tsermoula et al., 2021).

En revanche, la majorité des protéines du lactosérum sous forme native présentent peu de propriétés fonctionnelles adaptées pour les conditions de travail de l'industrie alimentaire. En effet les traitements thermiques en cours de transformation de certains produits contenant des protéines du lactosérum peuvent entraîner une dénaturation, agrégation, et floculation des protéines, et par conséquent, la déstabilisation des émulsions ou la précipitation des protéines dans la phase liquide (Dissanayake & Vasiljevic, 2009). C'est donc à l'industrie qu'il revient d'améliorer la fonctionnalité de ces protéines afin d'éviter les effets négatifs induits par les traitements technologiques lors de la transformation et la production.

L'hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum peut améliorer à la fois leurs propriétés technologiques et biologiques (Power et al., 2013) tels que la solubilité, l'émulsification, les capacités moussante et gélifiante et la libération de peptides bioactifs (Gauthier & Pouliot, 2003; Jeewanthi et al., 2015). En outre, l'hydrolyse enzymatique est utilisée pour réduire l'allergénicité et l'antigénicité des protéines du lactosérum (Popescu et al.,

2021; Ambrosi et al., 2016). L'hydrolyse enzymatique peut également améliorer l'activité antihypertensive, antimicrobienne, hypoglycémisante, ainsi que l'activité antioxydante des peptides issus de ces protéines (Kleekayai et al., 2020). Les hydrolysats des protéines du lactosérum sont très utilisés dans les laits et les formules infantiles hypoallergéniques à cause de leur qualité nutritionnelles et l'allergénicité réduite (Lozano-Ojalvo et al. 2017). Les préparations fortement hydrolysées sont recommandées pour le traitement diététique des nourrissons allergiques au lait de vache (Dahdah et al., 2022).

La fonctionnalité des peptides est influencée par le type et la nature de l'enzyme utilisée pour l'hydrolyse (Kleekayai et al., 2020). La majorité des enzymes étudiées et utilisés jusqu'à présent sont les enzymes digestives: la pepsine, la chymotrypsine et la trypsine (Adjonu et al., 2013; Embiriekah et al., 2018; Jeewanthi et al., 2015).

La production d'hydrolysats de protéines de lactosérum (HPL) peut être une approche intéressante pour leurs valorisation, ceci permettra non seulement de répondre à la demande croissante d'aliments fonctionnels en technologie alimentaire mais aussi de réduire leur impact néfaste sur l'environnement (Ballatore et al., 2020 ; Yadav et al., 2015).

Les protéines de lactosérum et spécialement la β -Lg sont difficiles à dégrader et résistent à l'hydrolyse par la plupart des protéases digestives tels que la pepsine, la chymotrypsine et la trypsine (Barros & Malcata, 2006). Cette résistance est due à leur structure globulaire et le cor hydrophobe qu'elles contiennent (Abadía-García et al., 2016). Des traitements physiques tels que les traitements thermiques sont utilisés pour favoriser l'hydrolyse de ces protéines (Abadía-García et al., 2016; Lozano-Ojalvo et al., 2017).

La technologie est en recherche constante d'enzymes ayant une activité protéolytique élevée sur les protéines du lactosérum et spécialement sur la β -Lg. La recherche d'enzymes protéolytiques alternatives attire l'attention en raison de l'intérêt croissant pour les hydrolysats de protéines de lactosérum (HPL) et les peptides bioactifs issus de ces hydrolyses pour leur utilisation dans la production d'aliments fonctionnels et les thérapies peptidiques (Sutay Kocabaş et al., 2022). Une forte demande d'enzymes protéolytiques à appliquer à plusieurs secteurs industriels est également signalée (Mazorra-Manzano et al., 2020).

La modification des protéines du lactosérum pourrait améliorer leur valeur nutritionnelle et/ou propriétés fonctionnelles (Moure et al., 2006). La fonctionnalité des protéines du lactosérum peut être améliorée par la modification de la protéine via des traitements enzymatiques ou physiques (Kilara & Vaghela, 2018; Eman, 2018). Ces traitements

provoquent des modifications physico-chimiques, structurelles et fonctionnelles de ces protéines (Severin & Xia, 2006). Les caractéristiques de taille, de surface, de charge nette, de ratio hydrophobicité/ hydrophilicité, et de flexibilité des protéines peuvent être ainsi modifiés (Moure et al., 2006).

Les hautes pressions (Bouaouina et al., 2006), les ultrasons à haute intensité (Herceg et al., 2007; Shen et al., 2016) et les traitements à pulse électrique et thermique (Sui et al., 2011) ont été étudiés pour déterminer l'impact de ces traitements sur la fonctionnalité des protéines de lactosérum. L'application industrielle de ces technologies est encore limitée (Mazen Hamoud-Agha & Allaf, 2019).

Des études préalables ont montré que la DIC (détente instantanée contrôlée) pouvait réduire jusqu'à 80% de l'immunoréactivité de ces protéines (Boughellout et al., 2013), pour cela nous avons estimé nécessaire de déterminer l'impact de ce traitement sur la structure et la fonctionnalité de ces protéines.

L'effet du procédé de la DIC sur les propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires a été très peu étudié. En outre, aucune étude n'a été réalisée sur l'effet de ce traitement sur la structure et les propriétés fonctionnelles des protéines de lactosérum.

Compte tenu des considérations citées ci-dessus, notre thèse rentre dans le cadre de la valorisation des protéines de lactosérum et l'amélioration de leur valeur ajoutée en tant qu'ingrédient fonctionnel utilisé pour l'élaboration de produits alimentaires fonctionnelles et diététiques.

Pour répondre à ces objectifs, ce travail de thèse est réparti en deux parties. Une première partie vise à améliorer les propriétés biologiques et technologiques des protéines du lactosérum par l'hydrolyse enzymatique à l'aide de deux protéases, une d'origine végétale (ficine) et l'autre d'origine animal (pepsine du poulet). La pepsine du poulet est extraite à partir des déchets de la transformation aviaire, alors que la ficine est extraite à partir du latex du figuier. Ces deux enzymes ne sont pas encore valorisés en industrie alimentaire ou autre.

La deuxième partie de la thèse est dédiée à l'étude de l'impact du traitement physique par la technique de détente instantanée contrôlée (DIC) sur la structure et les propriétés technologiques des protéines du lactosérum.

Le présent manuscrit est structuré en trois parties. La première partie, consacrée à une synthèse des données bibliographiques, est articulée autour de notions sur les protéines de

lactosérum, leurs utilisations et l'impact des traitements enzymatiques et physiques sur leurs propriétés biologiques et fonctionnelles. La seconde partie est consacrée à la méthodologie et le matériel et méthodes mis en œuvre pour répondre à nos objectifs. En troisième partie, nous présenterons les résultats obtenus concernant l'impact des traitements utilisés sur la structure et les propriétés biologiques et fonctionnelles de ces protéines.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

PROTÉINES DU LACTOSÉRUM

1.1. Généralités sur le lactosérum

La fabrication des fromages nécessite une étape de coagulation de la caséine soit par une acidification du lait (ajout de ferment lactique/acide), soit par des enzymes (la présure). La précipitation et la séparation des caséines pendant l'étape d'égouttage engendre un liquide résiduel qui est le lactosérum.

Le lactosérum, petit-lait ou sérum, est un co-produit de l'industrie fromagère, sous forme liquide, généralement de couleur jaunâtre à verdâtre selon la qualité et le type du lait utilisé. Environ 9 kg du lactosérum sont générés pour 1kg de fromage à pâte pressée produit (Bozanic et al., 2014; Yadav et al., 2015). La couleur jaunâtre du lactosérum est due à la présence de riboflavine (vitamine B2) dans le lactosérum (Ryan & Walsh, 2016).

Le lactosérum est produit à partir de tous les types de lait, mais le lait de vache est le plus commun. Le lait de chèvre, de brebis et de chamelle peut être utilisé dans la fabrication des produits laitiers qui se traduisent par la production du lactosérum issu du lait de ces races (Bordenave-Juchereau et al., 2005; Smithers, 2008).

Le lactosérum peut être classé en deux types selon la méthode utilisée lors de la coagulation des caséines, le lactosérum doux et le lactosérum acide. Le lactosérum doux présente un pH de 6 à 6,5 et résulte de la coagulation de la caséine par la présure ou d'autres enzymes lors de la fabrication des fromages à pâtes pressées cuites ou non cuites, dont l'acidité varie entre 15 et 22 °D. Alors que le lactosérum acide présente un pH de 4,3 à 5,1 en raison de la conversion du lactose en acide lactique par des bactéries lactiques ou par l'addition des acides organiques ou minéraux lors de la fabrication des fromages à pâtes fraîches et molles, son acidité peut alors atteindre 120 °D (Fischer & Kleinschmidt, 2015; Lindsay et al., 2018).

Le lactosérum est constitué essentiellement d'eau, de lactoses, de protéine, de minéraux et très peu de matière grasse. Les principales différences entre les deux types du lactosérum se situent au niveau de leur teneur en minéraux, leur acidité et leur teneur en fractions protéiques (tableau 1) (Yadav et al., 2015).

La composition et les caractéristiques du lactosérum dépendent également de la source du lait (vache, chèvre, brebis, etc.) et leur composition initial, de l'alimentation de l'animal, de la méthode de transformation utilisée, du moment de l'année et du stade de lactation (Ganju & Gogate, 2017).

Tableau 1: Caractéristiques de la composition du lactosérum doux et acide (Yadav et al., 2015)

Composition (g/L)	Lactosérum doux	Lactosérum acide
Solides Totaux	63,0 - 70,0	63,0 - 70,0
Lactose	46,0 - 52,0	44,0 - 46,0
Protéine	6,0 - 10,0	6,0 - 8,0
Matière grasse	1,0	0,5
Acide lactique	2,0	6,4
Cendres	5,0	8,0
Calcium	0,4 - 0,6	1,2 - 1,6
Phosphates	1,0 - 3,0	2,0 - 4,5
Chlorures	1,1	1,1

Le lactosérum acide se distingue du lactosérum doux en termes de protéines, minéraux et concentrations en lactose. Il a également une acidité et une teneur en calcium plus élevées, avec absence du caséino-macropéptide (qui provient de l'hydrolyse de la caséine K par la présure dans le lactosérum doux) (Lievore et al., 2015).

Le lactosérum doux est moins minéralisé, car lors de la production fromagère, plus de la moitié du phosphore et des cations divalents sont retenus dans le caillé. Au contraire, lors d'une coagulation acide, la plupart des minéraux colloïdaux (calcium, phosphate, citrate de calcium et magnésium) se solubilisent et se retrouvent dans le lactosérum acide (Bozanic et al., 2014; St-Gelais et al., 2010 cité par Forkwa 2017). Comparé au lactosérum doux, le lactosérum acide a une plus faible teneur en lactose en raison du procédé de fabrication qui implique une fermentation avant coagulation au cours de laquelle une partie du lactose est converti en acide lactique (Forkwa, 2017).

1.2. Protéines du lactosérum

Les fractions protéiques du lactosérum représentent environ 18 à 20% de l'azote protéique total du lait (6 g/L) (Jovanović et al., 2005), elles sont constituées d'un mélange de différents composants, qui sont: la β -Lactoglobuline (β -Lg), l' α -lactalbumine (α -La), les immunoglobulines (Igs) en fraction majeure, la sérum albumine bovine (BSA), la lactoferrine, la lactoperoxydase, les protéose-peptones et le glycomacropéptide (GMP) en fraction mineur. Ces composants protéiques sont naturellement présents dans le lactosérum, à l'exception du GMP qui est produit à partir de la dégradation de la caséine κ au cours de la première phase de la transformation enzymatique du fromage (Sharma, 2019; Yadav et al., 2015).

La concentration et les principales caractéristiques de chaque protéine sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2: Composition protéique et les principales caractéristiques des protéines du lactosérum (Yadav et al., 2015)

Protéine	Concentration (%)	Poids moléculaire (kDa)	Point isoélectrique (pHi)
β-Lactoglobuline (β-Lg)	40-50	18,3	5,35-5,49
α-Lactalbumine (α -La)	12-15	14,0	4,2-4,5
Ibumine Sérum bovin (BSA)	5,0	66.0	5.13
Immunoglobulines (Igs)	8,0	150-1000	5,5-8,3
Lactoferrine	1,0	76.5	9,5-10,0
Glycomacropeptide (GMP).	12,0	6,8	4,3-4,6
Protéose-peptone	0,19	4-22	-
Lactoperoxydase	0,5	78,0	9,5

Les protéines du lactosérum ont des structures globulaires différentes. Ces protéines possèdent des niveaux élevés de structures secondaires, tertiaires et dans la plupart des cas quaternaires leur conférant des caractéristiques fonctionnelles et physiologiques distinctes (Yadav et al., 2015; Jovanović et al., 2005).

1.2.1. β -Lactoglobuline (β -Lg)

La β -Lg est présente à une concentration de 3,2 g/L dans le lait bovin mature, et représente environ 50% des protéines du lactosérum totales (soit environ 10% des protéines laitières totales) (Le Maux et al., 2017).

La β -lg est une protéine globulaire, qui contient 162 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 18,3 kDa. Sa structure secondaire comprend 50% de feuillet β et 10% d'hélice α (Jovanović et al., 2005). Elle appartient à la famille des lipocalines et est absente dans le lait humain (Crowther et al., 2016; Jeewanthi et al., 2015). Les Lipocalines sont une famille de protéines qui partagent la même structure malgré une grande diversité au niveau de la séquence (Crowther et al., 2016).

Généralement, la β -Lg existe sous la forme d'un dimère de 2 molécules (2 sous-unités identiques) (Yadav et al., 2015; Kilara & Vaghela, 2018) stabilisée par des liaisons hydrogènes (Jovanović et al., 2005) (figure 1). Chaque monomère de β -Lg contient cinq résidus de cystéine

(Cys). L'un de ces résidus existe sous forme d'un thiol libre (Cys121) sur le brin G, et est enterré sous l'hélice α , tandis que les autres quatre sont sous formes de deux ponts disulfures. Le premier (Cys 66-Cys160) relie le C-terminal à la boucle du CD, tandis que le deuxième (Cys106-Cys119) lie les brins G et H du feuillet β (localisé à l'intérieur de la molécule) (Crowther et al., 2016). La structure tridimensionnelle de la β -lg est présentée dans la figure 2.

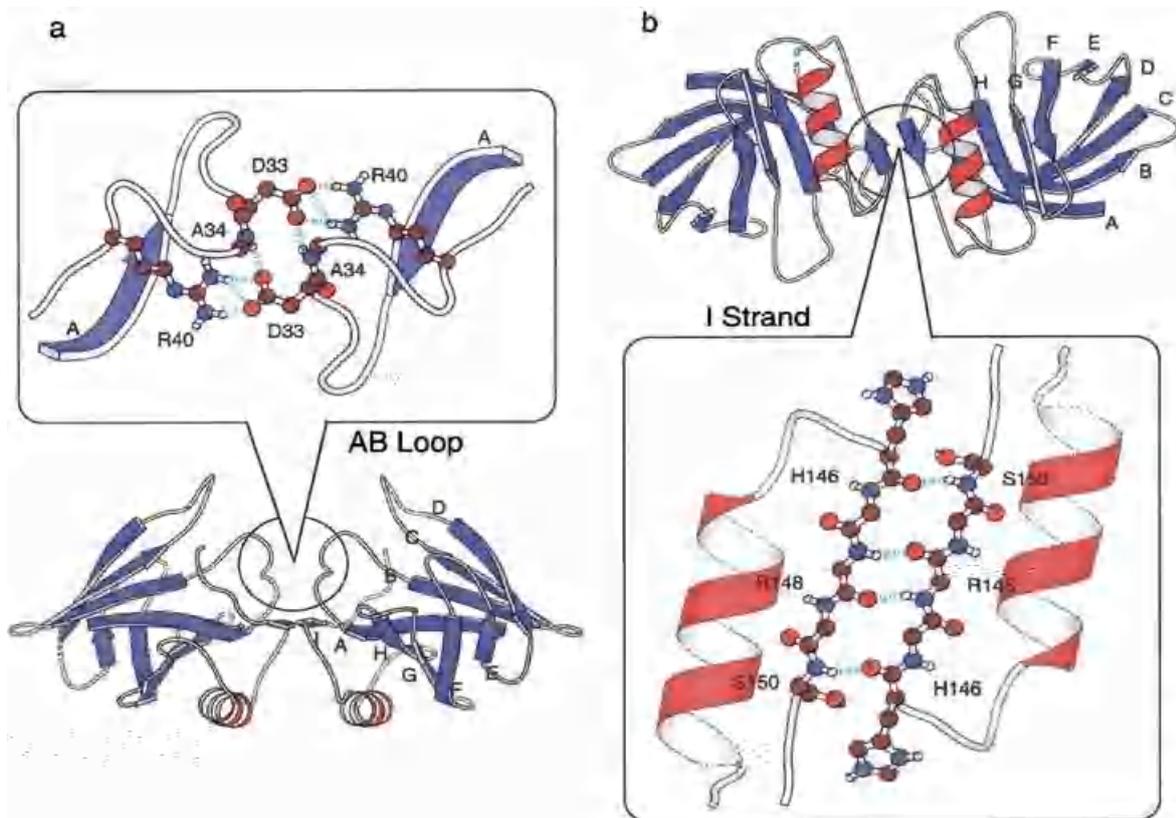


Figure 1: Illustration de l'interface associée à la formation de dimères de β -Lg telle que déterminée par rayons X (Sakurai et al., 2001). **a:** deux boucles AB ; **b:** deux feuillets β -I permettent de voir les liaisons hydrogène intersous-unitaires entre les chaînes latérales et les chaînes principales

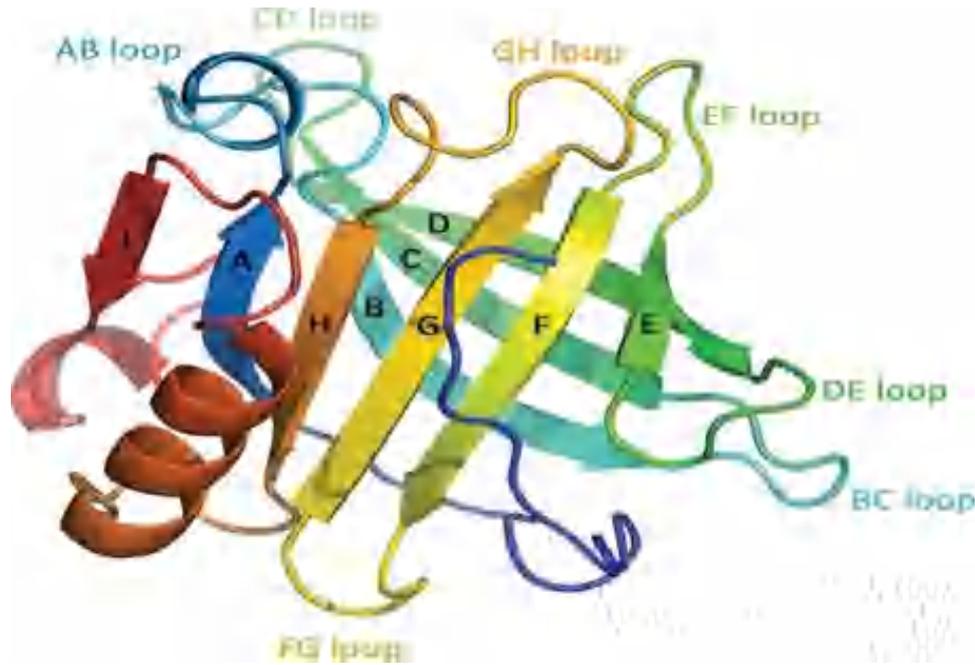


Figure 2: Structure cristalline d'un monomère de β -Lg bovine (ID PDB: 1BSO) (Crowther et al., 2016). Huit brins β (A-H) forment le calice central β -feuille antiparallèle. Le calice est flanqué sur sa surface externe d'une hélice α à trois spires. Le neuvième brin β , I et la boucle AB sont impliqués dans la formation des dimères. La chaîne polypeptidique est représentée par des couleurs arc-en-ciel, commençant en bleu à l'extrémité N-terminale et se terminant en rouge à l'extrémité C-terminale

Il existe deux variants génétiques courants A et B, qui diffèrent par la substitution d'une glycine (Gly) dans le variant B par un acide aspartique (Asp) dans le variant A (Crowther et al., 2016; Kilara & Vaghela, 2018).

Dans les conditions naturelles, le groupe thiol libre à Cys 121 n'est pas disponible puisqu'il est enfoui au centre de la molécule, mais devient exposé et actif après dénaturation, dans certaines conditions (par exemple à des températures > 70 °C, pH extrême ou haute pression), la structure tertiaire de β -lg peut se déplier partiellement, exposant ainsi le groupe thiol libre, ce qui favorisera ainsi l'établissement de ponts disulfures intra et intermoléculaires et l'apparition d'agrégats (Croguennec et al., 2004; Jovanović et al., 2005).

L'état associatif de la β -Lg en solution varie en fonction du pH (Crowther et al., 2016; de Wit, 1989; Hambling et al., 1992) (figure 3). La β -lg existe sous forme de monomère à des pH < 3 et pH > 8 . Entre un pH de 3,1 et 5,1 à basse température et à haute teneur en protéines, le dimère se polymérise en octamère (Kilara & Vaghela, 2018) alors qu'entre le pH 5 et 8, la β -lg est retrouvée sous forme dimérique (Edwards et al., 2002).

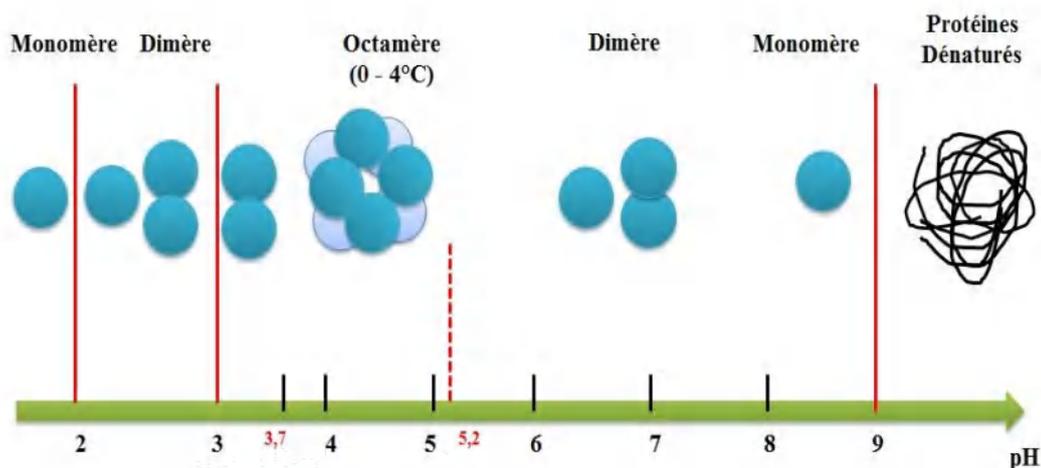


Figure 3: Etats associatif de la β -lg en solution aqueuse en fonction du pH selon (Hambling et al., 1992)

Selon Pérez-Gago & Krochta (2002), en condition acide, spécialement au-dessous d'un pH de 3, les dimères se dissocient en monomères à cause des forces élevées de répulsion électrostatique, mais l'association n'est pas accompagnée par des changements dans la forme moléculaire ou dans la conformation des monomères.

Selon Edwards et al. (2002), la protéine existe sous forme de monomère en dessous de pH 3,5 et dans ces conditions, la structure tridimensionnelle de la protéine semble stable, même à des températures allant jusqu'à 75-80 °C. À pH supérieur à 8, la β -Lg devient insoluble grâce à une dénaturation et une agrégation (de wit, 1989; Hambling et al., 1992) provoqué par des réactions d'échanges des groupements thiol des résidus Cys libres, activés à pH élevé (Hambling et al., 1992).

La température de dénaturation de la β -Lg varie avec le pH, par exemple la température de dénaturation à pH 8,05 est de 65 °C alors qu'elle est de 74 °C à pH 6,75 (Qi et al., 1995).

La β -Lg est une protéine précieuse avec ses caractéristiques nutritionnelles intéressantes, source importante de peptides bioactifs et pour ses diverses propriétés technofonctionnelles utiles, telles que l'épaississement, l'émulsification, la gélification ou la formation de mousse, et est fréquemment utilisé comme additif alimentaire pour ses multiples fonctions dans les aliments (Brodkorb et al., 2016; Wu et al., 2018). Elle montre une bonne solubilité et une stabilité sur une large gamme de pH lors des traitements thermiques (Chatterton et al., 2006).

La β -Lg dont la fonction dans le lait n'est pas encore entièrement élucidée, joue un rôle important dans l'assimilation de la vitamine A grâce à leur zone hydrophobe (Kilara & Vaghela,

2018). Selon Crowther et al. (2016), la fonction physiologique de la protéine est toujours un mystère. La capacité de la β -Lg à se lier à des molécules hydrophobes avec sa stabilité à un pH faible, et la résistance aux enzymes protéolytiques suggèrent fortement un rôle dans le transport des acides gras entre la mère et l'enfant.

La β -Lg montre une excellente formation de gel et des mousses et peut être utilisé comme agent structurant et stabilisant dans un certain nombre de produits laitiers et non laitiers (Dannenberg & Kessler, 1988).

Cette protéine est très résistante à la digestion gastrique, car elle est stable contre les acides et les enzymes protéolytiques (El Mecherfi et al., 2018; Reddy et al., 1988). Il semble aussi qu'elle reste pratiquement intacte après passage par l'estomac. De plus, elle a été identifiée comme l'une des principales sources d'allergie chez les nourrissons et est considérée comme la fraction protéique la plus allergénique des protéines du lait de vache (Lozano-Ojalvo et al., 2017; Quintieri et al., 2017) ce qui limite l'utilisation du lait de vache dans les préparations infantiles (Lucena et al., 2006).

1.2.2. α -Lactalbumine (α -La)

L' α -La est la deuxième protéine la plus répandue dans le lactosérum, et présente environ 2% des protéines totales du lait et environ 13 à 20% des protéines totales du lactosérum (Kilara & Vaghela, 2018; Sharma, 2019).

C'est une petite protéine globulaire, sa séquence primaire est constituée de 123 acides aminés pour une masse moléculaire de 14,146 kDa. La molécule renferme quatre liaisons disulfure et aucun groupe phosphate (Kilara & Vaghela, 2018; Yadav et al., 2015). Ces liaisons sont situées entre les cystéines Cys6-Cys120, Cys28-Cys111, Cys61-Cys77 et Cys73-Cys91 (Brew & Grobler, 1992). Elle comprend 14% de feuillet β , 26% d'hélice α et 60% de structure non organisée. Cette protéine existe habituellement sous forme de monomère (Fox, 1989). Sa structure est présentée dans la figure 4.

La protéine native est dénaturée à une température de 65,2 °C et pH = 6,7 mais si le milieu est refroidi, il y a une renaturation de 80 à 90 % de la protéine (Morr & Ha, 1993).

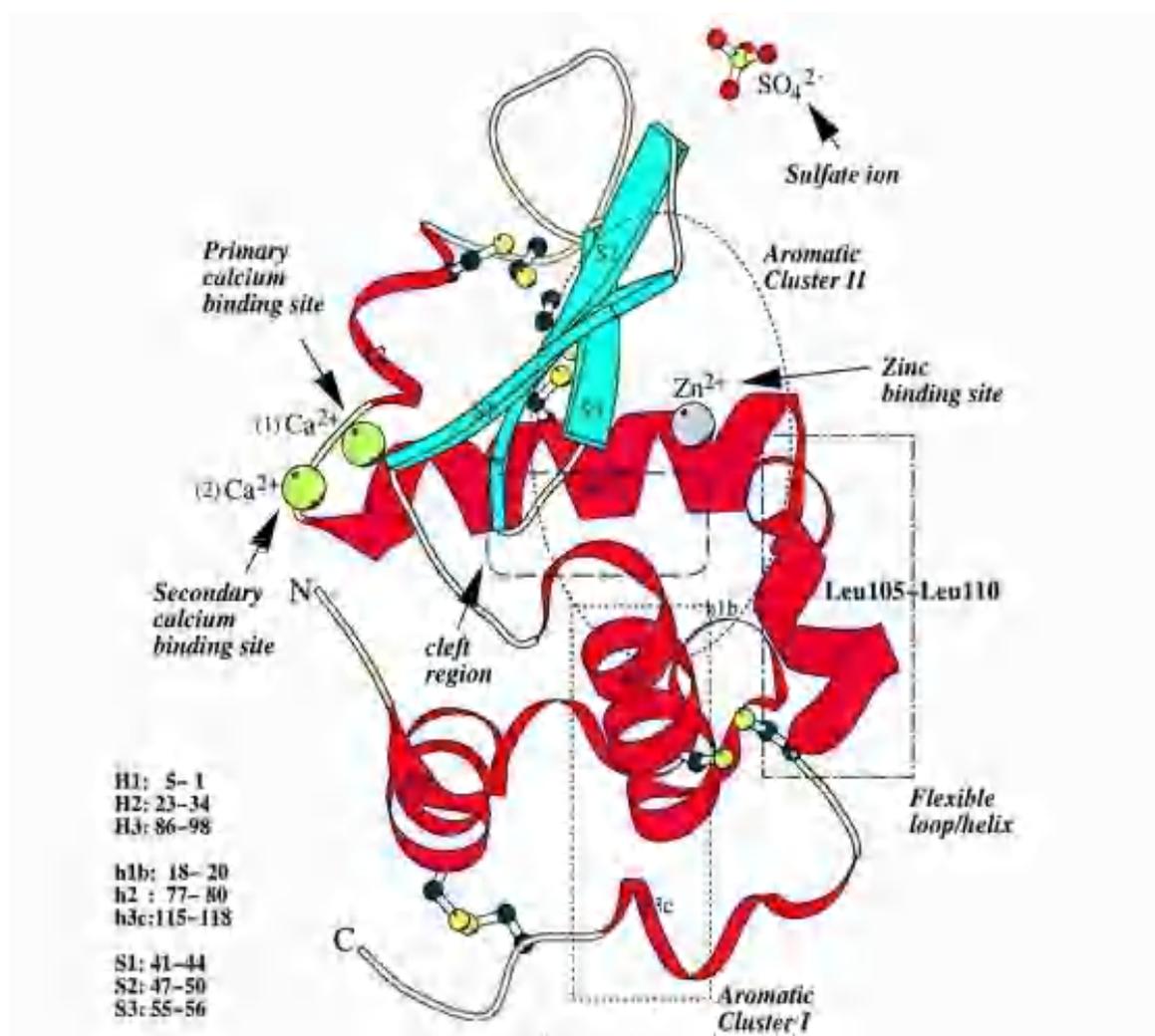


Figure 4: Structure tridimensionnelle de la forme native de l' α -La (en présence d'ions Ca^{2+}) à pH 8 (Chrysin et al., 2000)

L' α -La est thermostable en présence du calcium car elle présente une forte affinité pour les ions de calcium (Chatterton et al., 2006). Elle a une température de dénaturation inférieure à 55 °C après dissociation du Ca^{2+} (Guyomarc'h et al., 2015). α -La utilise le calcium pour former des liaisons intramoléculaires ioniques qui tendent à rendre la molécule résistante au dépliage thermique. Dans des conditions favorables de calcium et de pH, l' α -La peut rester soluble après une exposition à 100 °C (Kilara & Vaghela, 2018). Selon Buggy et al. (2017), dans des conditions neutres, lorsqu'elle est chauffée à des températures supérieures à 60 °C, la protéine tend à se dérouler.

Le site de synthèse de l' α -La comme la β -Lg est la glande mammaire. Elle présente 50% d'homologie avec le lysozyme (Kilara & Vaghela, 2018).

L' α -La est une protéine riche en acides aminés (Try et Cys) précurseurs de sérotonine et du glutathion, respectivement (Chatterton et al., 2006). Elle aide à l'absorption des minéraux,

possède une activité antibactérienne, montre les effets immunomodulateurs et une activité antitumorale (Yadav et al., 2015). L' α -la agit comme co-enzyme pour la biosynthèse du lactose, une importante source d'énergie pour le nouveau-né (Kilara & Vaghela, 2018; Madureira et al., 2007).

L' α -La est utilisé commercialement dans les suppléments pour les préparations pour nourrissons, en raison de sa similarité de structure et de composition avec les protéines du lait humain (Huffman & Harper, 1999; Sharma, 2019; Tolkach & Kulozik, 2005) et d'autres usages alimentaires dus à sa teneur élevée en tryptophane (Trp) et sa très haute valeur nutritionnelle, 63% de ses acides aminés sont essentiels (Jost et al., 1999; Muller et al., 2003).

1.2.3. Albumine Sérique Bovine (BSA)

La BSA, isolée du lait, est identique à la molécule du sérum sanguin, elle n'est pas synthétisée dans la glande mammaire, mais apparaît plutôt dans le lait après une fuite passive de la circulation sanguine. Elle représente environ 5 à 6% des protéines du lactosérum (Kilara & Vaghela, 2018; Madureira et al., 2007). C'est une protéine globulaire constituée de 582 résidus d'acide aminé avec un poids moléculaire de 66,3 kDa. La BSA renferme 35 résidus de Cys dont 17 ponts disulfures et un groupement thiol libre (Yadav et al., 2015; Madureira et al., 2007).

La température de dénaturation de la BSA est de 64 °C, qui est presque semblable à celle de l' α -La (62 °C). Bien que la température à laquelle la BSA soit dénaturée est un peu plus élevée par rapport à celle de α -La, la BSA se précipite avant α -La en raison de la nature réversible de la précipitation de l' α -La (Yadav et al., 2015).

La BSA est un porteur des acides gras libres, elle se lie facilement aux composés aromatiques, aux acides gras libres et matières grasses et contribue donc aux propriétés émulsifiantes des protéines du lactosérum (Kilara & Vaghela, 2018). Elle possède aussi des propriétés antioxydantes intéressantes (Madureira et al., 2007).

1.2.4. Immunoglobulines (Igs)

Les immunoglobulines bovines (Igs) sont composées de quatre classes: IgG1, IgG2, IgA et IgM. Toutes ces molécules ont une structure de base similaire, ils sont composés de deux chaînes légères avec de poids moléculaire de 20 à 25 kDa et deux chaînes lourdes ayant des poids moléculaire de 50 à 70 kDa (Kilara & Vaghela, 2018). Dans le lait et le colostrum de

bovins, les IgG1 sont les plus importantes mais dans le lait maternel ce sont les IgA qui prédominent (Sharma, 2019).

Les Igs représentent environ 0,7 g/L des protéines du lactosérum, leur rôle principal est d'agglutiner les bactéries, neutraliser les toxines et d'inactiver les virus. Elle sont présentes dans le lait maternel, confèrent aux nouveau-nés « une immunité maternelle passive » qui aide leur système immunitaire (Madureira et al., 2007).

1.2.5. Lactoferrine

La lactoferrine, un membre de la famille des protéines de la transferrine, est l'une des plus abondantes glycoprotéines dans les laits humains et de ruminants. Le lait humain est riche en lactoferrine (1–2 mg/mL), alors que la concentration de lactoferrine dans le lait de ruminants est 10 à 100 fois plus faible que dans le lait maternel (de l'ordre de 0,02 à 0,2 mg/mL) (Parc et al., 2014).

La lactoferrine est une glycoprotéine monomère qui chélate le fer, et est constituée d'une seule chaîne polypeptidique d'environ 700 acides aminés avec un poids moléculaire de 76,5 kDa (Madureira et al., 2007; Yadav et al., 2015b). Son point isoélectrique est très élevé, de 9,5 et 10 pour le variant A et B respectivement. La lactoferrine est stable à la chaleur et résistante à l'acide à pH 4. Elle est également résistante à l'action de la trypsine et chymotrypsine mais peut être hydrolysée partiellement avec la pepsine (Yadav et al., 2015b).

La lactoferrine est connue pour son activité antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoire et immunitaires (Matsumiya et al., 2017; Moscovici et al., 2014; Parc et al., 2014; Smithers, 2008).

1.2.6. Glycomacropeptide et les protéose-peptones

La coagulation à l'aide de présure produit un fragment de molécule de k-caséine qui s'appelle glycomacropeptide (GMP) et ce peptide se retrouve dans le lactosérum doux à base de présure, et constitue environ 15 à 20% de la fraction protéique du lactosérum (Ryan Walsh, 2016; Sharma, 2019). Cette fraction a une composition, une activité biologique et une importance nutritionnelle uniques (El-Salam et al., 2009).

Les protéases-peptones sont la fraction de protéine du lait qui reste soluble lorsque le lait est chauffé à 95 °C pendant 20 min sous des conditions acides (pH 4,7) (Kilara & Vaghela, 2018).

1.3. Méthodes de récupération des protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum sont considérées comme une source de protéines de haute qualité car elles contiennent des niveaux élevés de tous les acides aminés essentiels et ont une valeur biologique 15% supérieure aux protéines d'œuf anciennes protéines de référence (Ryan & Walsh, 2016). C'est pourquoi leurs récupération et purifications, visant à obtenir des concentrés, se révèlent très utiles.

Il existe divers procédés pour réaliser la séparation des protéines du lactosérum: la précipitation sélective, l'ultrafiltration, la chromatographie d'échange d'ions, etc.

1.3.1. Précipitation sélective

Ce processus de séparation implique l'ajustement des propriétés physiques de la solution pour favoriser l'insolubilité. Les protéines sont généralement moins solubles à un pH proche du point isoélectrique (pHi) et dans des solutions à une faible force ionique, donc sont plus susceptibles de s'agréger dans ces conditions (Etzel, 2004; Yadav et al., 2015b).

Pearce (1983), a fait précipiter sélectivement l' α -La à un pH de 4,2 et a une température de 65 °C par dénaturation, agrégation puis précipitation. De même, selon Amundson et al. (1982), le lactosérum déminéralisé à pH 4,65 par électrodialyse forme un précipité de β -Lg par centrifugation, sans utilisation de la chaleur.

La précipitation sélective fractionne la solution d'alimentation en produisant une solution surnageante plus diluée et une solution de précipité plus concentrée (Etzel, 2004).

1.3.2. Filtration membranaire

La technologie membranaire, notamment l'**ultrafiltration (UF)**, a été utilisée dans l'industrie laitière pour produire des concentrés de protéines du lactosérum (CPL), car elle permet la concentration sélective des protéines par rapport aux autres composants (Baldasso et al., 2011). Ce procédé permet de préserver l'état natif et les propriétés originales des protéines du lactosérum; la limite de poids moléculaire typique pour ce procédé est de 10 kDa. La séparation des protéines du lactosérum par ultrafiltration est effectuée à des températures inférieures à 55 °C et à une pression d'entrée de 300 kPa, la taille des pores de la membrane étant comprise entre 200 et 250 nm (Ganju & Gogate, 2017). L'ultrafiltration permet d'obtenir des concentrés de protéines du lactosérum contenant des niveaux de protéines d'environ 35 à 80% (Ryan & Walsh, 2016).

La diafiltration est utilisée pour la production de concentré des protéines du lactosérum (CPL) à haute teneur en protéines (Baldasso et al., 2011). Elle permet d'atteindre une concentration protéinique supérieure à 80% (base sèche) (Lapointe-Vignola, 2002). Dans la méthode de **microfiltration**, le lactosérum est micro-filtré à l'aide d'une membrane appropriée (pores < 1µm) pour éliminer les agrégats lipidiques, protéiques et les débris microbiens (El-Salam et al., 2009).

1.3.3. Séparation chromatographique

Les méthodes chromatographiques de séparation sont dominantes pour le fractionnement, la séparation et la purification des protéines du lactosérum individuelles d'une grande pureté. Les méthodes chromatographiques, qui sont classés en fonction du mécanisme de séparation tel que: **chromatographie échangeuse d'ions** (dans laquelle la protéine polyvalente chargée se lie à l'ion chargé en sens inverse), **la chromatographie d'affinité** (une interaction spécifique se produit entre les protéines et les ligands immobilisés) et la **chromatographie par perméation de gel** ou **chromatographie d'exclusion de taille** (la séparation se fait en fonction de la taille des molécules de protéines) (Yadav et al., 2015). Les isolats des protéines du lactosérum (IPL) préparés par des échangeurs d'ions ont moins de contenu en glycomacropéptide (GMP) de caséine que celui préparé par microfiltration (El-Salam et al., 2009).

1.4. Poudres du lactosérum

Pour créer des poudres du lactosérum, le lactosérum est séché par atomisation, ceci permet de préserver la qualité du lactosérum pendant une plus longue période de temps et facilite son transport (Ryan & Walsh, 2016).

Le marché mondial des poudres laitières a connu deux transitions majeures au cours des dernières décennies, tout d'abord en intégrant les sciences et les technologies spécialement de séparation et de transformation et, deuxièmement, en raison de la demande croissante de la part des pays émergents. L'utilisation de techniques de séparation telles que la filtration membranaire (p. ex., microfiltration et ultrafiltration) a permis l'accès à une nouvelle gamme de produits secs à plus forte valeur ajoutée, y compris les concentrés et les isolats de certaines fractions des protéines du lactosérum (Norwood et al., 2019) et les hydrolysats des protéines du lactosérum (Ryan & Walsh, 2016). La valeur commerciale de concentré de protéine du lactosérum (CPL) est de 3 à 40 fois supérieure à celle de la poudre du lactosérum (Baldasso et al., 2011) (figure 5). Les produits de ces transformations sont :

- **Concentré de protéine du lactosérum (CPL):** contient environ 35 à 80% de protéines avec des poudres à faible, moyenne et haute teneur en protéines (Ryan & Walsh, 2016). Les étapes de base de la fabrication de ces produits sont les prétraitements du lactosérum, ultrafiltration/dia-filtration, la concentration par évaporation sous pression réduite et le séchage par pulvérisation (El-Salam et al., 2009).
- **Isolat de protéine du lactosérum (IPL) :** est un ingrédient riche en protéines (> 90% de protéines) qui peut être préparé par une combinaison d'ultrafiltration, diafiltration et microfiltration ou par chromatographie échangeuse d'ions (Jeewanthi et al., 2015; Mulcahy, 2017).
- **Hydrolysats de protéine du lactosérum (HPL):** sont des protéines du lactosérum partiellement hydrolysées, fabriquées dans le but de faciliter le métabolisme et améliorer les propriétés fonctionnelles. Les HPL ont une teneur en protéines de 70 à 80% et des propriétés antioxydantes (Ganju & Gogate, 2017). Les HPL sont largement utilisées dans l'industrie des préparations infantiles et dans le traitement nutritionnel des personnes incapables de digérer les protéines intactes, fournissant des besoins nutritionnels complets avec des avantages pour la santé (Kelly et al., 2016).
- **Fractions riches en β -Lg et en α -La:** une demande croissante d' α -La à utiliser dans les préparations alimentaires pour nourrissons a encouragé les transformateurs à fractionner les protéines du lactosérum. Plusieurs méthodes ont été développées pour séparer les deux principales protéines du lactosérum (β -Lg et l' α -La) en fractions relativement riches. Ces méthodes sont basées sur la solubilité différentielle à différents pH, températures et force ionique (El-Salam et al., 2009).
- **Fractions riche en glyco-macro peptide (GMP):** des méthodes d'ultrafiltration et de chromatographie sont utilisées pour séparer le GMP provenant d'autres protéines. Des produits GMP commerciaux presque purs sont maintenant disponibles (El-Salam et al., 2009). Le GMP est utilisé pour ses diverses propriétés biologique et fonctionnelles intéressante. Il présente de nombreuses fonctions physiologiques, notamment: la promotion de la croissance des bifido-bactéries, l'inhibition de l'adhésion bactérienne et virale, la réduction des caries dentaires, et certaines propriétés bioactives telles que la propriété anti-inflammatoire, la fixation des toxines, et en tant que source d'acide aminé pour les personnes souffrant de phénylcétonurie (incapable de digérer la phénylalanine

(Phe)) car il ne contient ni Phe, ni Trp, ni tyrosine (Tyr), et riche en acide aminé à chaîne ramifiée (la leucine (Leu), l'isoleucine (Ile) et la valine (Val)) (Sharma, 2019).

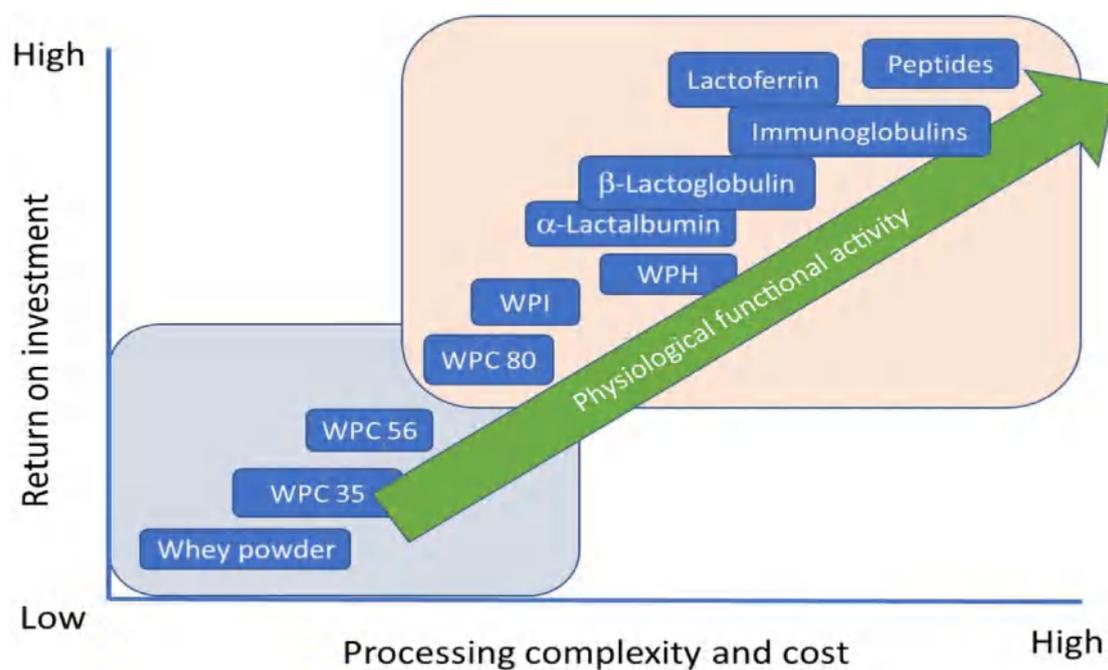


Figure 5: Gamme d'ingrédients à base de protéines du lactosérum ayant un potentiel commercial et des propriétés physiologiques fonctionnelles croissantes (Sharma, 2019). **WPC:** Protéine du lactosérum concentré (35% à 80% de protéines); **WPI:** Isolat de protéines du lactosérum (90 % de protéines); **WPH:** Hydrolysate de protéines du lactosérum (80% à 90% de protéines).

Chapitre 2

PROPRIÉTÉS FONCTIONNELLES DES HYDROLYSATS DES PROTÉINES DU LACTOSÉRUM

L'hydrolyse des protéines et le clivage des liaisons peptidiques, peuvent être réalisés par des processus enzymatiques ou chimiques. Les procédés chimiques, y compris l'hydrolyse alcaline ou acide, ont tendance à être difficiles à contrôler, et donnent des produits avec des acides aminés modifiés et des composés toxiques comme la lysinoalanine ou la lanthionine (Tavano, 2013). Les enzymes sont préférables parce qu'elles sont généralement reconnues comme étant GRAS (Generally Recognized As Safe) (Cheison & Kulozik, 2015).

Les produits issus de l'hydrolyse des protéines présentent des propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et biologiques améliorées par rapport aux protéines originales en raison de leur plus petite taille et des réarrangements structuraux, qui peuvent causer l'exposition de certaines régions hydrophobes, initialement enterrées dans la molécule protéique (Ambrosi et al., 2016).

Les protéines du lactosérum sont une source des peptides bioactifs avec différentes propriétés biologiques dont les activités anti-hypertensive, antimicrobienne, antidiabétique et antioxydante (Kleekayai et al., 2020). La protéolyse des protéines du lactosérum peut également améliorer leurs propriétés technologiques, telles que la solubilité, la capacité d'émulsification, de moussage et de gélification (Gauthier & Pouliot, 2003; Jeewanthi et al., 2015), qui dépendent du degré d'hydrolyse (DH).

2.1. Enzymes protéolytiques

La demande mondiale d'enzymes, pour une large variété d'applications est importante. Les protéases ont des applications étendues dans les industries alimentaire, pharmaceutique, de détergents et de cuir. Elles sont également impliquées dans la gestion des déchets d'activités domestiques et industrielles (tableau 3) (Singh et al., 2016).

Tableau 3: Applications des protéases dans différents industries (Singh et al., 2016)

Industrie	Applications
Alimentaire	Amélioration de la digestibilité, de la solubilité, de la saveur, de la palatabilité et des propriétés viscoélastiques. récupération accrue de l'huile dans les fruits de mer, attendrissement de la viande, réduction de l'allergénicité
Détergent	Lavage amélioré
Synthèse de peptides	Synthèse peptidique énantiosélective.
Cuir	Traitement du cuir : Épilage, battage, tannage

Biorémédiation	Traitement des déchets
Produits pharmaceutiques	Anticancéreux, anti-inflammatoires, agents de coagulation
Autres	Dégommage de la soie

Selon leur origine, les enzymes protéolytiques sont classées en trois groupes : animales, végétales et microbiennes.

2.1.1. Enzymes protéolytique d'origine animale

Très peu de protéases économiquement conséquentes sont issues d'espèces animales. Les pepsines, la trypsine pancréatique, la chymotrypsine, et la rennine sont les protéases animales qui jouent un rôle fondamental dans le processus digestif. Ces protéases sont isolées en grande quantité en fonction de la disponibilité du bétail pour l'abattage et préparées sous forme plus ou moins pures (Gurumallesh et al., 2019; Abrar, 2017). Parmi ces protéases, nous citerons les plus utilisées et les plus commercialisées :

Pepsine: c'est une endo-protéase à acide aspartique, sécrétée au niveau de l'estomac, elle hydrolyse les liaisons des protéines et des peptides impliquant les acides aminés aromatiques (Phe et Tyr) en C-terminal et en position hydrophobe (Leu, Ala, Glu et Gln) (Dunn, 2002). La pepsine est une protéase acide largement utilisée dans l'hydrolyse des protéines, elle est utilisée dans l'extraction du collagène, de la gélatine, comme substitut de la présure et dans les thérapies de digestibilité (Zhao et al., 2011). La pepsine existe dans l'estomac de presque tous les vertébrés. La pepsine bovine (EC 3.4.23.1) de poids moléculaire de 33,4 kDa est extraite à partir des caillottes des veaux sevrés (Reddy et al., 1988), alors que la pepsine porcine (E.C.3.23.2) extraite de l'estomac du porc adulte présente un poids moléculaire de 35 kDa (Kageyama & Takahashi, 1976).

La présure animale (sources veau, bovine et porcine) est composée de pepsine et de chymosine couramment mélangées et utilisées dans la fabrication commerciale du fromage. Toutefois, leur coût élevé a obligé l'industrie à trouver de nouveaux substituts (Zhao et al., 2011).

La pepsine du poulet est une enzyme extraite à partir des proventricules du poulet (*Gallus gallus*) sous-produit d'abattage. La pepsine purifiée présente un poids moléculaire de 35 kDa avec 308 résidus d'acide aminé (Green & Llewellyn, 1973). L'optimum de son activité catalytique est entre pH 1,5 et 4,5 avec un pH optimum de 2,8 sur l'hémoglobine. Elle est active à 90% à pH 1,5 et elle perd son activité avec l'augmentation du pH pour atteindre 35%

de son activité maximale à pH 4,5 et reste stable jusqu'à pH 8 et devient inactive à pH 8,5 (Bohak, 1969). Elle est utilisée généralement dans l'industrie de la production de fromage. Selon Green et al. (1984) un mélange de pepsine du poulet et de pepsine de porc est utilisé pour fabriquer du fromage Cheddar. Páez et al. (1995) utilisée dans la production de fromage pasteurisé.

Les pepsines de diverses espèces, y compris les mammifères et les oiseaux n'ont pas les mêmes propriétés enzymatiques. La pepsine du poulet est moins sensible aux changements de pH que la pepsine de porc (Crévieu-Gabriel et al., 1999).

Les viscères de poissons sont connus aussi pour être une source riche en enzymes digestives (Reece, 1988). Plusieurs pepsines de poissons, tels que la sardine (Noda & Murakami, 1981) et le Capelin (Guérard, 1985) ont été extraites et caractérisées. La pepsine de poisson est principalement présente dans l'estomac, elle a un pH optimal de 2-4, une stabilité distincte pour des $\text{pH} \leq 6$, une température optimale de 30 à 55 °C et une stabilité thermique spécifique $\leq 40-50$ °C. Ces pepsines ont plusieurs applications industrielles, notamment l'extraction du collagène, la fabrication du fromage, l'ensilage du poisson, le traitement du poisson et la recherche médicale (Zhao et al., 2011)

Trypsine: c'est une protéase à sérine (EC 3.4.21.4) avec une spécificité étroite qui ne fait qu'hydrolyser les liaisons peptidiques impliquant le groupe carboxylique de la lysine (Lys) et des résidus arginine (Arg) (de Castro et al., 2015). Cette enzyme protéolytique dont le précurseur inactif, le trypsinogène, est formé dans les cellules exocrines du pancréas, et est sécrété dans la lumière de l'intestin (Rick, 1974).

La trypsine d'origine bovine et porcine a un poids moléculaire de 23,3 kDa et fonctionne de manière optimale à 37 °C et un pH d'action de 7-9. Elle est largement utilisée dans un laboratoire de culture tissulaire pour le processus de récolte des cellules. En outre, la trypsine est utilisée dans les industries médicinales et alimentaires (Gurumallesh et al., 2019).

Chymotrypsine: c'est une endoprotéase, sécrétée par le pancréas sous forme de chymotrypsinogène, et est convertie en chymotrypsine sous l'action de la trypsine (Frey et al., 1994). Elle a un poids moléculaire de 25 kDa, et coupe préférentiellement les liaisons peptidiques du côté C-terminal auxquelles participe les acides aminés aromatiques (Trp, Tyr, Phe et Leu) (Alais et al., 2003). La chymotrypsine permet la désallergénisation partielle des protéines du lait (Gurumallesh et al., 2019). Elle peut être utilisée dans la fabrication du fromage pour coaguler les protéines du lait (Singhania et al., 2017).

2.1.2. Enzymes d'origine végétale

Les protéases issues d'un certain nombre de plantes dont la figue (*Ficus carica*), le cardon (*Cynara cardunculus L.*), la papaye (*Carica papaya*), l'ananas (*Ananas sativa*) et les graines de ricin (*Ricinus communis*) présentent une activité protéolytique et la capacité de coaguler le lait. Cependant, leur application dans la fabrication de fromage à partir du lait de vache est limitée en raison de leur nature protéolytique excessive (Abadía-García et al., 2016; Low et al., 2006; Shah et al., 2014) ce qui constitue une alternative intéressante pour leur utilisation dans l'hydrolyse enzymatique pour la production des peptides bioactifs (Abadía-García et al., 2016). Parmi ces protéases :

Bromélaïne: c'est un extrait brut de l'ananas qui appartient à un groupe d'enzymes digérant les protéines, obtenues commercialement à partir du fruit (EC.3.4.22.33) ou de la tige (EC.3.4.22.32) de l'ananas et qui sont préparées différemment. Leur composition enzymatique est différente. La bromélaïne fait référence à la "bromélaïne de la tige", qui est un mélange de différentes endopeptidases thiolées et d'autres composants comme la phosphatase, glucosidase, peroxydase et cellulase. La bromélaïne est active sur un large spectre de pH de 5,5 à 8 sur les caséines et la gélatine (Pavan et al., 2012) avec une température optimale de 70 °C (Gurumallesh et al., 2019). La bromélaïne a également été utilisée pour obtenir de la farine de froment hypoallergénique, en raison de sa capacité à dégrader la gluténine du blé (Tanabe et al., 1996).

Papaïne: c'est une endopeptidase (EC 3.4.22.2) à cystéine extraite du latex de *Carica papaya* avec un poids moléculaire de 23,4 kDa. Elle hydrolyse spécifiquement les liaisons impliquant l'Arg, Lys et Phe (de Castro et al., 2015). La papaïne a une spécificité plus large vis-à-vis des substrats en raison de la présence de nombreuses isoenzymes. Elle est active à un pH de 5 à 9 et est stable jusqu'à 80 °C (Gurumallesh et al., 2019).

La papaïne joue un rôle clé dans les processus biologiques variés et est largement utilisée dans l'industrie de l'attendrissement des viandes (Gurumallesh et al., 2019; Qian et al., 2013) de la conception de médicaments, etc. (Gurumallesh et al., 2019). Elle est également utilisée comme produits pharmaceutiques à base de gel (la papaïne présente des propriétés antifongiques, antibactériennes et anti-inflammatoires) (Ezekiel Amri, 2012).

Ficine: c'est une endopeptidase à cystéine non spécifique isolée du latex de différentes espèces de (*Ficus Carica*, *Ficus glabrata*, *Ficus Elastica*) (Grzonka et al., 2007). Elles ont un grand potentiel dans les industries alimentaires, biotechnologiques et pharmaceutiques en raison de leur propriété d'être actifs dans une large gamme de températures et de pH (González-

Rábade et al., 2011; Nouani et al., 2009; Shah et al., 2014). Leur mécanisme catalytique fait intervenir un groupe de cystéine dans le site actif essentiel à son activité (Devaraj et al., 2008; González-Rábade et al., 2011; Shah et al., 2014). Selon Devaraj et al. (2011, 2008), la ficine est une enzyme protéolytique reconnue comme une enzyme sulfhydrile, présente sous forme d'une seule chaîne polypeptidique avec un poids moléculaire de 23,1 kDa. La ficine est aussi utilisée pour la fabrication des fromages (Faccia et al., 2012) pour l'attendrissement de la viande (Grzonka et al., 2007; Payne, 2009), et la production des peptides bioactifs (Di Pierro et al., 2014; Hu et al., 2020; Tacias-Pascacio et al., 2020).

Cardosine: c'est une protéase à aspartate (EC 3.4.23), extraite à partir des stigmates et des stylets des fleurs séchées de *Cynara Cardunculus* L. (Lamas et al., 2001; Voss et al., 2019) présente sous forme de mixture de cardosine A et B (Barros and Malcata, 2006; Lamas et al., 2001; Ramalho-Santos et al., 1997). Les cardosines A et B ont des séquences d'acide aminé différentes mais ont tous les deux une activité protéolytique (Voss et al., 2019). La forme mature de chaque cardosine est constituée de deux polypeptides avec un poids moléculaire de 31 kDa et 15 kDa pour cardosine A, et 34 kDa et 14 kDa pour cardosine B (Barros and Malcata, 2006; Lamas et al., 2001; Zikiou and Zidoune, 2019). La cardosine est utilisée pour la production de certains fromages traditionnels au lait de brebis au Portugal et en Espagne (Liburdi et al., 2018) et a été proposée pour la production des peptides bioactifs (Glenise B. et al 2019).

2.1.3. Enzymes d'origine microbienne

Un grand nombre d'espèces bactériennes et fongiques est utilisé comme source de protéases acides neutres et alcalines. Une liste non exhaustive d'espèces bactérienne et fongique est présentée dans le tableau 4 (Singh et al., 2016).

Tableau 4: Microorganismes ayant une activité protéolytique (Singh et al., 2016)

Origine	Espèces
Bactérienne	<i>Bacillus clausii</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. sterothermophilus</i> , <i>B. mojavensis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. brevis</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. marmarensis</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. stratosphericus</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. Lentus</i> , <i>B. alcalophilus</i> , <i>B. amyloliquifaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. intermedius</i> , <i>B. thermoruber</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. cohnii</i> , <i>B. fastidiosus</i> , <i>B. pseudofirmus</i> , <i>B. pantotheneticus</i> , <i>B. aquimaris</i> , <i>B. proteolyticus</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. amovivorus</i> ,

B. flexus, *B. horikoshii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Aromonas hydrophila*, *Serratia liquefaciens*, *Flavobacterium balustinum*, *Exiguobacterium sp.*

Fongique *Aspergillus awamori*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. fumigates*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. ustus*, *Beauveria bassiana*, *B. feline*, *Botrytis cinérea*, *Clonostachys rosea*, *Conidiobolus coronatus*, *Cordyceps militaris*, *C. sinensis*, *Fusarium oxysporum*, *Graphium putredinis*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium camemberti*, *P. citrinum*, *P. restrictum*, *P. roqueforti*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizomucor sp.*, *Rhizopus SMC*, *R. oryzae*, *Thermoascus aurantiacus*, *T. aurantiacus*, *Thermomyces lanuginosus*, *T. lanuginosus*, *T. lanuginosus*, *Trichoderma harzianum*, *T. reesei*

Les protéases alcalines jouent un rôle important dans la production de la sauce soja et d'autres produits à base de soja. Les protéases alcalines tolérant les solvants organiques et provenant des espèces *Aspergillus et Bacillus* ont montré un potentiel prometteur pour la synthèse de peptides (Singh et al., 2016) et la productions des peptides bioactifs. Parmi ces enzymes l'alcalase, la neutrase et la flavouzyme.

Alcalase: est une endopeptidase (EC 3.4.21.62) à sérine, elle clive les protéines au milieu de la chaîne des acides aminés. Elle a été initialement obtenue à partir de *Bacillus subtilis* et appelée aussi subtiline. Aujourd'hui, cette enzyme est produite par une fermentation submergée en fed-batch en utilisant *Bacillus licheniformis*. Alcalase a été largement utilisé pour préparer des hydrolysats de protéines de soja, du lactosérum, de patate douce et de poisson pour l'obtention de peptides bioactifs (Tacias-Pascacio et al., 2020). L'alcalase, comme d'autres protéases alcalines, a d'abord été largement appliquée comme composant de produits de nettoyage, étant la première protéase détergente développée par Novozymes dans les années 1960. Par la suite, d'autres applications de l'alcalase ont été proposées, notamment comme auxiliaire dans le processus de dégommeage des fibres de soie ou dans d'autres processus de fabrication, comme la modification enzymatique de la surface des polyamides. L'alcalase a trouvé un large champ d'application dans la production et la modification des aliments (Tacias-Pascacio et al., 2020).

Neutrase: c'est une endopeptidase (EC.3.4.24.4) produite par *Bacillus amyloliquefaciens*. La plupart des protéases neutres appartiennent au genre *Bacillus et* ont une

thermotolérance relativement faible allant de pH 5 à 8. Elles génèrent moins d'amertume lors de l'hydrolyse des protéines alimentaire (Razzaq et al., 2019). La neutrase est incorporée dans l'industrie brassicole en raison de son insensibilité aux inhibiteurs de protéinase des plantes. Elle a une grande affinité vers les acides aminés hydrophobes (Razzaq et al., 2019).

Flavourzyme: c'est un mélange de protéases aux activités exo- et endo-peptidase, obtenu par la fermentation contrôlée d'*Aspergillus Oryzae* (Feng et al., 2014). La préparation enzymatique est largement et diversement utilisée pour l'hydrolyse des protéines dans des applications industrielles et de recherche (Merz et al., 2015). La flavourzyme a été utilisé pour produire des peptides antioxydants à partir de colza et aussi inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) à partir de germes de maïs, de protéines de lupin ou de plasma bovin (Merz et al., 2015).

2.2. Hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum et les enzymes utilisées

Plusieurs enzymes sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour produire des hydrolysats des protéines du lactosérum (HPL) avec diverses propriétés fonctionnelles et biologique.

Les protéines du lactosérum, en particulier la β -Lg présente une forte résistance à l'hydrolyse par la plupart des protéases (Barros & Malcata, 2006; Guo et al., 1995) en raison de sa structure globulaire compacte (Abadía-García et al., 2016; Guo et al., 1995).

Selon Embiriekah et al. (2018), le degré d'hydrolyse (DH) maximal obtenus par la trypsine et la pepsine est de 13,13% et 7,59% respectivement, ces DH ont été atteints à un rapport Enzyme:Substrat (E/S) de 2% durant 240 min. Kim et al. (2007) signalé qu'un DH de 11% a été obtenu en utilisant la pepsine pour un rapport E/S de 1% pendant 2h d'incubation. Tavares et al. (2012) ont rapporté que la β -Lg résiste à l'hydrolyse par la cardosine alors que l' α -La est hydrolysée à 87% après 7h d'incubation (E/S 1,6%). Dans un travail récent, Estévez et al. (2020) ont observé que la cardosine pouvait hydrolyser la β -Lg jusqu'à 40% après 24h. Le Maux et al. (2016) ont noté que la papaïne hydrolyse les protéines du lactosérum avec un DH de 4,93% pour un rapport E/S 2%. Selon Abadía-García et al. (2016), l'hydrolyse des protéines du lactosérum par la bromélaïne et la papaïne après un traitement par ultrason augmente le taux d'hydrolyse jusqu'à 9,42% et 12,05% respectivement. Peng et al. (2009) ont rapporté que l'hydrolyse des protéines du lactosérum par l'alcalase peut atteindre environ 36% pour un ratio E/S de 2% et 5h d'hydrolyse.

Les conditions d'hydrolyse (pH, température, force ionique, rapport E/S et temps) jouent un rôle important sur les propriétés des produits de l'hydrolyse et le degré d'hydrolyse final (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2017; Cheison & Kulozik, 2015).

Les enzymes hydrolysent les protéines à différents degrés en raison de la spécificité de la liaison enzyme-peptide (Adjonu et al., 2013). Cheison et al. (2011) ont rapporté que la trypsine hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques à l'extrémité C-terminale des résidus de Lys et d'Arg dans la β -Lg. L'alcalase a montré la plus faible spécificité pour la β -Lg (Brandelli et al., 2015). Selon Tavares et al. (2012), l'hydrolyse de α -La par la cardosine est importante, alors que celle de β -Lg reste marginale. Ceci peut être justifié par l'organisation stéréochimique de ces protéines, c'est-à-dire un noyau hydrophobe stable qui empêche les enzymes d'accéder aux liaisons peptidiques sensibles de la β -Lg. À l'inverse, l' α -La est une petite protéine globulaire compacte qui présente un encombrement stéréochimique négligeable. La spécificité d'une enzyme est un facteur clé qui influe sur le nombre et l'emplacement de liaisons peptidiques hydrolysées (Kilara & Vaghela, 2018) et détermine ainsi, le profil peptidique résultant et, par conséquent, les propriétés des hydrolysats (Kleekayai et al., 2020).

L'hydrolyse enzymatique des protéines confère aux hydrolysats des propriétés biologiques et fonctionnelles intéressantes. La solubilité, les propriétés émulsifiantes, organoleptiques et bioactives peuvent être améliorées considérablement (Cheison et al., 2007).

2.3. Effet de l'hydrolyse enzymatiques sur les propriétés techno-fonctionnelles

L'hydrolyse enzymatique perturbe la structure des protéines et réduit leur poids moléculaire, ceci améliore l'interaction des peptides entre eux-mêmes et avec leur environnement et, par conséquent, modifie leurs propriétés fonctionnelles (de Castro et al., 2015).

Le tableau 5 présente les changements de quelques propriétés techno-fonctionnelle tels que la solubilité et l'activité émulsifiante des protéines du lactosérum après l'hydrolyse par différents enzymes. Les conditions d'hydrolyse, le type d'enzyme, le mécanisme d'action, et le degré d'hydrolyse (DH) final sont responsables des propriétés fonctionnelles des hydrolysats produits.

Tableau 5: Changement des propriétés fonctionnelles selon le type d'enzyme et conditions d'hydrolyse des protéines du lactosérum (de castro et al., 2015)

Source des protéines	Enzymes	Mécanisme d'action	Conditions de l'hydrolyse	DH	Changement des propriétés fonctionnelles
Isolats des protéines du lactosérum (IPL)	Chymotrypsine	Endo-protéase	pH 7,8; T° 37°C Temps : 180 min	10,6%	Formation de nano-émulsions
	Pepsine		pH 2,6; T° 37 °C Temps: 180 min	11,0%	Pas de formation de nano-émulsions
Concentré des protéines du lactosérum (CPL)	Flavourzyme1 500L	Endo-protéase/ Exo-protéase	pH 5 ; T° 50°C Temps : 120 min	19,4%	Augmentation de la solubilité. Diminution de la stabilité à la chaleur et de -l'indice d'activité émulsifiante (IAE)
	Papain		pH 7 ; T° 37°C Temps : 24 h	13,32– 22,06%	Les hydrolysats traités par la papaine présentaient une plus grande solubilité, suivis par les hydrolysats de trypsine et de pancréatine.
	Pancréatine	Endo-protéase	pH 8 ; T° 37°C Temps : 24 h	9,42– 20,91%	Les propriétés émulsifiantes ont été améliorées
	Trypsine		pH 8 ; T° 37°C Temps : 24h	14,86– 20,68%	

2.3.1. Solubilité

La solubilité des protéines est liée à l'interaction hydrophobe de surface (protéines-protéines) et hydrophile (protéines-solvants). La solubilité est parmi les propriétés fonctionnelles de protéines du lactosérum les plus importantes en raison de son influence significative sur les autres propriétés fonctionnelles (pouvoir moussant, émulsifiant et gélifiant) (Nishanthi et al., 2018; Pelegrine & Gasparetto, 2005).

Un défi en technologie alimentaire est de maintenir la solubilité des protéines du lactosérum pendant les différents traitements technologiques spécialement les traitements thermiques et la modification du pH. La solubilité des protéines du lactosérum diminue à mesure que la température augmente et fini par dénaturer la protéine. La neutralisation des charges par le changement du pH provoquent l'agrégation des protéines près du point isoélectrique ce qui entraîne leur insolubilité (Pelegrine & Gomes, 2012).

La dégradation des protéines en peptides et en structures plus petites conduit à des produits plus solubles. L'hydrolyse des protéines du lactosérum peut être utilisée pour améliorer la solubilité dans une large gamme de pH (Jeewanthi et al., 2015). Il a également été signalé que les hydrolysats ont une excellente solubilité à des degrés d'hydrolyse (DH) élevés (Karami & Akbari-adergani, 2019).

Selon Chobert et al. (1988), la solubilité des hydrolysats des protéines du lactosérum (HPL) par la trypsine est plus grande que les protéines du lactosérum natives sur une large gamme de valeurs de pH. L'hydrolyse enzymatique avec la flavourzyme augmente la solubilité des protéines du lactosérum (de Castro & Sato, 2014). D'après (Severin & Xia, 2006), les changements de solubilité en fonction de degré d'hydrolyse (DH) étaient faibles pour des DH de 5 et 10% et devenaient plus notables pour des DH de 15 et 20%. Jeewanthi et al. (2015) ont constaté que la solubilité des HPL était plus élevée que celle des protéines du lactosérum non traités, et ils ont attribué cela à l'augmentation du nombre de groupes ionisés (NH_4^+ , COO^-) hydrophiles produits après hydrolyse enzymatique. Une diminution de la solubilité après hydrolyse enzymatique peut se produire lorsque la molécule de protéine expose davantage des groupes hydrophobiques (Jeewanthi et al., 2015). L'équilibre des forces hydrophiles et hydrophobes qui se produisent dans la structure des peptides est un autre facteur important (Karami & Akbari-adergani, 2019).

2.3.2. Propriétés émulsifiantes

Les émulsions sont définies comme une dispersion de deux ou plusieurs liquides non miscibles dans lesquels l'un des liquides est dispersé dans l'autre sous forme de petites gouttelettes (0,1-100 μm). Typiquement dans l'industrie alimentaire, les émulsions sont soit des émulsions d'huile dans l'eau (H/E), dans le cas du lait, crèmes, vinaigrettes, mayonnaises et soupes, ou mélanges eau-dans-huile (E/H), dans le cas de la margarine et du beurre (Lam & Nickerson, 2013).

Les protéines sont utilisées comme agents émulsifiants en raison de leurs propriétés amphiphiles, de leur capacité à se déplier et à se réorienter à l'interface (de Castro et al., 2015). Les concentrés des protéines du lactosérum sont utilisés pour améliorer l'émulsification dans les préparations pour nourrissons, les substituts de repas, les soupes et les jus de viande (Jeewanthi et al., 2015; Kilara & Vaghela, 2018). Les protéines du lactosérum sont moins tensio-actives que les caséines, principalement en raison de leur structure globulaire, par conséquent, leur capacité à stabiliser les émulsions et les mousses est faible, ce qui limite leur utilisation comme ingrédients alimentaires. Cependant, l'hydrolyse enzymatique est utilisée pour améliorer les propriétés de surface des protéines du lactosérum parce que les peptides produits par la protéolyse sont plus petits, ont moins de structure secondaire que les protéines natives et ont un comportement différent aux interfaces huile-eau ou air-eau (Gauthier & Pouliot, 2003).

Selon Severin & Xia (2006), les hydrolysats des protéines du lactosérum (HPL) produits par l'alcalase à un degré d'hydrolyse (DH) de 5% ont une capacité émulsifiante améliorée par rapport à la protéine intacte. Une autre étude menée avec Gauthier & Pouliot (2003) a rapporté que l'augmentation du DH de 27% à 35% conduit à une forte diminution de la capacité émulsifiante. Une hydrolyse poussée peut produire de grandes quantités des acides aminés libres et des peptides à courte chaîne ce qui diminuent les propriétés émulsifiantes des protéines (de Castro et al., 2015). de Castro et al. (2015); Gauthier & Pouliot (2003) ont signalé qu'il faut une longueur de chaîne des peptides supérieure à 20 acides aminés pour avoir de bonnes propriétés émulsifiantes. Les peptides à chaîne longue et poids moléculaire supérieur à 5 kDa ont montré une adsorption préférentielle aux interfaces par rapport aux petits fragments de peptides à un poids moléculaire inférieur à 5 kDa qui forment un film interfaciale faible, ce qui conduit à des émulsions instables (Schröder et al., 2017).

2.3.3. Propriétés moussantes

Les mousses sont le résultat du comportement des protéines aux interfaces air-eau, la diffusion rapide des molécules à l'interface, suivie d'un réarrangement moléculaire, permet à ces films d'emprisonner l'air (Kilara & Vaghela, 2018). Les protéines stabilisent les mousses en s'adsorbant fortement aux interfaces air-eau, formant des couches viscoélastiques adsorbées et conduisant à un réseau de protéines à haute viscosité (Rullier et al., 2010).

Pour avoir une bonne mousse, la protéine doit être capable de faire une migration rapide à l'interface air-eau, se déplier et se réorganiser à l'interface. L'adsorption des protéines à l'interface air-eau est influencée par la charge nette des protéines. Par conséquent, la propriété de moussage est améliorée avec l'augmentation de la charge nette (Cho et al., 2014).

Foegeding et al. (2002) ont constaté que l'hydrolyse enzymatique limitée s'est avérée efficace pour améliorer les propriétés interfaciales des hydrolysats des protéines du lactosérum (HPL). Les propriétés moussantes sont corrélées avec le taux des acides aminés hydrophobes qui sont exposés à la surface de la molécule de protéine (Lieske & Konrad, 1996). Van der Ven et al. (2002) ont rapporté que des fractions avec un poids moléculaire inférieur à 7 kDa a présenté une plus grande stabilité de la mousse. Embiriekah et al. (2018) ont trouvé que l'activité moussante des protéines du lactosérum est augmentée significativement après l'hydrolyse par trypsine et la pepsine. Pein et al. (2018) ont constaté que les hydrolysats de β -Lg traités par la pepsine présente une activité moussante plus élevée que par la trypsine et l'alcalase.

2.4. Effet de l'hydrolyse enzymatique sur les propriétés biologiques

Les protéines du lactosérum bien connus par leur haute valeur nutritionnelle et leurs propriétés fonctionnelles, ont suscité un intérêt accru pour leurs applications en tant qu'ingrédients fonctionnels dans les aliments. Il a été démontré que les peptides des protéines du lactosérum exercent une action antioxydante, anti-hypertensive, antimicrobiennes, immunomodulatrices et anticancéreuses (Alvarado Pérez et al., 2018; Esmailpour et al., 2017; Mann et al., 2015). L'activité de ces peptides est basée sur la séquence et la composition en acides aminés. La taille des séquences actives peut varier de 2 à 20 résidus d'acides aminés, et de nombreux peptides sont connus pour posséder des propriétés multifonctionnelles (tableau 6) (Mann et al., 2019).

Tableau 6: Peptides à activité antioxydante, antihypertensive et antimicrobienne issus des protéines du lactosérum (Mann et al., 2019)

Séquence peptidique	Fragment de la protéine mère
Peptides antioxydants	
INYW	α -La f(101-104)
LDQW	α -La f(115-118)
VGINYWLAHK	α -La f(99-108)
VLVLDTDYK	β -Lg f(92-100)
IDALNEK	β -Lg f(84-91)
KTKIPAVF	β -Lg f(75-82)
WYSLAMAASDI	β -Lg f(19-29)
YVEEL	β -Lg f(42-46)
MHIRL	β -Lg f(145-149)
VLDTDYK	β -Lg f(94-100)
VRTPEVDDE	β -Lg f(123-131)
LQKW	β -Lg f(58-61)
LDTDYKK	β -Lg f(95-101)
FNPTQ	β -Lg f(151-155)
VAGTWY	β -Lg f(15-20)
WYSL β -Lg f	β -Lg f(19-22)
Peptides antihypertensifs	
IIAEK	β -Lg f(71-75)
IPAVFK	β -Lg f(78-83)
ALPMHIR	β -Lg f(142-148)
CMENSA	β -Lg f(106-111)
VLDTDYK	β -Lg f(94-100)
VAGTW	β -Lg f(15-19)
VFK	β -Lg f(81-83)
LAMA	β -Lg f(22-25)
LDAQSAPLR	β -Lg f(32-40)
VGINYWLAHK	α -La f(99-108)
YGL	α -La f(50-52)
Peptides antimicrobiens	
IDALNENK	β -Lg f(84-91)
TPEVDDEALEK	β -Lg f(125-135)
VAGTWY	β -Lg f(15-20)
AASDISLLDAQSAPLR	β -Lg f(25-40)
VLVLDTDYK	β -Lg f(92-100)
IPAVFK	β -Lg f(78-83)
EQLTK	α -La f(1-5)
GYGGVSLPEWVCTTF/ ALCSEK	α -La f(17-31)S-S(109-114)
CKDDQNP/ISCDKF	α -La f(61-68)S-S(75-80)

2.4.1. Activité antioxydante

La capacité des peptides à interagir avec les espèces radicalaires ou à inhiber les réactions oxydatives est importante pour l'organisme afin de prévenir un certain nombre de

maladies liées à l'âge et des troubles neurodégénératifs causés par le stress oxydatif. Dans les aliments, les réactions oxydatives peuvent raccourcir la durée de conservation en détériorant la qualité des aliments et en altérant les aspects sensoriels et nutritionnels. Ainsi, la possibilité d'utiliser un antioxydant naturel provenant d'une source alimentaire peut être intéressante et peut même remplacer des composés synthétiques qui peuvent être nocifs (Rosa et al., 2018).

Les propriétés antioxydantes des hydrolysats de protéines laitières ont été signalés comme présentant de nombreuses fonctions, notamment le piégeage des radicaux libres, le don d'hydrogène et d'électrons, la chélation des ions métalliques, la décomposition des peroxydes et l'inhibition de l'oxydation des lipides (Kleekayai et al., 2020). Salami et al. (2010) ont rapporté que l'hydrolyse limitée améliore la capacité antioxydante des protéines du lactosérum bovines et camelines lors de l'hydrolyse avec la pepsine, la chymotrypsine et la thermolysine. Selon Athira et al. (2015); Mann et al. (2015), l'activité antioxydante *in vitro* des hydrolysats protéines du lactosérum (HPL) préparés à l'aide de l'alcalase a été plus élevée (1,18 μmol de Trolox/mg de protéine) par rapport au protéines non hydrolysé (0,19 μmol de Trolox/mg de protéine). Aussi, Mann et al. (2015) ont rapporté que l'activité antioxydante des hydrolysats des protéines du lactosérum préparés par flavourzyme ($0,81 \pm 0,04$), alcalase ($1,16 \pm 0,05$), et carolase ($1,42 \pm 0,12$) était plus importante que les protéines du lactosérum native ($0,19 \pm 0,01$) (μmol de Trolox/mg de protéine). Adjonu et al. (2013) ont constaté que les isolats des protéines du lactosérum (IPL) hydrolysé par trypsine, pepsine et chymotrypsine à un ratio E/S (1:40) après 24h ont une activité antioxydante de 0,30, 0,28 et 0,31 μmol Trolox/mg de protéines respectivement, alors que IPL non hydrolysés présentent une valeur de 0,08 μmol TE/mg protéine. Hernández-Ledesma et al. (2005) ont constaté que la combinaison de pepsine, de trypsine et de chymotrypsine s'est révélée la plus efficace dans les cas de la production d'hydrolysats de β -Lg, ayant l'activité antioxydante la plus importante.

Agyei et al. (2016) ont souligné que les propriétés hydrophobes et les groupes sulfhydriles confèrent des propriétés antioxydantes. Mann et al. (2019) ont signalé que les propriétés antioxydantes des peptides sont reliées à leur composition, structure et hydrophobicités. La Tyr, Trp, Met, Lys, Cys, et His sont des acides aminés avec une activité antioxydante avérée. Les acides aminés avec des résidus aromatiques contribuent à l'activité antioxydante à cause de leur capacité à donner des protons aux radicaux déficients en électrons (Mann et al., 2019).

2.4.2. Activité antihypertensive

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA, kininase II, EC 3.4.15.1) est un carboxy dipeptidyl métallopeptidase. L'ECA est un facteur majeur de l'hypertension, en raison de son pouvoir d'hydrolyser l'angiotensine I en angiotensine II, qui est un puissant vasoconstricteur (Luo et al., 2014). Plusieurs études ont rapporté qu'un grand nombre de peptides isolés à partir d'hydrolysats de protéines du lait ont montré une activité antihypertensive (Ibrahim et al., 2017; Kananen et al., 2000; O'Keeffe et al., 2017).

Mann et al., (2019) ont rapporté que la β -Lg non hydrolysée présente une très faible activité inhibitrice de l'ECA, mais son hydrolyse (à l'aide de pepsine, trypsine, chymotrypsine et/ou d'autres protéases) a entraîné des niveaux élevés d'inhibition de l'ECA (73% à 90%). Van der Ven et al. (2002), ont trouvé que les hydrolysats des protéines du lactosérum avec un mélange d'enzymes pancréatiques a une activité antihypertensive (IC₅₀) entre 0,16 et 0,84 mg/mL. Des valeurs IC₅₀ allant de 316 à 354 μ mol/ L ont été déterminés à partir d'hydrolysat de lait de chèvre et ont également présenté un effet antihypertenseur chez des rats hypertendus (Alvarado Pérez et al., 2018)

La composition peptidique totale d'un hydrolysat détermine sa capacité d'inhibition de l'ECA et dépend de la spécificité de l'enzyme protéolytique et des conditions de traitement utilisées pour la production de l'hydrolysat (Van der Ven et al., 2002). L'inhibition de l'ECA par les hydrolysats semble être principalement causée par des peptides de faible poids moléculaire (1 kDa) (Mann et al., 2019). Cette activité est associée à des courts peptides < 8 acides aminés contenant de la proline (acide aminé cycliques) à l'extrémité C-terminale, aussi les structures des acides aminés ayant principalement des chaînes latérales hydrophobes, telles que la Tyr et la Phe et des chaînes latérales aliphatiques avec une branche (un atome de carbone central lié à trois atomes de carbone ou plus), comme la Gly, Leu, Ile et Val, sont également identifiées comme des inhibiteurs de l'ECA (Alvarado Pérez et al., 2018).

2.4.3. Activité antimicrobienne

Plusieurs peptides antimicrobiens ont été isolés dans les séquences des principales protéines du lactosérum bovine, à savoir l' α -La et la β -Lg ainsi que la lactoferrine et le lysozyme (Brandelli et al., 2015; Chatterton et al., 2006; Esmailpour et al., 2017). Pellegrini et al. (2001) ont montré que les peptides en position de 15-20, 25-40, 78-83 et 92-100 trouvés dans l'hydrolysat tryptique de β -Lg bovine inhibent la croissance de *Bacillus subtilis*. Pihlanto-

Leppälä et al. (1999) ont montré que les fractions d'hydrolysats de β -Lg et α -La obtenues à l'aide de membranes d'ultrafiltration de 10 kDa et de 1 kDa présentaient des propriétés bactériostatiques accrues à l'encontre de *E. coli JM103*.

Demers-Mathieu et al. (2013) ont trouvé que le perméat d'ultrafiltration de l'hydrolysats tryptique des protéines du lactosérum traité par nanofiltration ont été testé sur *Listeria*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Le rétentat à 20 mg/mL était le plus efficace en tant qu'inhibiteur; alors que *E. coli* était relativement résistante, l'effet sur *Listeria* et *S. aureus* était plus important à 20 mg/mL qu'à 10 mg/mL.

La différence de distribution de la charge nette, la taille, la séquence en acide aminé et la structure secondaire ainsi que l'amphipathicité pourrait être responsable du comportement différentiel des peptides antibactériens identifiés contre les bactéries (Mann et al., 2019).

2.4.4. Réduction de l'allergénicité

L'allergie au lait de vache est l'un des types d'allergie alimentaire les plus courants au cours de la petite enfance. Chez les nourrissons qui ont une allergie au lait de vache a été diagnostiquée ou qui présentent un risque élevé de développement de l'allergie, l'utilisation des préparations hypoallergéniques est fortement recommandée (Lozano-Ojalvo et al., 2017).

Les réactions allergiques au lait de vache sont favorisées par l'absorption rapide de protéines lactières incomplètement digérées. Cette digestion partielle peut s'expliquer par la faible acidité de l'appareil gastro-intestinal pendant la petite enfance, par le pouvoir tampon élevé du lait, le faible fonctionnement exocrine pancréatique et la forte résistance des protéines du lactosérum (Peñas et al., 2006).

Différents fragments (épitopes) des protéines majeurs du lactosérum (β -Lg et α -La) sont responsables de l'allergie au protéines du lait de vache. Ces épitopes conformationnels et linéaires sont largement répandus dans les protéines du lactosérum. Les épitopes sont régulièrement dispersés sur les 162 résidus des acides aminés de la molécule de la β -Lg. Certaines d'entre elles sont de courtes séquences linéaires, tandis que d'autres sont de grands fragments constituant 6 épitopes conformationnels. L' α -La a également été identifié comme l'un des principaux allergènes du lait de vache (Golkar et al., 2018). La répartition des épitopes sur les deux protéines est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7: Epitopes de β -Lg et α -La (Golkar et al., 2018)

Protéines	Fragments	
β-Lg	f41-60; f102-124; f149-162	Allergènes Majeurs
	f1-16, f31-48; f47-60; f67-78; f75-86- et f127-144	Liaison IgE
	f49-60, f119-128, f129-138, et f143-152	Liaison IgG
	f17-36, f72-86, f92-106, et f152-166 f58-77, f76-95, f121-140	Liaison IgB
α-La	f1-16, f13--26, f47--58, f93-102 f1-15, f6-20, f46-60, f71-85, et f101-115	Liaison IgE
	f7-18, f51-61, et f89-108	Liaison IgG
	f6-20, f21-35, f36-50, et f86-100	

Les épitopes séquentiels ont été proposés comme de bons marqueurs de l'allergie persistante aux protéines du lait et pourraient avoir une importance clinique particulière. Les peptides les mieux reconnus, par plus de 90% des patients, sont les fragments β -Lg (41-60), (102-124) et (149-162), chacun représentant 10 à 15% de l'immunoréactivité totale de β -Lg (Wal, 2004).

Les protéines du lactosérum sont généralement utilisées comme la meilleure source pour développer des lait et des préparations pour nourrissons (Duan et al., 2014). Ces protéines contiennent une quantité élevée de β -Lg, qui est un allergène major du lait de vache et absent du lait humain (Lozano-Ojalvo et al., 2017). Les réactions allergiques sont causées par la présence de séquences spécifiques des acides aminés (épitopes) dans la protéine native, comme celles identifiées dans la β -Lg. Ces séquences peuvent être hydrolysées en utilisant des protéases appropriées, et par conséquent, réduire l'antigénicité et l'allergénicité de ces protéines (Guadix et al., 2006).

La diminution de l'antigénicité de la β -Lg n'a été observée que lorsque la pepsine a été utilisée à un ratio E/S de 3% pendant 4h d'incubation. L'ultrafiltration des hydrolysats de la pepsine a permis de diminuer la réactivité des β -Lg (Quintieri et al., 2017). Le fractionnement des hydrolysats enzymatiques de protéines de lait est utilisé pour obtenir des préparations hypoallergéniques. Le fractionnement des hydrolysats de concentré des protéines du lactosérum et de β -Lg a montré que les fractions de 1000-5000 Da avait la plus faible antigénicité (Ratray et al., 2000).

Le tableau 8 résume les différents travaux qui ont été réalisés sur la réduction de l'allergénicité et l'antigénicité des protéines du lactosérum par hydrolyse enzymatique. Une large gamme d'enzymes a été utilisée, notamment des enzymes gastro-intestinales (pepsine,

trypsine et chymotrypsine) des enzymes végétales comme la papaïne et la bromélaïne et des enzymes microbiennes comme l'alcalase et la neutrase. En général, dans tous les cas, l'hydrolyse enzymatique réduit de façon variable l'antigénicité des protéines du lactosérum. Plusieurs facteurs ont été rapportés pour déterminer l'antigénicité des hydrolysats. Le type et la spécificité de l'enzyme, le rapport E/S, le pH, la température, le degré d'hydrolyse (DH) et le traitement supplémentaire avant ou pendant la réaction enzymatique sont les principaux facteurs influençant le taux de réduction de l'antigénicité des protéines du lait (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2019).

Tableau 8 : Synthèse des travaux sur la capacité de réduction de l'antigénicité et de l'allergénicité des protéines du lactosérum par l'hydrolyse enzymatique (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2019)

Enzyme	Substrat	Conditions d'hydrolyse	Reduction d'immunogénicité	Références
Alcalase, papaine	CPL	120 min (une étape) 100 min pour 1 ^{er} enzyme suivi avec 20 min pour 2 ^{ème} enzyme (deux étapes). pH 8 à 50 °C	L'hydrolyse en deux étapes était plus efficace pour réduire l'antigénicité mais les épitopes allergènes étaient toujours présents	(Wróblewska et al., 2004)
Protéase de <i>Bacillus licheniformis</i>	CPL	Bioréacteur à membrane 50 °C et à pH 8,5. Cut off membrane de 3 kDa	Hydrolysats dont la longueur moyenne de la chaîne d'environ 4 AA Réduction de l'antigénicité de 99,97%	(Guadix et al., 2006).
Pepsine	β-Lg	E/S (1/20) pH 2,5-6,8 et 37 °C avec application de haute pression hydrostatique (HHP) (400 MPa) avant ou pendant l'hydrolyse.	Diminution de allergénicité	(Chicón et al., 2008)
Pepsine, trypsine et chymotrypsine	PL lyophilisé	Substrat soumis à HHP (100-300 MPa) avant ou pendant l'hydrolyse enzymatique à pH 4 pour la pepsine et 8 pour la trypsine et la chymotrypsine à 37°C	Réduction significative de la réactivité immunitaire des hydrolysats peptiques et tryptiques obtenus sous HHP.	(Peñas et al., 2006).
Combinaison de Trypsine, neutrase, papaine, protéase S	Lactosérum déminéralisé lyophilisé	E/S (1:100), pH 8 à 50 °C/180 min	Trypsine/papaine (1/1) et Trypsine/neutrase (1/1) a montré une réduction de 40% de l'antigénicité	(Shin et al., 2007)

Pepsine et trypsine	CPL Natif et chauffé (100 °C /10 min)	E/S (0,1, 0,5 et 1%) pepsine à pH 2 et à 50 °C, suivi de la trypsine à pH 8 et 50 °C/120 min	CPL chauffé a montré une antigénicité plus faible que celle du CPL native à tous les niveaux enzymatiques. Le traitement séquentiel avec le rapport E/S le plus élevé de pepsine suivie de la trypsine a entraîné la plus forte réduction de l'antigénicité.	(Kim et al., 2007)
----------------------------	---------------------------------------	--	--	--------------------

CPL: concentré protéines du lactosérum, PL : protéines du lactosérum.

Chapitre 3 :

**EFFET DES TRAITEMENTS
PHYSIQUES SUR LA STRUCTURE ET
LES PROPRIÉTÉS TECHNO-
FONCTIONNELLES DES PROTÉINES
DU LACTOSÉRUM**

Les protéines du lactosérum représentent environ 20% des protéines totales du lait bovin. Ces protéines présentent des caractéristiques fonctionnelles intéressantes, telles que la capacité de moussage, les propriétés émulsifiantes, la capacité de rétention d'eau et la gélification (Ghanimah, 2018). Les protéines du lactosérum sont utilisées dans les boissons pour sportifs, les substituts de viande, les produits de boulangerie, les viandes transformées, les sauces pour salade, les glaces, les crèmes à café artificielles, les soupes et divers produits laitiers (Dissanayake & Vasiljevic, 2009).

Généralement, la fonctionnalité des protéines du lactosérum est dû principalement à leurs protéines globulaires la β -Lg et l' α -La (Bouaouina et al., 2006; Shen et al., 2016). La β -Lg est une protéine amphiphilique qui a la capacité de s'adsorber à la surface air-eau, et eau-huile, elle se déploie partiellement par les interactions hydrophobes ou bien par les ponts S-S à l'interface et forme des associations intermoléculaires. L' α -La présente également de bonnes propriétés émulsifiantes et stabilisantes (Bouaouina et al., 2006).

Afin d'améliorer la fonctionnalité des protéines du lactosérum et éviter les effets négatifs induits par les traitements technologiques, différents traitements physiques sont utilisés. Ces traitements physiques provoquent des changements de la structure des protéines et par conséquent des changements de leurs fonctionnalités.

3.1. Impact des traitements thermiques

Les traitements thermiques provoquent une altération significative des structures des protéines du lactosérum. Ces traitements modifient leurs propriétés physico-chimiques, notamment la solubilité dans l'eau, la capacité de rétention d'eau, les propriétés émulsifiantes, moussantes et gélifiantes (Jovanović et al., 2005).

Les protéines du lactosérum sont des protéines globulaires contenant la plupart des groupes hydrophobes et sulfhydryles (-SH) qui sont cachés à l'intérieur de la molécule. Le chauffage modifie la structure tridimensionnelle de la protéine, exposant les groupes internes (-SH) et hydrophobes qui favorisent la liaison intermoléculaire disulfure (S-S) et hydrophobe impliquant l'apparition des agrégats des protéines du lactosérum.

La plupart des changements induits par la chaleur des protéines du lactosérum sont effectués sur la β -Lg car c'est la protéine la plus abondante dans le lactosérum, et elle affecte les changements globaux dans les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum (El-Salam et al., 2009). Les changements de conformation, observés au-dessus de 60 °C pour l' α -

La et près de 80 et 140 °C pour la β -Lg, exercent toute fois des effets plus importants sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum (deWit & Klarenbeek, 1984).

Le traitement thermique a un effet très limité sur l'agrégation de l' α -La car aucun thiol libre n'est disponible sur cette protéine (Nunes & Tavares, 2019). Pour la β -Lg traitée thermiquement à des températures plus basses (67,5-78 °C), le dépliage était le changement structural déterminant, alors qu'à des températures plus élevées (supérieur à 78 °C), le processus d'agrégation devenait déterminant. Le processus d'agrégation de la β -Lg peut être divisé en trois étapes décrites comme l'initiation, la propagation et la terminaison. Pendant l'initiation, les dimères de β -Lg se divisent de manière réversible en monomère, puis les monomères actifs sont formés par une exposition irréversible du groupe -SH libre précédemment caché sur la structure β -Lg. Pendant la propagation, des agrégats sont construits par la formation de liaisons disulfure. En fin, pendant l'étape de terminaison, deux intermédiaires actifs réagissent pour former des agrégats plus grands sans groupe SH exposé et réactif (Nunes & Tavares, 2019).

Bien que la dénaturation à des températures inférieures à 60 °C soit généralement considérée comme réversible, le processus de dépliage expose les groupes réactifs de la chaîne latérale aminée, c'est à dire perte de la structure hélicoïdale (Nguyen et al., 2018; Quant et al., 2019) et que la solubilité et les propriétés moussantes des protéines du lactosérum sont affectées de manière réversible par ces traitements thermiques légers jusqu'à 60 °C (deWit & Klarenbeek, 1984). Les traitements à des températures supérieures à 60 °C sont considérés comme une dénaturation irréversible provoquant des changements de fonctionnalité irréversible (Pérez-Gago. & Krochta, 2002).

Selon Dissanayake & Vasiljevic, (2009), le traitement thermique diminue significativement la solubilité et les propriétés moussantes, alors qu'il augmente substantiellement l'indice d'activité émulsifiante (IAE). L'exposition prolongée à des températures supérieures à 60 °C peut affecter de manière irréversible la solubilité des protéines du lactosérum. L'exposition des groupes sulfhydryles et hydrophobes dues au dépliage diminue la stabilité des protéines et, par conséquent, leur solubilité (O'Loughlin et al., 2012). Sui et al. (2011) ont souligné que les isolats des protéines du lactosérum (IPL) réhydratés traités à 72 °C pendant 10 min et à 90 °C pendant 1 et 10 min ont montré une diminution substantielle des monomères α -La et β -Lg, indiquant leur agrégation, ceci n'a pas été observée pour des conditions douces (63 °C pendant 30 min et 72 °C pendant 15s). Phillips et al. (2006) ont rapporté que le traitement thermique des protéines du lactosérum à 80 °C pendant 10 min à pH 8 a permis d'améliorer 65% la stabilité de la mousse.

3.2. Impact des Hautes Pressions

Le traitement par la haute pression hydrostatique (HPH) a été initialement destiné à la conservation des aliments, mais il a été identifiée pour son potentiel à modifier les propriétés fonctionnelles des biopolymères alimentaires, en particulier les protéines (Krešić et al., 2008). Les traitements de HPH est la technologie non thermique la plus utilisée à l'échelle industrielle, notamment pour les processus d'inactivation microbienne en raison de son impact minimal sur les propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments (Carullo et al., 2020). La HPH peut induire le déroulement des protéines par l'affaiblissement ou la dissociation des interactions stabilisante de la structure protéique, telles que les interactions hydrophobes (Bamdad et al., 2017).

Selon Ambrosi et al. (2016), en dessous de 200 MPa, les effets de HPH sont généralement réversibles (dissociation des structures polymériques) tandis qu'au-dessus de 200 MPa, des effets irréversibles peuvent conduire à la dénaturation des protéines (dissociation des monomères). Des solutions des protéines du lactosérum ont été traitées par ultra-haute pression (jusqu'à 300 MPa), le traitement a permis de dissocier les grands agrégats de protéines conduisant au démasquage des groupes hydrophobes enfouis sans affecter la solubilité des protéines. Des interactions peuvent alors se produire entre ces groupes qui améliorent la viscoélasticité des interfaces air-eau et améliorent ainsi la stabilité de la mousse. Le traitement à des niveaux d'intensité de pression plus élevés réduit cette propriété fonctionnelle, ce qui peut être expliqué par l'effet néfaste du dépliage des protéines sur la stabilité de la mousse (Mirmoghtadaie et al., 2016).

Les traitements à haute pression se sont également avérés utiles pour améliorer les propriétés gélifiantes, émulsifiantes et moussantes des dispersions de protéines du lactosérum traitées à 500 MPa-20 min et 690 MPa-5 min (Baier et al., 2015; Lee et al., 2006). Galazka et al. (2006) ont constaté une diminution de l'efficacité émulsifiante des solutions de concentré des protéines du lactosérum (CPL) traitées à des pressions (jusqu'à 800 MPa).

3.3. Impact des Ultrason

L'ultrason est l'une des nouvelles techniques non thermiques pouvant modifier les propriétés fonctionnelles des protéines, et pourrait être utilisées pour plusieurs applications dans l'industrie alimentaire et laitière (Khatkar et al., 2018).

Selon Khatkar et al. (2018), l'utilisation de l'ultrason a permis d'augmenter la solubilité (de 72,22% à 79,21%) et la stabilité à la chaleur des protéines du lactosérum (environ 6 fois plus élevée que les protéines non traitées), ce qui signifie qu'après l'ultrasonication, les protéines du lactosérum peuvent supporter une température plus élevée pendant le traitement pour une durée plus longue. Jambrak et al. (2010) ont signalé que l'ultrason a augmenté la solubilité de α -La de manière significative à 20 kHz pendant 15 et 30 min, aussi, les capacités et les stabilités de la mousse ont été améliorées à 20 kHz et 40 kHz. Guzey & Weiss, (2001) ont rapporté également que le traitement par ultrasons à haute intensité améliore les propriétés émulsifiantes des isolats des protéines du lactosérum (IPL) et BSA. Arzeni et al. (2012); Shen et al. (2016) ont observé, une réduction significative de la taille des protéines du lactosérum, alors que l'hydrophobicité de la surface a été considérablement augmentée après le traitement à des ultrasons de haute intensité. Shen et al. (2016) ont rapporté une augmentation de la solubilité (de 74,95% à 89,70%), de l'index de l'activité émulsifiante (IAE) et de la stabilité émulsifiante après utilisation de l'ultrason.

Les traitements par ultrasons peuvent également modifier l'état d'hydratation des protéines en remplaçant les liaisons hydrogène intramoléculaires par des liaisons hydrogène eau-protéine, sans altérer fondamentalement leur structure secondaire (Nunes & Tavares, 2019). Les modifications structurelles de ces protéines induites par les traitements des ultrasons sont davantage corrélées à la rupture partielle des interactions hydrophobes intermoléculaires qu'à la formation de liaisons disulfures (Jambrak et al., 2014).

Nous pouvons observer que l'utilisation des ultrasons dans le traitement des aliments peut conduire à plusieurs avantages comme l'augmentation de la solubilité des protéines, la capacité de moussage, etc. Des inconvénients peuvent survenir lors de l'utilisation des ultrasons, ce qui peut conduire à un effet destructeur des ultrasons comme la dénaturation des protéines (Jambrak et al., 2008).

3.4. Impact de l'utilisation du champ électrique pulsé (CEP)

Le traitement par champ électrique pulsé (CEP) a été développé au cours de la dernière décennie comme une technologie alimentaire non thermique. Dans cette technologie, l'échantillon est placé dans une chambre de traitement confinée entre des électrodes où il est soumis à de courtes impulsions électriques de forte puissance (Mirmoghtadaie et al., 2016). Généralement, le CEP est une technologie qui offre l'avantage de conserver de nombreux

attributs de la qualité des aliments qui peuvent être perdus au cours d'un traitement thermique conventionnel (Nunes & Tavares, 2019). L'effet du CEP sur les propriétés fonctionnelles des protéines dépend fortement de l'intensité du traitement appliqué (Mirmoghtadaie et al., 2016). Les effets de traitement CEP sur la modification structurale et l'hydrophobie de surface pour les isolats des protéines du lactosérum (IPL) peuvent entraîner une augmentation de l'hydrophobie de la surface (Xiang et al., 2011), alors que Sui et al. (2011) ont rapporté que le traitement par CEP n'a pas modifié l'hydrophobicité superficielle, la teneur en groupes SH libres ou la structure primaire du IPL réhydraté. Mirmoghtadaie et al. (2016); Nunes & Tavares, (2019); Sui et al. (2011) ont signalé que l'effet des traitements CEP sur les propriétés moussantes des protéines du lactosérum n'ont pas été reporté; de plus, ils n'affectent apparemment pas les propriétés d'émulsification (stabilité de l'émulsion) des IPL réhydratés. Egalement, Mirmoghtadaie et al. (2016) ont rapporté qu'il n'existe aucun rapport sur l'effet du CEP sur les propriétés moussantes des protéines, mais on peut s'attendre à de tels effets en raison de l'augmentation du nombre de groupes hydrophobes exposés à la surface de la molécule de protéine, ce qui provoque peut-être l'amélioration des interactions protéine-air et, par conséquent, une activité et une stabilité de moussage accrues.

3.5. Détente instantané contrôlée (DIC)

La Détente instantanée contrôlée (DIC) est une technique qui consiste à réaliser une chute abrupte de la pression vers le vide (détente instantanée) amenant le produit à une pression relativement basse (généralement inférieure à 5 kPa) à la suite d'un traitement thermique (température de 60 °C à 180 °C) couplée à une pression élevée (de 0,1 à 1 MPa de vapeur d'eau) (Allaf & Vidal, 1989).

La figure 6 présente les étapes du traitement de la DIC, ce procédé consiste, en premier lieu, en une courte étape de chauffage (10-60 s) comprenant une injection de vapeur saturée sous haute pression (jusqu'à 1 MPa) appliquée au produit mis initialement sous vide. Le vide initial assure un contact rapide entre la vapeur et l'échantillon et améliore par conséquent le transfert de chaleur. Après la première étape de chauffage, la chute abrupte de la pression (0,5 MPa.s⁻¹) vers un vide (3-5 kPa) en seulement 10-60 ms entraîne une évaporation automatique de l'eau à l'intérieur du produit, ce qui produit une quantité de vapeur et une tension mécanique significative permettant au produit de se dilater. En outre, l'évaporation automatique d'eau assure un refroidissement rapide, ce qui empêche la dégradation thermique des composés sensibles et assure ainsi la haute qualité des produits traités. De plus, la contrainte d'extension

à l'intérieur du produit crée une nouvelle structure expansée et poreuse. Cette nouvelle structure augmente la surface spécifique et la diffusivité du transfert de masse ainsi que l'accessibilité de l'étalement du produit, améliorant ainsi le processus de séchage, l'extraction des solvants et de nombreuses autres propriétés fonctionnelles des aliments. Les coûts énergétiques peuvent également être réduits (Hamoud-Agha & Allaf, 2019).

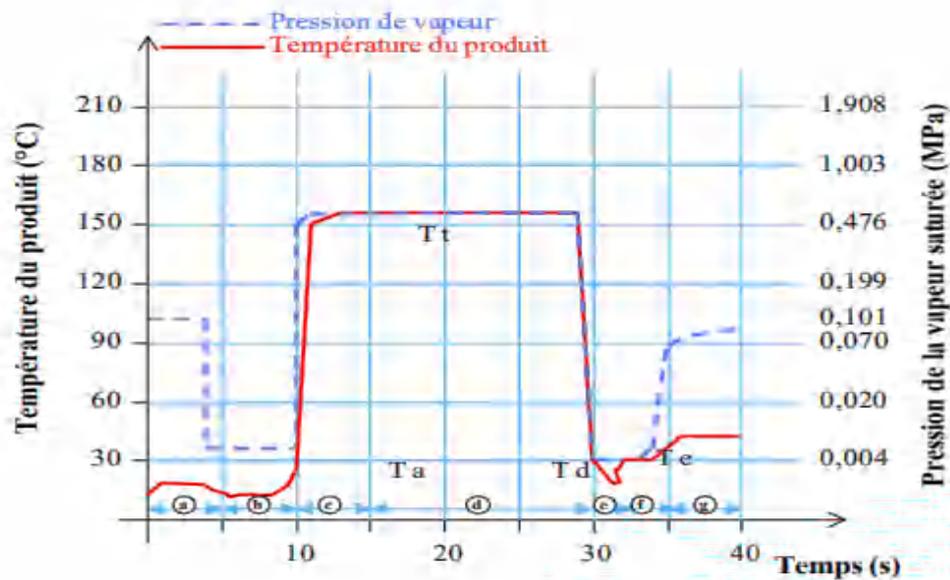


Figure 6: Étapes du traitement DIC (Allaf et al., 2012)

a: Pression atmosphérique, **b:** Vide initial, **c:** Injection de vapeur saturée, **d:** Maintien de la pression de vapeur saturée et température de traitement constante, **e:** Détente abrupte vers le vide, **f:** Maintien de vide, **g:** Retour à la pression atmosphérique. **Ta:** Température de l'air, **Td:** Température de détente, **Te:** température de l'échantillon, **Tt:** Température de traitement.

Boughelout (2015) a étudié l'impact du traitement par DIC sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum, ils ont trouvé qu'à des pressions supérieures à 0,4 MPa, il y'a une diminution de la solubilité et du pouvoir moussant, alors que le pouvoir émulsifiants ne semble pas être affecté par la DIC, ils ont noté une réduction de moins de 10 % seulement quel que soit les conditions de traitement.

Le traitement DIC peut modifier également les propriétés fonctionnelles d'autres protéines tels que le gluten de blé, où des études ont montré que la solubilité, la capacité d'émulsion et de moussage sont plus faibles pour des conditions de traitement DIC élevées (165 °C, 60 s) (Mahroug et al., 2020). Selon Mounir & Allaf (2017), les poudres de blanc et de jaune d'œuf texturées par DIC présentaient de meilleures propriétés fonctionnelles en termes de capacité d'absorption de l'eau (CAE), d'émulsion, de moussage et de stabilité que les poudres lyophilisées. Hamoud-Agha & Allaf (2019) ont également rapporté que les poudres à granulés

expansés produite par la DIC ont eu un comportement de réhydratation instantanée sans insérer d'étapes d'agglomération.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Démarche générale de la thèse

Le présent travail vise à étudier l'impact de la protéolyse et du traitement par la DIC sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum afin de proposer des ingrédients à hautes valeurs ajoutées utilisés pour les produits alimentaires spéciaux (laits infantiles, produits de diversification pour bébé, aliments spéciaux pour sportifs etc.).

Pour atteindre ces objectifs, nous avons divisé ce travail en deux parties. La première partie vise à étudier l'impact de l'hydrolyse des protéines du lactosérum par des enzymes d'origine végétale (ficine) et animale (pepsine du poulet) afin d'améliorer les propriétés biologiques et les propriétés techno-fonctionnelles de ces protéines. Le choix a été porté sur ces deux enzymes car elles sont dotées d'un pouvoir protéolytique marqué, disponibles et sont pas ou très peu valorisées en technologie alimentaire jusqu'à présent.

La deuxième partie vise à étudier l'effet du traitement par la détente instantanée contrôlée (DIC) sur la structure et les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum selon un plan d'expérience à deux facteurs et selon deux applications à base sèche et à base humide. La DIC a été choisie sur la base des résultats prometteurs des études précédentes sur la diminution de l'allergénicité des protéines du lactosérum ainsi que d'autres protéines d'origine animale et végétale.

La figure 7 représente un schéma récapitulatif de la méthodologie de recherche de la thèse. Dans la première partie, nous avons procédé à l'extraction et la caractérisation des enzymes (ficine et pepsine du poulet) et l'hydrolyse des protéines du lactosérum à deux ratio E/S (0,5 et 1%). Les produits de l'hydrolyse ont été caractérisés par la détermination du degré d'hydrolyse (DH), le profil électrophorétique par SDS-PAGE, par FPLC et enfin nous avons procédé à l'identification des produits de l'hydrolyse par LC Ms/Ms. Les propriétés techno-fonctionnelles en fonction du pH ont été déterminées pour les hydrolysats ayant un DH maximal. Pour les propriétés biologiques, nous avons déterminé l'activité antioxydante pour les différents points de la cinétique d'hydrolyse puis nous avons étudié cette activité pour les hydrolysats ayant un DH maximal et pour les fractions dont le poids moléculaire est supérieur ou inférieur à 3 kDa. Nous avons déterminé également l'activité anti-hypertensive des fractions ayant le poids moléculaire supérieur et inférieur à 3 kDa. Enfin, nous avons utilisé une méthode prédictive pour déterminer le taux de réduction de l'antigénicité des peptides de la fraction inférieure à 3 kDa identifiés par la spectrométrie de masse LC-Ms/Ms.

Dans la deuxième partie, les protéines du lactosérum ont été traitées par la DIC à base sèche et à base humide selon un plan d'expérience composite centré (Central Composite Design CCD) à deux facteurs. Nous avons étudié les changements induits par la DIC sur le plan structural, et techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum.

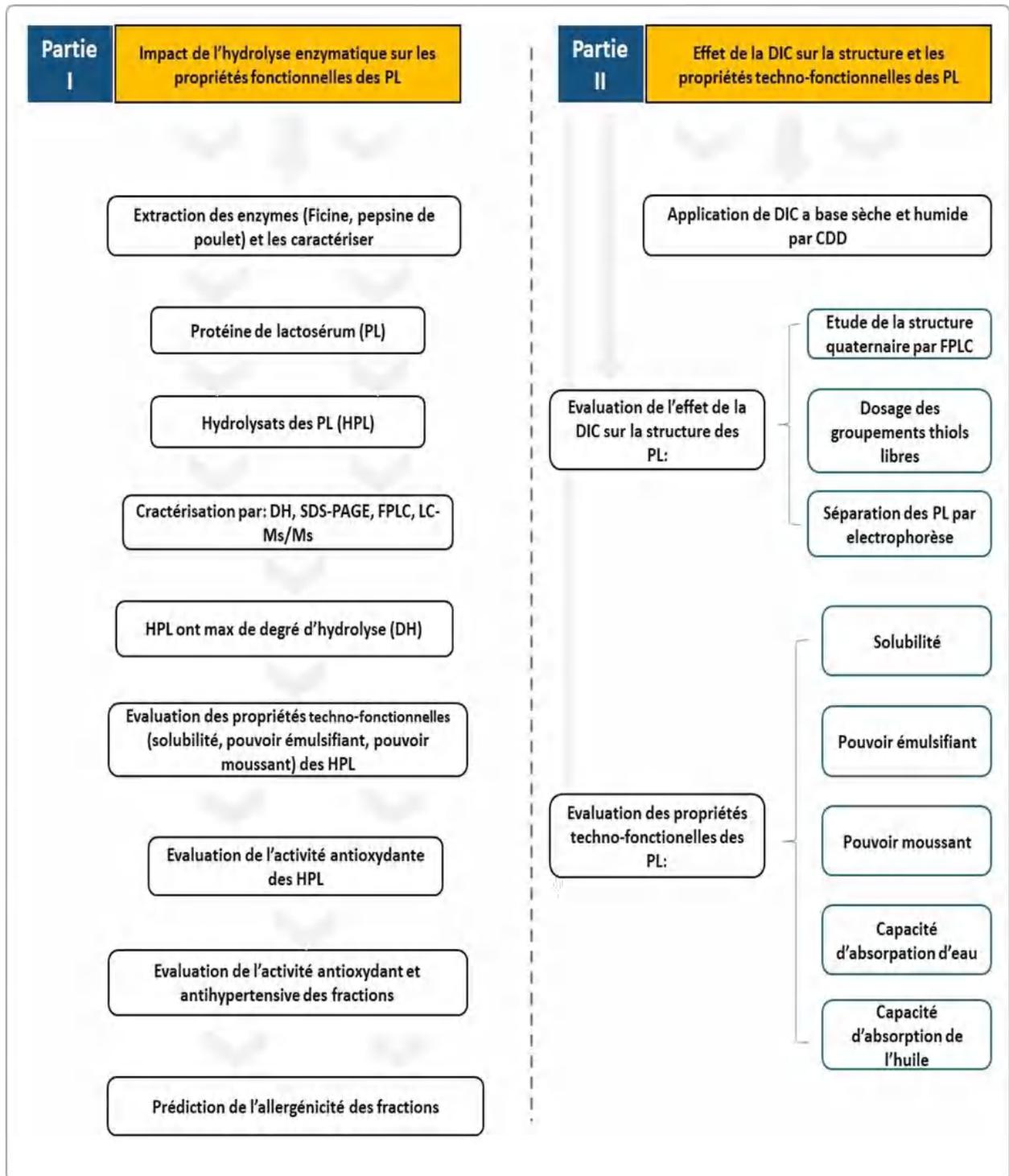


Figure 7: Schéma récapitulatif de la méthodologie de recherche de la thèse

1. Etude de l'impact de l'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum

1.1. Protéines du lactosérum

Le concentré des protéines du lactosérum (CPL) utilisé est un concentré des protéines commerciale en poudre (extrait sec total de 78%) séchés par atomisation de la marque Prozis (Porto-Portugal) (figure 8).



Figure 8: Concentré des protéines du lactosérum (CPL)

Les protéines du lactosérum utilisées pour le traitement par DIC sont des concentrés de protéines du lactosérum commerciaux séchés par atomisation (BULK Powder Pure) avec un taux de protéines de 73%.

1.2. Enzymes

Dans cette étude, nous avons procédé à l'extraction de deux enzymes (ficine et pepsine du poulet) à partir du latex du figuier (*Ficus carica*) et les proventricules du poulet respectivement. La pepsine porcine commerciale (800-1000 U/mg protéine) est de marque Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) avec des conditions optimales de pH (1,6) et une de température de 37 °C.

1.3. Extraction des enzymes

1.3.1. Ficine

➤ *Récupération du latex du figuier*

L'extrait enzymatique de la ficine a été récupéré à partir du latex du figuier qui est le liquide blanc visqueux qui s'échappe des feuilles et des fruits quand ils sont séparés des tiges ou quand les jeunes rameaux sont brisés. Il est collecté durant la période du 1 jusqu'à 30 septembre 2018 de la région de Djendel – Skikda.

Dans le but de caractériser l'extrait brut du figuier, le latex a été récupéré par incision manuelle du pédoncule du fruit et la branche principale (figure 9), deux à trois gouttes de latex s'échappent et sont directement récupérées dans un flacon propre et conservé au réfrigérateur (4 °C) jusqu'à l'extraction du système enzymatique. Le transport du latex au laboratoire s'est fait dans une glacière.



Figure 9 : Récupération du latex du figuier

➤ **Extraction de la ficine**

Le latex est soumis à une centrifugation de 3200 g pendant 15 min à une température de 4 °C, pour l'élimination de la gomme et des impuretés solides (débris végétaux) (Nouani et al., 2009; Zaak et al., 2017). Le surnageant, qui contient l'extrait brut de l'enzyme est récupéré, conservé au congélateur puis lyophilisé et conservé à (-20 °C) jusqu'à utilisation (figure 10) (Di Pierro et al., 2014; Zare et al., 2013).

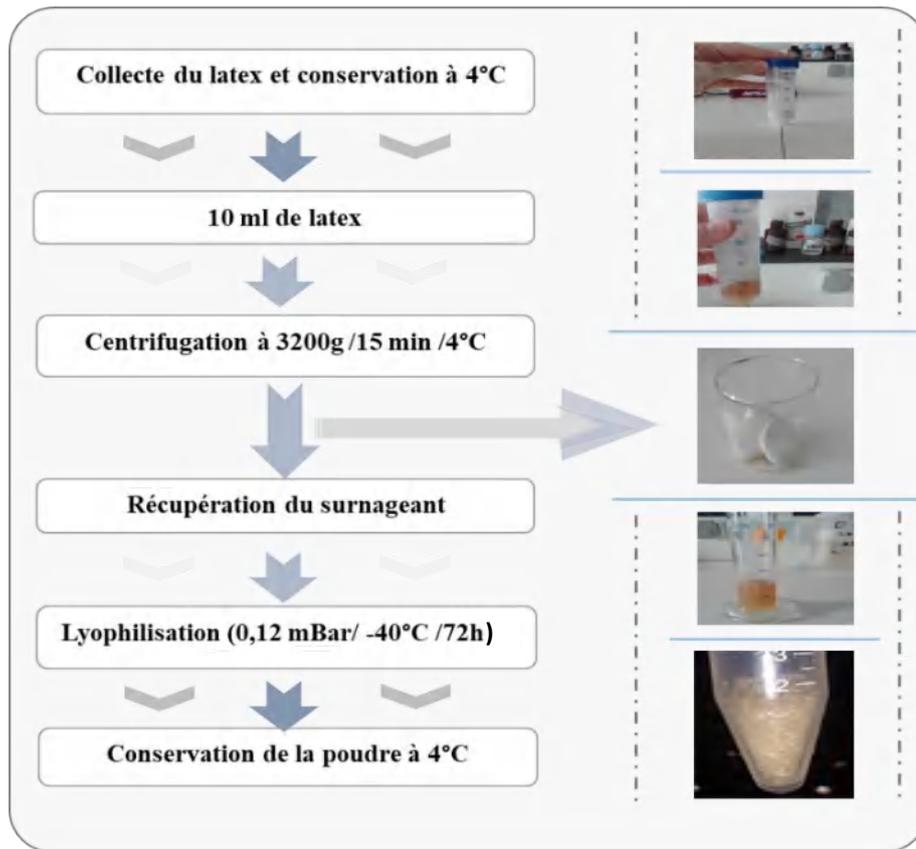


Figure 10 : Diagramme d'extraction de l'extrait brut de la Ficine(Nouani et al., 2009; Zaak et al., 2017)

1.3.2. Pepsine du poulet

➤ *Récupération des proventricules*

Les proventricules utilisés ont été récupérés juste après l'abattage des poulets d'une ferme située à Ain Smara (Constantine). Après abattage, déplumage et éviscération, les proventricules sont séparés du tube digestif du poulet puis conservés dans une glacière et transportés au laboratoire où ils sont débarrassés de la matière grasse qui les entoure, ouverts par incision longitudinale et vidés des particules alimentaires adhérentes aux parois. Après lavage et égouttage, ils sont répartis en lots de 100g environ, emballés dans des feuilles d'aluminium puis conservés au congélateur (environ – 18 °C) jusqu'à leur utilisation.

➤ *Extraction de la pepsine du poulet*

L'extraction de la pepsine du poulet est réalisée en suivant le protocole d'extraction proposé par (Bohak, 1970). Les principales étapes sont présentées en figure 11.

Les proventricules décongelés, sont hachés à l'aide d'un hachoir ménager à couteaux (KENWOOD). Les proventricules hachés sont transférés dans une solution saline de macération (30 g/L de NaCl et 7 g/L de NaHCO₃), à raison de 300 mL de la solution de

macération pour 100g de proventricules hachés. Après 3 heures de macération sous agitation, le pepsinogène est activé par acidification à l'aide d'une solution d'HCl 3N à pH = 2 (Glick et al., 1989).

Le mélange est maintenu à température ambiante pendant 15 min, pour faciliter l'élimination ultérieure du mucilages en provoquant leur floculation ce qui facilitera la clarification. L'extrait brut de pepsine du poulet, est filtré sur une gaze et le retentât est éliminé, le filtrat est enfin centrifugé à une force de 3200g à 4 °C pendant 30 min. Le surnageant récupéré représente l'extrait d'enzyme clarifié puis le pH est ajusté à 6,4 par une solution de NaOH (3N) puis lyophilisé et conservé à (-20 °C) jusqu'à utilisation. Le culot qui représente le mucilage et les débris des tissus est éliminé.

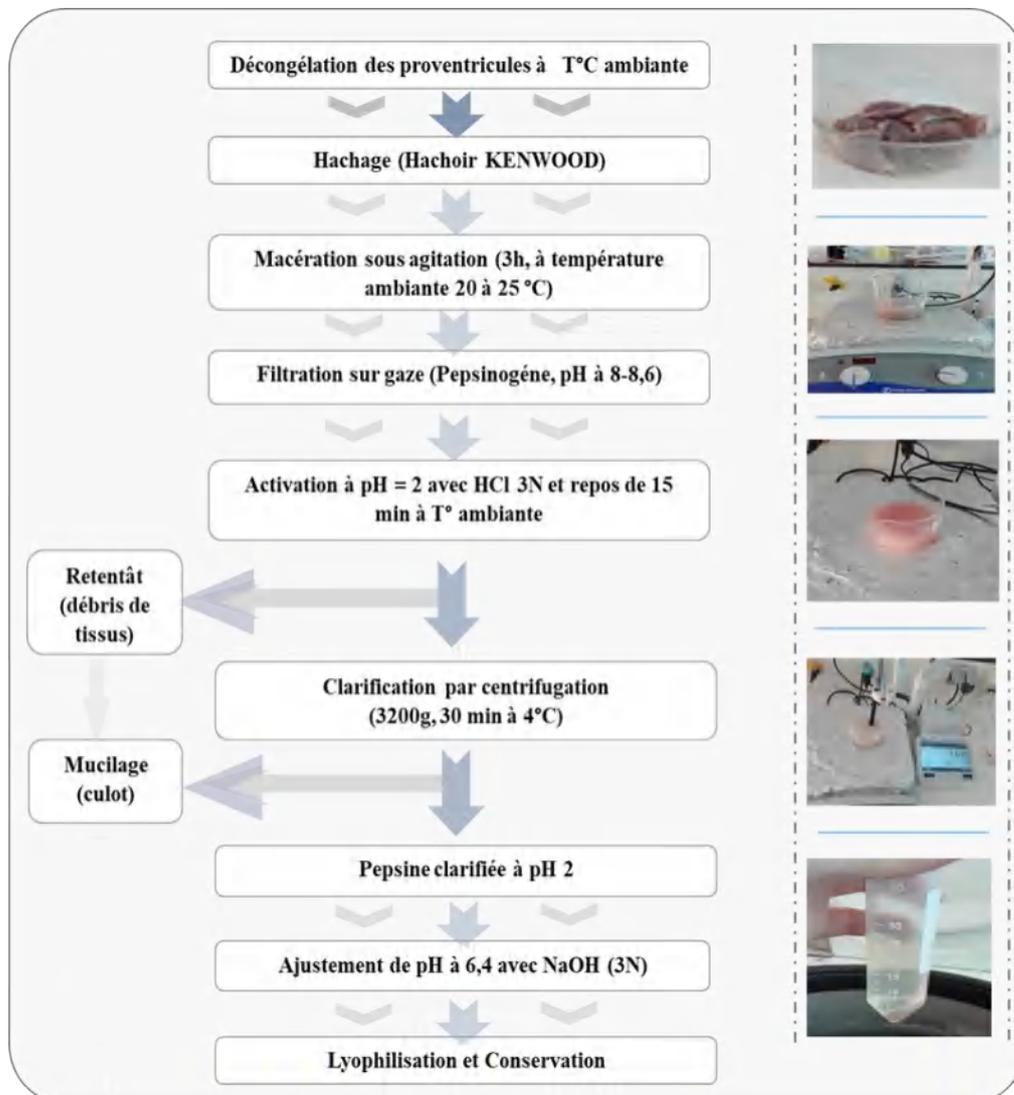


Figure 11 : Diagramme d'extraction de la pepsine du poulet selon Bohak (1970)

1.4. Caractérisation des extraits enzymatiques

La caractérisation des extraits enzymatiques obtenus se fait par détermination de leurs pH, taux des protéines, activité protéolytique et les profils électrophorétiques.

1.4.1. Détermination du pH, extrait sec total (EST) et rendement

La détermination du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre (Hanna instruments, France) selon la méthode AFNOR (1986).

L'extrait sec total (EST) correspond au poids du résidu restant après dessiccation du produit par étuvage à 103 ± 2 °C. Un volume déterminé des extraits enzymatiques est séché à l'étuve à 105 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

L'EST est donné par la formule suivante :

$$EST(\%) = 100 - H(\%)$$

Le rendement des extraits enzymatiques est calculé par les formules suivantes :

Pour l'extrait brut de la ficine:

$$\text{Rendement de l'extraction (\%)} = \frac{\text{Volume de l'extrait brut de la ficine}}{\text{Volume du latex frais}} \times 100$$

Pour l'extrait brut de la pepsine du poulet :

$$\text{Rendement de l'extraction (\%)} = \frac{\text{Masse de l'extrait sec}}{\text{Masse des proventricules}} \times 100$$

1.4.2. Taux de protéines totales

Le dosage des protéines des extraits enzymatiques obtenus (ficine et pepsine du poulet) est déterminé selon la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1980).

Le dosage de l'azote est effectué par la méthode de Kjeldahl. La matière organique est minéralisée avec de l'acide sulfurique concentré à chaud en présence d'un catalyseur. L'azote organique total est converti en sulfate d'ammonium. La distillation permet la libération des molécules de NH_3^+ et leur entraînement par la vapeur après alcalinisation du minéralisât par NaOH 10N. L'ammoniac libéré est fixé dans une solution d'acide borique (4%). Les anions du borate qui se forment sont titrés avec du HCL. Le taux de protéines est calculé selon la formule rapportée par Mallek Ayadi et al. (2018) en utilisant le coefficient de conversion (6,38 pour lait et leur dérivé), il est exprimé en % de la matière sèche (voir annexe 1).

1.4.3. Activité protéolytique

Le dosage de l'activité protéolytique se base sur l'estimation de la quantité des peptides et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine sous l'action d'une ou d'un mélange de protéases. L'activité protéolytique des extraits enzymatiques est déterminée en employant l'hémoglobine dénaturée et l'azocaseine comme substrat.

➤ Avec le substrat d'hémoglobine

L'hémoglobine est dénaturée selon la méthode d'Anson (1938) modifiée par Vairo-Cavalli et al, (2005). L'hémoglobine dénaturée a été préparée en agitant 20 mL d'une suspension d'hémoglobine (Sigma) à 2,5% avec 2,5 ml de HCl 0,6 M pendant 30 min puis filtrée. Le pH d'hémoglobine dénaturée est de 1,85. Le pH d'hémoglobine dénaturée et des enzymes est ajusté selon le pH optimal de ces derniers à 7,5 pour la ficine et 2 pour la pepsine du poulet avec 0,5 M de NaOH et 0,6 M de HCL. Le mélange réactionnel a été préparé en mélangeant 50 μ L d'enzyme avec 250 μ L de d'hémoglobine dénaturée, la réaction a été effectuée à 37 °C pendant 10 min, ensuite 500 μ L de TCA (acide Trichloroacétique) à 5% sont ajoutés pour arrêter la réaction. Le culot est éliminé et le surnageant est récupéré par centrifugation à 5000g/20 min/4 °C pour estimer la quantité des produits d'hydrolyse.

Des blancs ont été réalisés par l'ajout du TCA au substrat avant l'ajout de l'enzyme. La quantité des produits d'hydrolyse est estimée par la mesure de leurs absorbances à 750 nm par spectrophotométrie après une coloration bleu au réactif de Folin- Ciocalteu (réaction avec la Tyr et Trp) (Sidikou et al., 2005).

• Expression des résultats

L'activité protéolytique est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 (μ g/mL) (figure 12). Une unité de protéase est l'équivalent de 1 μ g de tyrosine libérée pendant 1h de temps par 1 mL d'une solution d'enzyme.

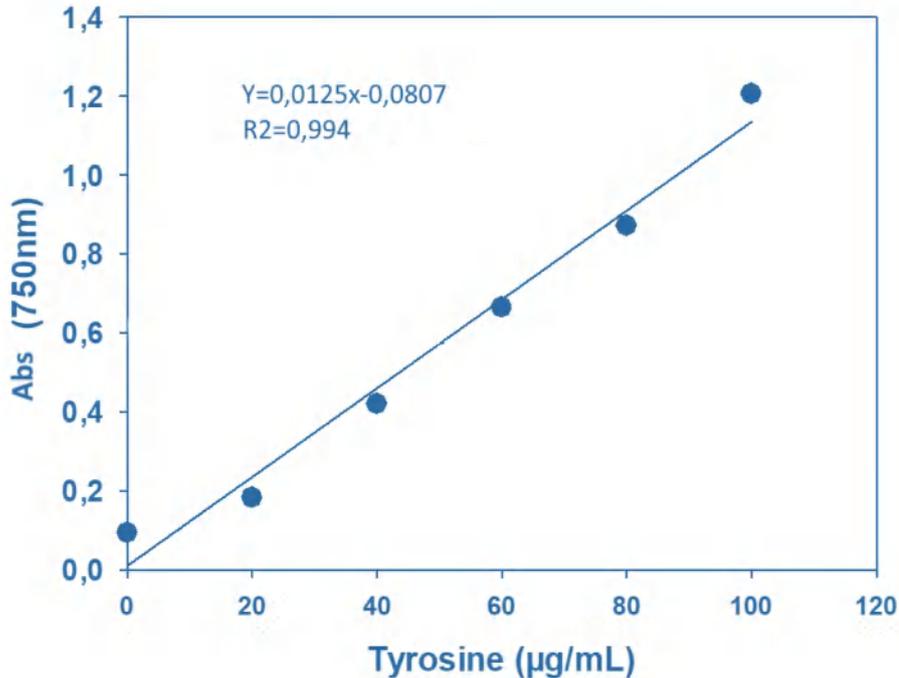


Figure 12: Courbe étalonnage de Tyrosine

➤ *Avec le substrat d'azocaséine*

L'activité protéolytique a été déterminée comme décrit par Biondi et al. (2003), en utilisant l'azocaséine comme substrat avec de légères modifications. L'azocaséine (1% p/v) a été dissoute dans un tampon Tris-HCl 0,2 M, le pH a été ajusté à 7,5 pour la ficine et 2 pour la pepsine du poulet avec du HCL ou du NaOH (2M), la réaction a été effectuée avec 100 µL de substrat mélangé à 60 µL d'enzyme à 37 °C dans l'obscurité pendant 1h. La réaction a été arrêtée en ajoutant 480 µL TCA (10% p/v) et la protéine précipitée a été éliminée par centrifugation (16469g, 5 min, 4 °C). A partir du surnageant clair, un volume de 320 µL a été mélangé avec 560 µL de NaOH (1 M) et l'absorbance a été mesurée à 440 nm. Un blanc a été créé en mélangeant le TCA au substrat avant l'ajout de l'enzyme. Une unité (U) d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme capable d'hydrolyser l'azocaséine entraînant une augmentation de 0,001 unité d'absorbance par minute. La quantification de l'activité protéolytique est basée sur la quantité de peptides libérés, contrôlée par les unités d'absorbance à 440 nm (Barros et al., 2001).

1.4.4. Activité spécifique

L'activité spécifique a été calculée en divisant l'activité protéolytique par la teneur en protéines de l'extrait enzymatique et exprimée en U/ mg de protéines.

1.4.5. Profils électrophorétique (SDS-PAGE) des extraits enzymatiques

Les profils des extraits enzymatiques, ont été déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) selon la méthode de (Schägger & Von Jagow, 1987). Les échantillons ont été mélangés avec un volume égal de tampon d'échantillon, puis chauffés à 80 °C pendant 5 min. Ce tampon a été préparé en ajoutant 100 µL de DTT (2%) à 490 µL de tampon de l'échantillon Tricine (Bio-Rad, USA). La migration a été réalisée dans un système Mini-Protean II de Bio-Rad (Hercules, CA, USA), en utilisant 10% de gel de concentration et 13% de gel de séparation (tableau 9). Après le dépôt de 15 µL par puit de chaque échantillon, la migration est réalisée à 75V pendant 5 min puis à 150V pendant 30-45 min. A la fin de la migration, le gel est démoulé et mis dans une solution de fixation des bandes (TCA 10 %) pendant 1h puis coloré par une solution de 0,025% de bleu de Coomassie pendant une nuitée sous agitation douce. Une décoloration du gel par des lavages successifs est effectuée sous agitation douce dans la solution de décoloration. Enfin, les gels décolorés sont scannés.

Tableau 9: Composition des gels d'électrophorèse (SDS/PAGE)

	Gel de séparation 13 %	Gel de concentration 10%
Eau	3,2 mL	2,6 mL
Acrylamide-Bis 30%	2,67 mL	1 mL
Tris 1,5M pH 8,8	2 mL	/
Tris 0,5M pH 6,8	/	1,25 mL
SDS 10%	80 µL	50 µL
APS 10%	80 µL	50 µL
Temed	8 µL	1 µL

1.4.6. Détermination des conditions optimales d'hydrolyse

- **pH**

Le pH optimal des protéases étudiées est déterminé en utilisant l'hémoglobine comme substrat et en traçant les courbes de l'activité protéolytique en fonction du pH. Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé dans les conditions décrites plus haut à une température d'incubation de 37 °C. Le pH du substrat et les enzymes est ajusté entre 1 et 5 pour la pepsine

du poulet et entre 5 et 8,5 pour la ficine (avec un intervalle de 0,5 unités). L'ajustement du pH se fait avec une solution de NaOH (0,5 M) ou de HCL (0,6 M).

- **Température**

La température optimale des protéases étudiées est déterminée en étudiant l'activité protéolytique en fonction de la température et au pH optimal (7,5 pour la ficine et 2 pour la pepsine du poulet). La plage de température étudiée est de 35 °C à 90 °C avec un incrément de 5 °C.

1.5. Cinétique de l'hydrolyse des protéines du lactosérum par les deux protéases

Les protéines du lactosérum notamment la β -lg et l' α -La sont connues par leur forte résistance à la digestion enzymatique. Dans le but d'améliorer la biodisponibilité et les propriétés biologiques et techno-fonctionnelles de ces protéines, nous avons suivis la cinétique de l'hydrolyse par les extraits enzymatiques préparés (ficine et pepsine du poulet) en les comparant à l'action de la pepsine porcine commerciale considérée comme enzyme de référence.

L'hydrolyse enzymatique a été conduite avec les extraits enzymatiques préparés préalablement et dans les conditions optimales de pH et de température de chaque enzyme. Les protéines du lactosérum sont dissoutes à raison de 2% dans la solution tampon correspondante pour chaque enzyme, le tampon phosphate (0,1 M; pH 7,5) pour l'hydrolyse par la ficine, et le tampon glycine/HCL (50 mM; pH 2) pour l'hydrolyse par la pepsine du poulet et la pepsine porcine. L'hydrolyse a été effectuée à deux ratios E/S choisis de 0,5 et 1%.

La cinétique de l'hydrolyse par chaque enzyme a été suivie pendant 6h, des aliquotes (2 mL) sont prélevés à 0,5, 1, 2, 4 et 6h du temps d'hydrolyse. L'enzyme a été inactivée par traitement thermique à 95 °C pendant 10 min, et le surnageant a été séparé du précipité par centrifugation à 2370g pendant 10 min.

Les hydrolysats obtenus sont stockés à (-20 °C) pour une analyse ultérieure. Le témoin initial de l'échantillon non hydrolysé a été prélevé avant l'ajout de l'enzyme. L'hydrolyse a été effectuée en double pour chaque condition.

1.6. Caractérisation des produits de l'hydrolyse

Les produits de l'hydrolyse sont caractérisés par la détermination du degré d'hydrolyse (DH), la longueur de chaîne moyenne des peptides (LCMP), le profil électrophorétique par

SDS-PAGE et la chromatographie par gel de filtration (FPLC) en comparaison avec des protéines natives et enfin l'identification des peptides issus de ces hydrolyses par LC-Ms/Ms.

1.6.1. Détermination du degré d'hydrolyse (DH)

Le degré d'hydrolyse (DH) est défini comme le pourcentage de liaisons peptidiques clivées pendant la réaction enzymatique par rapport au nombre total des liaisons peptidiques disponibles (Carvalho et al., 2017; Dullius et al., 2018). Dans ce travail nous avons utilisé la méthode TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic) pour le dosage des groupes amines libres.

Cette méthode est basée sur la réaction de la TNBS avec les groupes amine N-terminaux libres des acides aminés, ces groupes sont convertit en dérivés de l'acide aminé trinitrophényl, qui sont ensuite déterminés en utilisant l'absorbance à 340 nm (figure 13). Le nombre total des groupes amino N-terminaux est ensuite estimé en fonction de la teneur en en azote (N) de la source protéique d'origine (Rutherford, 2010) .

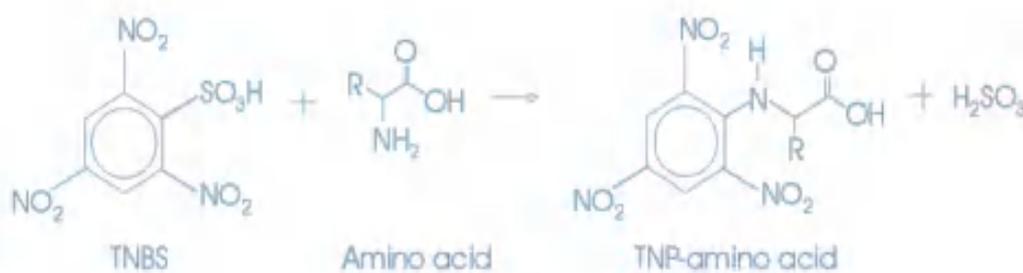


Figure 13: Réaction de TNBS avec un acide aminé

La méthode utilisée a été décrite par (Adler-Nissen, 1979) avec quelques modifications. Le réactif TNBS (5%) est dilué dans de l'eau à 0,025% (v/v). 50 µL de l'échantillon ou standard ont été ajouté à 125 µL de phosphate de sodium (pH 8,2, 200 mM), ensuite, 50 µL du réactif TNBS a été ajouté à chaque tube, suivi d'un mélange et d'une incubation à 50 °C pendant 60 min dans un incubateur agitateur à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 340 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Le degré d'hydrolyse (DH) est déterminé comme suit :

$$DH (\%) = \frac{(AN_{HPL} - AN_{non\ hydrolysé})}{(N_{pb})} \times 100$$

Où :

AN_{HPL} : la teneur en azote aminé du substrat protéique du lactosérum après hydrolyse exprimé en mg/ g protéine ;

$AN_{non\ hydrolysé}$: la teneur en azote aminé du substrat protéique du lactosérum avant hydrolyse, exprimé en mg/ g protéine ;

N_{pb} : 123,3 (mg/g) a été utilisé comme teneur en azote des liaisons peptidiques pour les protéines du lactosérum. Les valeurs de DH sont les moyennes de trois répétitions

- **Expression des résultats**

Une courbe étalon à la leucine (0,05-2,5 mM) est tracée (figure 14). Les teneurs en AN_{HPL} et $AN_{non\ hydrolysé}$ ont été obtenues à partir de la courbe étalon de la leucine. Ces teneurs sont ensuite divisées par la teneur en protéines (déterminé par acide bicinchoninique (BCA), voir annexe 2) des échantillons testés pour donner des mg d'azote aminé par gramme de protéines.

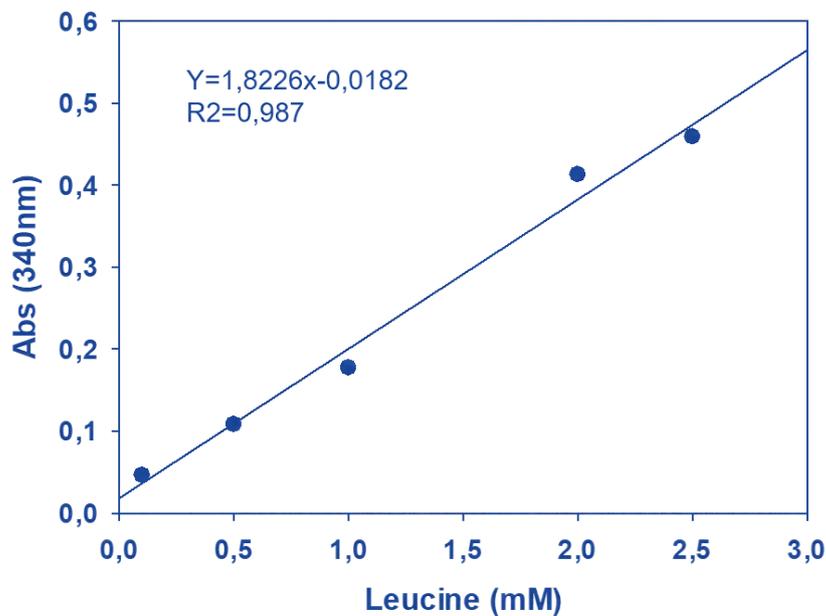


Figure 14 : Courbe étalonnage de Leucine

1.6.2. Détermination de la longueur moyenne de chaîne peptidique (LMCP)

Par définition, la longueur moyenne de la chaîne peptidique (LMCP) est l'inverse du DH et est une approximation permettant de donner le nombre moyen des acides aminés au niveau d'une mixture de peptides produit à un degré d'hydrolyse (DH) donné (Adler-Nissen, 1986; Cheison et al., 2011). Sur la base des valeurs du DH, la LMPC a été calculé à l'aide de la formule suivante (Adler-Nissen, 1986):

$$LMCP = \frac{100}{DH (\%)} \times 100$$

1.6.3. Séparation électrophorétique en SDS-PAGE

Les profils électrophorétiques des hydrolysats des différents points de la cinétique de l'hydrolyse par les deux enzymes ont été déterminés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) à 13% de concentration pour une appréciation des changements induits par l'hydrolyse enzymatique. La méthode a été détaillée dans la partie précédente.

1.6.4. Séparation chromatographique par gel de filtration (FPLC)

FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) est une chromatographie qui permet la séparation des protéines et des peptides selon leur poids moléculaire par filtration sur gel. Nous avons utilisé un système FPLC de Pharmacia (Uppsala, Suède) dans une configuration composée de deux pompes volumétriques P-500, une vanne motorisée électrique MV-7, une colonne de filtration sur gel préconditionnée avec du Superose 12 HR 10/30, un moniteur spectrophotomètre UV à trajet unique, un enregistreur double canal REC-102 et un contrôleur LCC-500. La colonne a été utilisée à un débit de 0,4 mL/min avec un tampon phosphate 0,025 M (pH 7) contenant 0,15 M de NaCl et 0,2 g/L de NaN₃. L'absorbance de l'éluant a été contrôlée à 280 nm. Des protéines standard avec un poids moléculaire connu (IgG (150 kDa); BSA (66 kDa); β -Lg (36 kDa); α -La (14,178 kDa) sont utilisées pour établir une courbe d'étalonnage.

A partir de la FPLC, la quantité des protéines restant après l'hydrolyse a été calculé en utilisant la courbe d'étalonnage qui a été réalisée à différentes concentrations de β -Lg (2-12 mg/mL) et α -La (0,2-2 mg/mL) à différentes surfaces (figure 15). La concentration de chaque protéine dans chaque échantillon a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant les valeurs de la surface suivie du calcul du pourcentage de chaque protéine par la formule suivante:

% protéine restant

$$= \frac{\text{Concentration de protéine } \beta\text{-Lg} / \alpha\text{-La resté après l'hydrolyse}}{\text{Concentration de protéines } \beta\text{-Lg} / \alpha\text{-La initiale avant l'hydrolyse}} \times 100$$

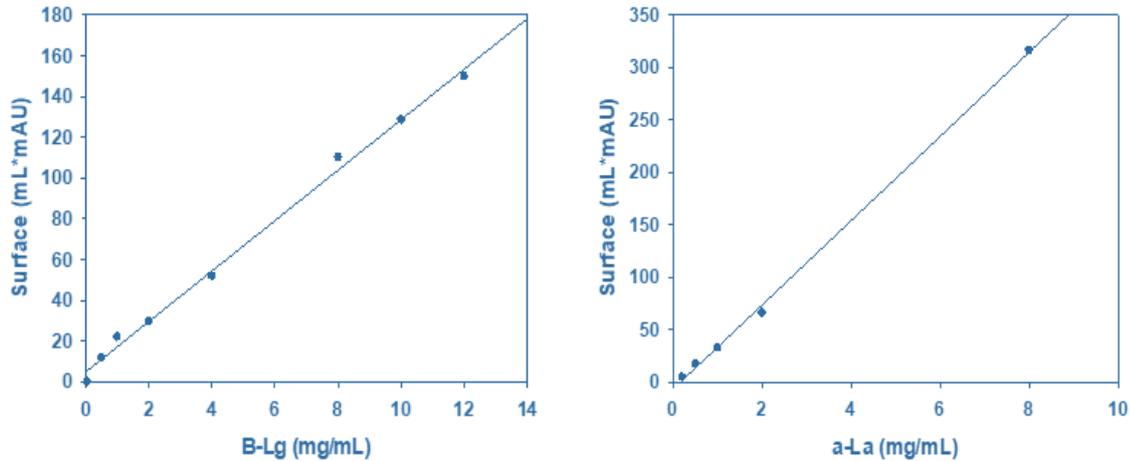


Figure 15 : Courbe étalonnage de β -Lg et α -La

1.6.5. Identification des produits de l'hydrolyse par Spectrométrie de masse LC-Ms/Ms

Les fractions inférieures à 3 kDa pour les hydrolysats des protéines du lactosérum par la ficine (HPL.F), de pepsine du poulet (HPL.PP) ayant un maximum de degré d'hydrolyse (à un ratio E/S de 1% pendant 2h d'incubation pour la ficine, et à un ratio de 0,5% pendant 6h d'incubation pour la pepsine du poulet) ont subi une identification des peptides par le MALDI-TOF, ces fractions sont généralement plus compatibles avec l'analyse et ont des activités biologiques élevées, en plus les fractions inférieures à 3 kDa sont généralement utilisé pour les préparations hypoallergiques par ce qu'elles présentent une allergénicité réduite grâce à la diminution de la taille des peptides (Lozano-Ojalvo et al., 2017).

L'identification et la quantification des fractions pour chaque enzyme a été réalisée par nano LC-Ms/Ms tel que décrit par (Osório et al., 2021). C'est une technique d'analyse permettant de détecter et identifier des molécules par la mesure de leur masse. Elle consiste à bombarder un composant par un faisceau d'électron, le composant est ionisé et les ions résultants sont séparés selon leur rapport masse/charge (m/s). L'équipement qu'était utilisé est composé d'un Ultimate 3000 système de chromatographie liquide couplé à Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany).

Les données brutes ont été traitées par le logiciel Proteome Discoverer 2.5.0.400 software (Thermo Scientific, Bremen, Germany). L'identification des peptides a été réalisée par les données disponibles en UniProt protein sequence database for the Bos taurus Proteome (2020_05 with 37,512 entries) et une base de données commune sur MaxQuant (version 1.6.2.6, Max Planck Institute of Biochemistry, Munich, Germany).

1.7. Détermination des propriétés techno-fonctionnelles des hydrolysats

Dans le but d'étudier l'impact de la protéolyse des protéines du lactosérum sur les propriétés techno-fonctionnelles, nous avons utilisé des hydrolysats des protéines du lactosérum par la ficine (HPL.F), de pepsine du poulet (HPL.PP) et de pepsine porcine (HPL.P) ayant un maximum de degré d'hydrolyse. Nous avons déterminé la solubilité, l'activité émulsifiante et le pouvoir moussant en fonction du pH en comparaison à des protéines natives du lactosérum.

Les hydrolysats sont reconstitués dans l'eau distillée à un rapport de 1%. Le pH de la dispersion a été ajusté sur une plage de 2 à 8 avec de la NaOH ou du HCL (2M).

1.7.1. Solubilité

La solubilité de la dispersion des protéines du lactosérum et leur hydrolysats (HPL.F, HPL.PP et HPL.P) en fonction du pH (de 2 à 8) a été déterminée selon le protocole de Lamsal et al. (2007). Après reconstitution à raison de 1%, les dispersions sont maintenues à température ambiante pendant une heure puis centrifugés pendant 10 min à 1650g à 20 °C, le taux de protéines dans le surnageant est déterminé par la méthode de Bradford (voir annexe 4). La solubilité a été exprimée en pourcentage des protéines présentes dans le surnageant par rapport aux protéines initiales. La solubilité est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{C}{C_0} \times 100$$

Où : C_0 : Concentration protéines du lactosérum native à pH=6,4;

C: Concentration protéines du lactosérum après hydrolyse.

1.7.2. Indice de l'activité émulsifiante

L'indice de l'activité émulsifiante (IAE) de la dispersion des protéines natives du lactosérum et leur hydrolysats (HPL.F, HPL.PP et HPL.P) en fonction du pH (de 2 à 8) a été déterminée selon le protocole de Chicón et al., (2009); Chobert et al., (1988). Une émulsion a été préparée à raison de 1/4 d'huile de jojoba et 3/4 de solution protéique (3 mL d'échantillon et 1 mL d'huile de jojoba), la fraction volumique de la phase dispersée $\frac{1}{4}$ est 0,25. L'émulsion est préparée par homogénéisation à 21000 rpm pendant 30s avec un polytran à température ambiante, ensuite, une aliquote de l'émulsion est diluée au 1/100 dans une solution de 0,1% de SDS dans 0,1M de NaCl à pH=7 (50 μ L de l'émulsion sont transférés dans 5 mL d'une solution de SDS à 0,1%), et l'absorbance de cette solution est lue à 500 nm. IAE est donné par la formule de Pearce & Kinsella, (1978):

$$IAE (m^2/g) = \frac{2T}{\Phi C}$$

Où: T: turbidité = 2,3 A/ I (A: absorbance à 500 nm; I: trajet optique en mètre (m)) ;

Φ : volume de la phase grasse 0,25;

C : Concentration en protéine 1%.

1.7.3. Activité moussante

L'activité moussante en fonction du pH (de 2 à 8) est déterminé par la méthode décrite par Caessens et al. (1997). Des volumes de 10 ml de la dispersion des PL et leur hydrolysats (HPL.F, HPL.PP et HPL.P) à pH ajusté sont placés dans des éprouvettes en verre graduées puis homogénéisés à 10000 rpm pendant 2 min avec un polytran à température ambiante. L'activité moussante est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité moussante (\%)} = \frac{V_0}{V_i} \times 100$$

Où : V_i : Volume initial (10 mL) ;

V_0 : Volume après homogénéisation.

1.8. Détermination de l'activité antioxydante totale

L'activité antioxydante a été déterminée pour les hydrolysats prélevés pour chaque temps par deux méthodes ABTS et ORAC.

1.8.1. Méthode ABTS

L'activité antioxydante déterminée par la méthode ABTS est une activité de piégeage des radicaux telle que décrite par Re et al., (1999). L'ABTS (2,20- azinobis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) est un composé hautement soluble dans l'eau et chimiquement stable. La méthode d'ABTS est basée sur l'inhibition par l'antioxydant du radical cation (2,20- azinobis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) (ABTS^{•+}) qui a un spectre d'absorption caractéristique de grande longueur d'onde montrant un maximum d'absorption principal à 415 nm et des maximum d'absorption secondaires à 660,734, et 820 nm (Sanchez-Moreno, 2002).

Le radical cation ABTS produit à partir de la réaction de 7 mM (ABTS) et 2,45 mM potassium persulfate (Sigma– Aldrich, St. Louis, MO) après incubation à température ambiante à l'ombre pendant 16h. La solution d'ABTS est diluée avec de l'eau jusqu'à une absorbance de

0,70 ± 0,02 à 734 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). 180 µL de la solution d'ABTS est ajoutée à 20 µL de l'échantillon, dans une microplaque de 96 puits (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). La lecture de l'absorbance du mélange a été effectuée après 6 min d'incubation à température ambiante. Le taux d'inhibition des échantillons a ensuite été comparée à une courbe standard réalisée à partir des lectures correspondantes de Trolox (75–175µM) (figure 16) et les résultats sont exprimés en µmol Equivalent Trolox (ET)/mg protéine (voir annexe 5).

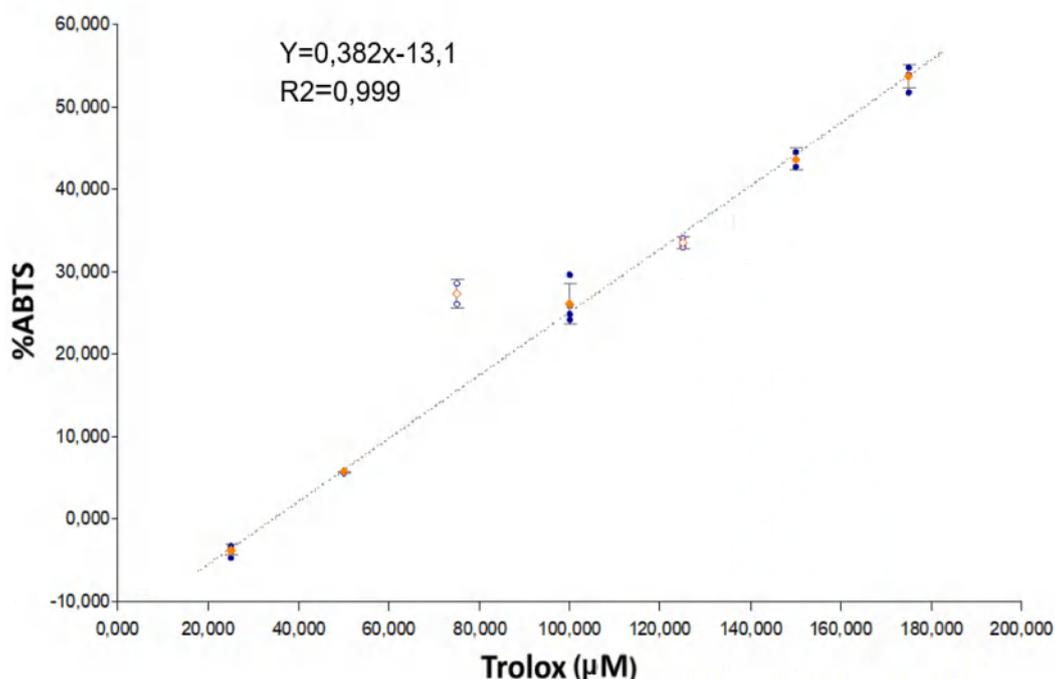


Figure 16: Courbe étalonnage de Trolox pour la méthode ABTS

1.8.2. ORAC

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), qui appartient à la famille des tests basés sur le transfert d'atomes d'hydrogène (TAH), donne une mesure des espèces en compétition pour les radicaux peroxydes (Apak et al., 2007). L'ORAC applique un schéma de réaction compétitive dans lequel l'antioxydant et le substrat sont en compétition cinétique pour les radicaux peroxydes générés thermiquement par la décomposition des composés azoïques tels que l'AAPH (2,2'-azobis (2-méthylpropionamide) dihydrochloride). L'aire nette sous la courbe (ANC), obtenue en soustrayant le blanc de celle de l'échantillon contenant l'antioxydant

(dont la décroissance de la fluorescence est retardée), est une indication de la concentration totale en antioxydant de l'échantillon dans la méthode ORAC.

L'activité antioxydante est déterminée également par une autre méthode ORAC-FL qui est basée sur celle proposée par (Contreras et al., 2011). Elle est réalisée dans une microplaque noire de 96 puits (Nunc, Denmark). La réaction est effectuée à 40 °C dans un tampon phosphate (75 mM; pH 7,4) et le mélange de dosage final (200 µL) contenait de la fluorescéine (70 nM), AAPH (14 mM), et l'antioxydant (Trolox ($9,98 \cdot 10^{-4}$ – $7,99 \cdot 10^{-3}$ µM) ou l'échantillon (à différentes concentrations). Les absorbances sont lues sur un lecteur de plaque multidétecteur (Synergy H1, Biotek, Winooski, Vermont, USA). La fluorescence a été enregistrée pendant 137 min (104 cycles) avec des filtres d'excitation à 485 nm et d'émission à 520 nm. L'équipement est contrôlé par Gen5 Biotek software version 3,04. Les solutions AAPH et Trolox ont été préparées quotidiennement et la fluorescéine a été diluée à partir d'une solution mère (1,17 mM) dans un tampon phosphate (75 mM; pH 7,4). Les valeurs ORAC-FL finales ont été exprimées en µmol ET/mg protéine (voir annexe 6).

L'activité antioxydante avec la méthode ORAC a été également utilisée pour les fractions identifiées par MALDI-TOF (Poids moléculaire supérieur et inférieur à 3kDa). Le fractionnement des HPL.F, HPL.PP a été réalisé par un système de membrane d'ultrafiltration en utilisant des seuils de poids moléculaire de 3 kDa.

1.8.3. Activité anti-hypertensive

L'activité antihypertensive a été testée sur les fractions identifiées par MALDI-TOF des HPL.F, HPL.PP dont le poids moléculaire est supérieur et inférieur à 3kDa ainsi que l'hydrolysats total pour les hydrolysats des protéines du lactosérum ayant un maximum de degré d'hydrolyse (à un ratio E/S de 1% pendant 2h d'incubation pour la ficine (HPL.F), et à un ratio de 0,5% pendant 6h d'incubation pour la pepsine du poulet).

L'effet inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) a été mesuré en utilisant le test fluorimétrique selon Coscueta et al. (2019). Une enzyme de conversion de l'angiotensine-I commerciale (EC 3.4.15.1, 5,1 U/mg) a été diluée dans 5 ml d'une solution de glycérol dans 50% d'eau ultra-pure. Cette solution a été maintenue à -20 °C jusqu'à son utilisation. La solution mère a ensuite été diluée au 1:24 avec une solution tampon Tris 150mM, pH 8,3, contenant 1µM de ZnCl₂, pour atteindre une concentration de 42 mU/mL dans la solution réactionnelle finale. 40 µL de la solution de travail d'ECA ont été ajoutés dans chaque puits de microplaque, puis ajustés à 80 µL en ajoutant à la fois de l'eau ultra-pure pour le

contrôle et l'échantillon à analyser. La réaction enzymatique a été lancée en ajoutant 160 µL de solution de substrat (solution 0,45mM de ABz-Gly-Phe(NO₂)⁻ Pro, dissoute dans un tampon Tris 150mM (pH 8,3), contenant 1,125M de NaCl) en mélangeant immédiatement et en incubant à 37 °C. La microplaque a été automatiquement agitée avant la première lecture, et la fluorescence générée a été mesurée pendant 30 min.

L'activité inhibitrice de l'ECA est exprimée comme la concentration capable d'inhiber 50% de l'activité enzymatique (IC₅₀). Une modélisation non linéaire des données obtenues a été utilisée pour calculer les valeurs d'IC₅₀, qui ont été exprimées en moyenne ± SD.

Les mesures ont été effectuées avec le lecteur de plaques FLUOstar OPTIMA avec des filtres d'excitation à 350 nm et d'émission à 420 nm. Des microplaques noires de 96 puits en polystyrène (Nunc, Danemark) ont été utilisées pour le dosage.

Pour ce test, la teneur en protéines des extraits peptidiques a été estimée par BCA. (annexe 2). La détermination de la concentration en protéines des peptides a été basée sur leur poids sec réel.

1.8.4. Prédiction du potentiel allergène

La prédiction de l'allergénicité des peptides identifiés par LC Ms/Ms a été faite en utilisant la base de données BIOPEP (Minkiewicz et al., 2008). L'application BIOPEP contient une base de données de séquences peptidiques biologiquement actives et un programme permettant de construire des profils de l'activité biologique potentielle des fragments de protéines, de calculer des descripteurs quantitatifs comme mesures de la valeur des protéines en tant que précurseurs potentiels de peptides bioactifs, et de prédire les liaisons susceptibles d'être hydrolysées par des endopeptidases dans une chaîne protéique.

Cette base de données indique également les épitopes allergènes de la β-Lg et α-L, un profil pour les épitopes a été créé, qui montre la présence potentielle et l'emplacement des fragments d'épitopes dans une séquence protéique. La fréquence d'apparition des fragments allergènes dans une séquence protéique (paramètre A) a également été déterminée selon l'équation suivant :

$$A = \frac{a}{N}$$

Où: a = nombre de fragments ayant une activité donnée dans une séquence de protéines;

N = nombre de résidus des acides aminés dans une séquence de protéines (Coscueta et al., 2019; Dziuba et al., 2003).

La prédiction est faite pour la β -Lg et l' α -L, allergène major du lait. Pour cela, non seulement les séquences peptidiques identifiées par spectrométrie de masse (< 3000 Da) ont été considérées, mais aussi les séquences dont nous avons estimé qu'elles couvraient encore 100% de la séquence protéique correspondante.

2. Etude de l'impact du traitement par DIC sur la structure et les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum

Dans l'objectif d'améliorer la valeur ajoutée des protéines du lactosérum, nous avons cherché à déterminer l'impact du traitement par la DIC par deux applications à base sèche (DIC-S) et à base humide (DIC-H) pour améliorer les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum. Des études préalables ont montré que la DIC pouvait réduire jusqu'à 80% de l'immunoréactivité de ces protéines (Boughellout et al., 2013), pour cela nous avons estimé nécessaire de déterminer l'impact de ce traitement sur la structure et la fonctionnalité de ces protéines.

2.1. Traitement de la DIC

L'application du traitement de la DIC sur les protéines du lactosérum est réalisée dans l'unité DIC à l'échelle du laboratoire (fourni par ABCAR-DIC Process, La Rochelle, France). Brièvement, le traitement de la DIC est appliqué sur les protéines du lactosérum par deux méthodes : à base sèche (DIC-S) où les protéines du lactosérum avaient une teneur en humidité de 3%, et à base humide (DIC-H) où les protéines du lactosérum ont été réhumidifiées et avaient une teneur en humidité de 15%.

La Détente Instantanée Contrôlée (DIC) est un traitement thermique de type Haute Température Courte Durée HTST (*High Temperature Short Time*). Elle repose sur l'exposition d'un produit partiellement humide à une pression de vapeur ($P < 1$ MPa) à haute température (< 180 °C) pendant une courte durée suivie par une chute instantanée de la pression vers le vide (3-5 kPa/ Δt 20-200 ms). Le procédé est contrôlé à divers niveaux de température (± 2 °C), de pression ($\pm 0,01$ MPa), de pression du vide (± 100 kPa) et de la durée de l'opération (± 2 s) (Mahroug et al., 2020; Mounir & Allaf, 2017).

Selon Hamoud-Agha & Allaf, (2019), l'équipement DIC est composé principalement de quatre éléments, comme le montre la figure 17 :

- Un récipient de traitement, qui est un autoclave avec une enveloppe chauffante où le produit à traiter est placé.
- Une vanne pneumatique, qui assure une libération quasi instantanée de la pression de vapeur contenue dans la cuve de traitement vers le réservoir à vide.
- Un système de vide composé d'une pompe à vide et d'un réservoir avec une enveloppe de refroidissement. Le volume du réservoir est généralement 100 à 130 fois supérieur au volume de la cuve de traitement. Une pompe à anneau d'eau maintient la pression du réservoir à environ 2,5-5 kPa.
- Un piège à extrait utilisé pour récupérer les condensats.

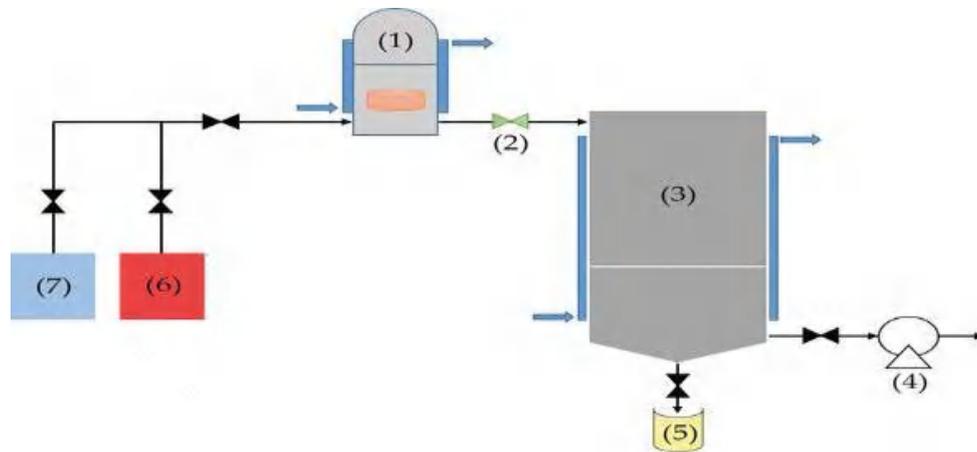


Figure 17 : Présentation schématique d'un réacteur DIC typique : (1) cuve de traitement, (2) vanne de chute de pression instantanée contrôlée, (3) réservoir à vide avec chemise de refroidissement, (4) pompe à vide, (5) piège de collecte des extraits condenseur, (6) générateur de vapeur et (7) compresseur d'air

Dans le présent travail, la méthodologie de la surface de réponse (MSR) a été réalisée avec un plan d'expériences composite centré CCD (central composite design) à deux facteurs (température et temps) pour chaque application (sèche et humide) (tableau 10). Les expériences ont été réalisées dans une plage de pression allant de 0,2 à 0,5 MPa équivalent à une plage de température de 120 à 158 °C et un temps de maintien compris entre 15 et 45s. Le choix de cet intervalle est basé sur une étude précédente de l'allergénicité qui a montré une diminution de 80% de l'allergénicité des protéines du lactosérum. (Boughelout, 2015).

Le CCD a été défini avec 2- paramètres/5 niveau, pour un total de 19 essais avec sept répétitions du point central (tableau 11).

Tableau 10 : Design expérimental du plan CCD pour le traitement de DIC

Point	P (MPa)	T (s)
min (-a)	0,20	15,0
(-1)	0,24	19,4
Point central	0,35	30,0
(+1)	0,46	40,6
Max (+a)	0,50	45,0

Tableau 11 : Matrice du plan d'expérience CCD du traitement DIC (humide et sèche).

Échantillons	P (MPa)	T (s)
H1/S1	0,35	30,0
H2/S2	0,50	30,0
H3/S3	0,35	45,0
H4/S4	0,35	30,0
H5/S5	0,46	40,6
H6/S6	0,46	19,4
H7/S7	0,35	30,0
H8/S8	0,24	19,4
H9/S9	0,24	40,6
H10/S10	0,35	30,0
H11/S11	0,20	30,0
H12/S12	0,35	15,0
H13/S13	0,35	30,0
H14/S14	0,20	15,0
H15/S15	0,50	15,0
H16/S16	0,35	30,0
H17/S17	0,20	45,0
H18/S18	0,50	45,0
H19/S19	0,35	30,0

P: Pression; t: Temps; S: Application de la DIC à base sèche (DIC-S); H: application de la DIC à base humide (DIC-H).

2.2. Détermination des modifications de la structure des protéines du lactosérum

2.2.1. Quantification des protéines du lactosérum par FPLC

Afin de mieux apprécier les changements induits par le traitement de la DIC sur la structure quaternaire des protéines du lactosérum, nous avons procédé à la détermination de la concentration des principales protéines natives et celles traitées par la DIC par chromatographie de filtration sur gel en utilisant le système FPLC de pharmacia (Uppsala, Suède).

Le détail de la méthode a été donné dans la partie précédente.

La concentration de β -Lg, α -La et BSA dans chaque dispersion des protéines natives et traitées par la DIC a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant les valeurs de

surface. La courbe d'étalonnage (figure18) a été réalisée à différentes concentrations de β -Lg (0,05-12 mg/mL), α -La (0,05-8 mg/mL), et BSA (0,04-2 mg/mL). Les taux de dénaturation ont été calculée à partir de ces concentrations.

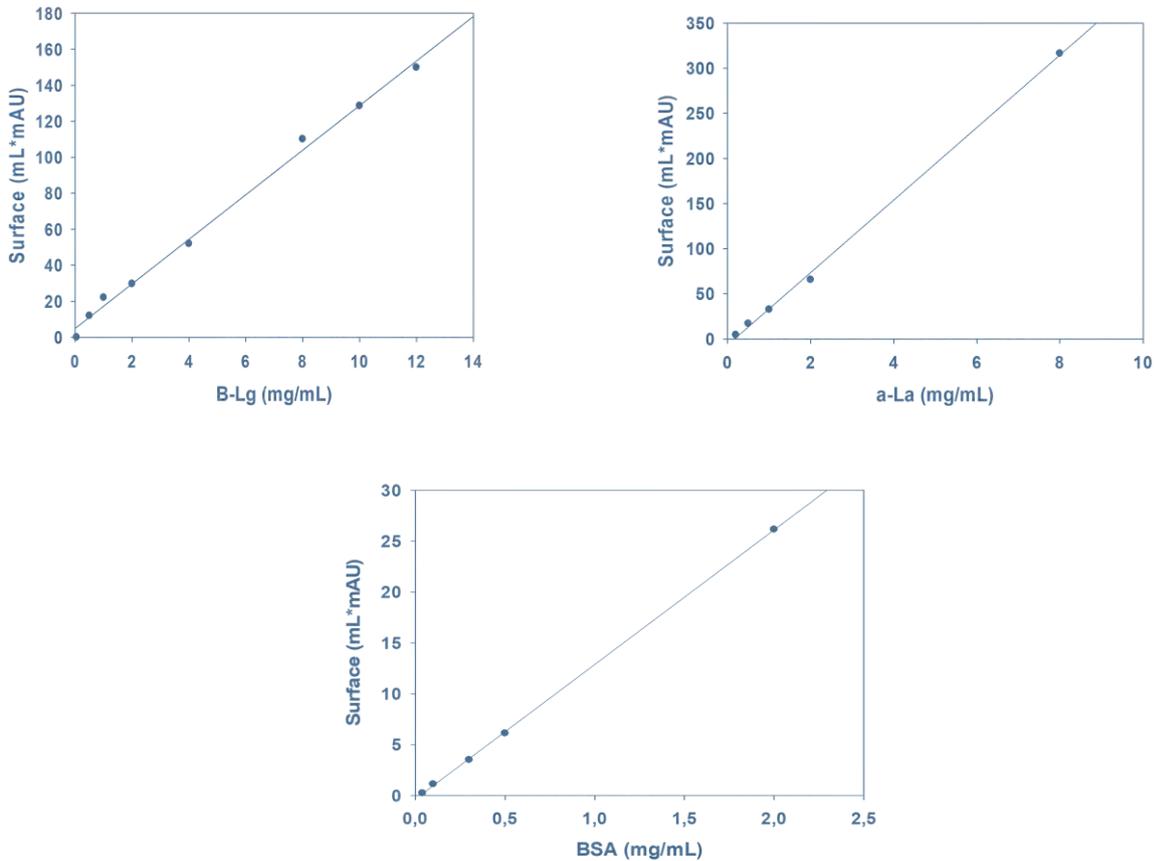


Figure 18 : Courbe étalonnage de β -Lg, α -La et BSA

2.2.2. Détermination de la teneur en groupements thiols libres (SH)

Le thiol est un groupe sulfhydryle (-SH) composé d'un atome de soufre et d'un atome d'hydrogène attaché à un atome de carbone, ces groupes (-SH) peuvent subir une réaction d'oxydation et former des liaisons disulfure (S-S) (pont disulfure). L'analyse des groupes thiols libres et des disulfures fournit des informations importantes sur la structure conformationnelle des protéines, étant donné le rôle important que ces groupes jouent dans leur stabilité (Ambrosi et al., 2016).

Afin de déterminer les changements induits par le traitement de la DIC sur la stabilité de la structure des protéines du lactosérum, la teneur en groupements thiols libres des protéines natives et traitées par la DIC ont été évaluées par une méthode colorimétrique en utilisant

l'acide 5,5'-Dithiobis 2-Nitrobenzoïque (DTNB) selon les protocoles rapportés par (Jansens et al., 2011). Cette méthode utilise le DTNB, aussi appelé réactif d'Ellman, en présence de thiols, le DTNB est clivé et libère une molécule d'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction présentée dans la figure 19.

Des solutions de 10 mg/mL sont préparées dans le tampon d'échantillon [Tampon phosphate 0,05M, pH 6,5 contenant 2% de SDS (p/v), 3M urée et 1 mM EDTA (éthylène diamine tétra acetic acid)]. Après avoir vortexé les échantillons toutes les 15 min pendant 1h, 400 µL de réactif de DTNB [0,1 % DTNB dans le tampon d'échantillon (p/v)] sont ajoutés pour chaque échantillon, puis incubé pendant 45 min avec vortexage intermittent, ensuite, le surnageant a été récupéré et filtré sur un papier filtre de 0,45 µm après une centrifugation à 3000g à température ambiante pendant 10 min. Finalement, l'absorbance du filtrat est mesurée à 412 nm en utilisant (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) et la valeur obtenue a été divisée par le coefficient d'extinction molaire de 13,600 pour obtenir la teneur en groupement thiols, exprimée en µmol/g de protéine. Les groupes sulfhydryles libres ont été évaluée selon (Ambrosi et al., 2016) et calculés comme suit :

$$SH (\mu\text{mol/g}) = 73,53 \times A_{412} \times \frac{D}{C}$$

Où : A: absorbance à 412 nm;

D: facteur de dilution;

C: concentration des protéines du lactosérum (mg/mL).

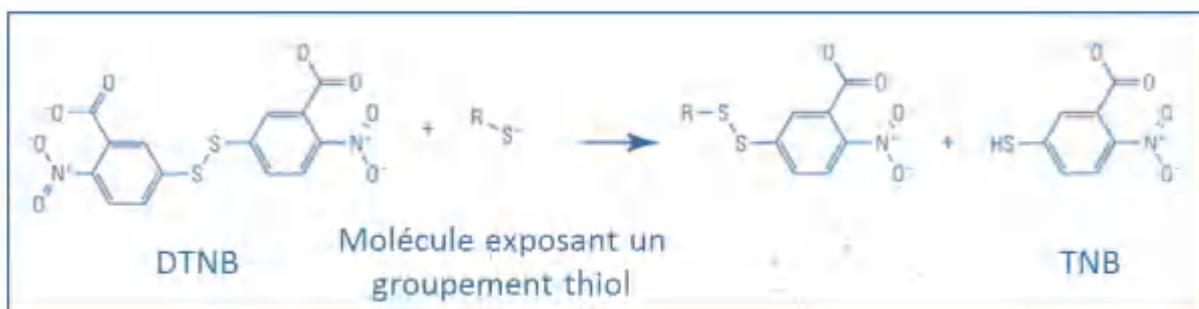


Figure 19 : Réaction de DTNB en présence de thiols

2.2.3. Profils électrophorétique par SDS-PAGE des protéines du lactosérum traitées par la DIC

La détermination des profils des fractions protéiques des protéines du lactosérum natives et traitées par la DIC par SDS –PAGE a été réalisée selon la méthode (Schägger & Von Jagow,

1987) afin d'apprécier les changements induits par ce traitement. La méthode a été détaillée dans la partie précédente.

2.3. Détermination des propriétés techno-fonctionnelle

La structure des protéines peut être changée lorsqu'elles sont soumises à des traitements physiques, ces changements conduisent à des propriétés techno-fonctionnels différentes (Nunes et Tavares, 2019). Dans le but d'apprécier les changements des propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum par le traitement par DIC, nous avons étudié six (06) propriétés : la solubilité, l'indice de l'activité émulsifiante (IAE), le pouvoir moussant et la stabilité de la mousse, la capacité d'absorption de l'eau (CAE) et de l'huile (CAH) pour les deux applications de DIC (à base sèche et humide).

2.3.1. Solubilité

La solubilité a été déterminée selon le protocole de Isah et al. (2017) avec une légère modification. 10 mg des protéines du lactosérum ont été suspendus dans 10 mL d'eau distillée, le mélange est laissé durant une nuit (16h) à température ambiante. Le mélange a été centrifugé à 4000 g pendant 15 min. Le surnageant est soigneusement éliminé jusqu'à ce qu'aucune eau ne soit observée. Les tubes ont été séché à 105 °C jusqu'à évaporation de toute la quantité d'eau (4-6h) puis pesés.

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{\text{Masse de l'aliquote séché (mg)}}{\text{Masse initiale d'échantillon (mg)}} \times 100$$

2.3.2. Indice de l'activité émulsifiante (IAE)

L'indice de l'activité émulsifiante (IAE) de la dispersion (1%, w/v) des protéines du lactosérum à pH 6,4 a été déterminée selon la méthode de (Chicón et al., 2009; Chobert et al., 1988), la méthode a été détaillée dans la partie précédente.

2.3.3. Activité et stabilité moussante

L'activité moussante de la dispersion (1%, w/v) a été déterminée selon la méthode Caessens et al. (1997) qui a été détaillée dans la partie précédente.

Pour déterminer la stabilité de la mousse, après formation de la mousse (après l'homogénéisation), elle est laissée au repos pendant 30 min à température ambiante ensuite le volume du liquide drainé est mesuré (Díaz et al., 2004). La stabilité moussante est déterminée selon la formule suivante:

$$\text{Stabilité moussante (\%)} = \frac{V_0 - V_{30}}{V_{30}} \times 100$$

Où : V_0 : Volume après l'homogénéisation;

V_{30} : Volume après de drainage.

2.3.4. Capacité d'absorption de l'eau (CAE) et de l'huile (CAH)

La capacité d'absorption d'eau (CAE) et d'huile (CAH) sont des propriétés fonctionnelles essentielles dans la fabrication de produits tels que les beignets, les crêpes, les produits de boulangerie, les desserts, les confiseries, les boissons, les sauces à salade...etc. Ces propriétés influencent la saveur, la texture, la sensation en bouche et le rendement du produit (Wang et al., 2020).

La capacité d'absorption d'eau et d'huile (CAH) des échantillons des protéines du lactosérum est déterminée selon le protocole de Isah et al. (2017). 1g d'échantillon a été ajouté à 10 mL d'eau distillée ou 10 mL d'huile de jojoba et incubé à 60 °C pendant 30 min dans un bain marie, puis centrifugés à 1000 rpm pendant 15 min à température ambiante. Le surnageant est éliminé. Le mélange est soigneusement décanté jusqu'à ce qu'aucune trace d'eau ou d'huile n'est observable à l'intérieur du tube. Le résidu est ensuite pesé.

La CAE et la CAH sont déterminées selon les formules suivantes:

$$\text{CAE (g H}_2\text{O/ g échantillon)} = \frac{\text{Masse finale d'échantillon (g)} - \text{Masse initiale d'échantillon (g)}}{\text{Masse initiale d'échantillon (g)}}$$

$$\text{CAH (g Huile/ g échantillon)} = \frac{\text{Masse finale d'échantillon (g)} - \text{Masse initiale d'échantillon (g)}}{\text{Masse initiale d'échantillon (g)}}$$

3. Analyse statistique

La totalité des essais ont été répétés trois fois, ils sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart type. La différence entre les moyennes, la corrélation entre les facteurs de traitement de DIC (P et t) et les réponses des variables sont déterminée par l'analyse de la variance (ANOVA) à régressions multiples à l'aide du logiciel Minitab 19 Statistical Software, et le test de Tukey à un et deux facteurs. Les surfaces de réponses ont été tracées sous forme 3D par Statistica (Version 10; Tulsa, Oklahoma, USA). La relation entre les propriétés chimiques et technofonctionnelles des protéines du lactosérum traité par la DIC a été évaluée par analyse principale des composants (APC) en utilisant XLSTAT 2021. La signification statistique a été acceptée à un niveau de $p < 0,05$.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

1. Impact de l'hydrolyse sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum

1.1. Caractéristiques des extraits enzymatiques

1.1.1. Caractéristiques physicochimiques

Les caractéristiques physicochimiques des extraits bruts de la ficine et de la pepsine du poulet sont présentées dans le tableau 12.

L'extraction de la ficine à partir du latex a été effectuée par centrifugation (3200g pendant 15 min à 4 °C). Le latex utilisé dans ce travail contient approximativement 40% (v/v) de gommes avec un rendement d'extraction d'environ 60% (12 mL de l'extrait de la ficine brute pour 20 mL de latex). Ce rendement est inférieur à celui obtenu par Di Pirro et al. (2014), qui ont rapporté un rendement de 85,71% (12 mL de la ficine brute pour 14 mL de latex) avec 14,29% (v/v) de matière gommeuse.

L'extrait clarifié de la ficine est de couleur jaune avec un pH de 5,43, d'un extrait sec de 12,94% contenant 71,74 % des protéines. Cet extrait a montré une activité protéolytique de 88,41 U/ml pour le substrat d'hémoglobine avec une activité spécifique de 2 490,42 U/ mg de protéines et 31,16 U/mL pour le substrat d'azocaséine avec une activité spécifique de 1 236,50 U/ mg de protéines. Les résultats obtenus sont proches de ceux obtenus par Zare et al. (2013) qui ont rapporté que l'extrait de la ficine de couleur claire et paille, contenait 87,2% d'eau et 12,8% d'extrait sec. D'un autre côté, Sgarbieri et al. (1964) ont rapporté qu'une solution aqueuse de *F. carica* ne contenait que 10 à 17,5% de protéines totaux, et environ 90% de ces protéines ont une activité protéolytique. Cette différence peut être expliquée par les différences climatiques entre les régions de collecte du latex ainsi que les caractéristiques du sol pouvant influencer la composition du latex. Pour l'activité protéolytique, Fadyloğlu, (2001) ont rapporté une activité protéolytique de 320 U/mL sur le substrat de caséine.

L'extrait clarifié de la pepsine du poulet obtenu selon le protocole proposé par Bohak (1970), a montré un rendement de 5,40%. 100 g de proventricules ont permis de récupérer 5,40g (258 mL) d'extrait enzymatique clarifié sec. L'extrait de la pepsine récupéré, est une solution jaunâtre caractérisée par un pH de 6,4, un extrait sec de 5,40 % contenant 50,12% des protéines, aussi l'extrait de la pepsine du poulet a montré une activité protéolytique de 21,93U/ml pour le substrat d'hémoglobine avec une activité spécifique de 877,2 U/ mg de protéines, et 0,79 U/mL pour le substrat d'azocaséine avec une activité spécifique de 1,58 U/mg de protéines (tableau 12).

Tableau 12 : Caractéristiques des extraits enzymatiques bruts

Variables	Ficine	Pepsine du poulet
Rendement (%)	60	5,4
Extrait sec (%)	18,26 ± 0,90	5,40 ± 0,34
Extrait pH	5,43 ± 0,03	6,4 ± 0,03
Protéines totales (%)	71,74 ± 1,07	50,12 ± 0,67
Couleur	Jaune	Jaunâtre
Activité protéolytique		
Hémoglobine (U)	88,41 ± 1,03	21,93 ± 0,24
Azocaséine (U/mL)	31,16 ± 1,02	0,79 ± 0,02
Activité spécifique		
Hémoglobine (U/ mg de protéine)	2 490,42 ± 28,44	877,2 ± 9,57
Azocaséine (U/ mg protéine)	1 236,50 ± 40,47	1,58 ± 0,048

1.1.2. Profils électrophorétiques SDS-PAGE des extraits enzymatiques

L'électrophorèse SDS-PAGE a été effectuée pour confirmer la présence et le poids moléculaire des deux enzymes (ficine et pepsine du poulet) dans les extraits obtenus. La figure 20 présente les profils électrophorétiques des deux extraits enzymatiques.

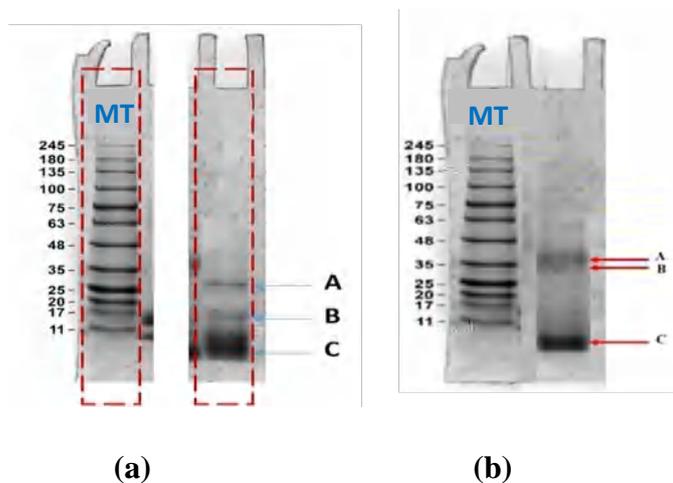


Figure 20 : Profils électrophorétiques des extraits enzymatiques de la ficine (a) et de la pepsine du poulet (b). MT: Marqueur de taille

Le profil électrophorétique de l'extrait de la ficine (figure 20.a), a montré la présence d'une bande très intense (A) avec un poids moléculaire d'environ 27,5 kDa, cette bande représente la ficine. Selon Gagaoua et al. (2014), le poids moléculaire de la ficine se trouve généralement dans la plage de 20 à 35 kDa, alors que Payane, (2009) a signalé que son poids moléculaire est compris entre 25 et 26 kDa. Deux autres bandes (B et C) sont identifiées dans le gel de l'extrait de la ficine. La bande (B) ayant un poids moléculaire de 15 kDa, pourrait représenter les produits de l'autolyse de l'enzyme, alors que la bande (C) ayant poids

moléculaire de 11 kDa est considérée comme impuretés. Siar et al. (2017) ont rapporté que divers peptides produits par l'autolyse de la ficine ont un poids moléculaire entre 14 et 18 kDa.

Le profil de l'extrait de la pepsine du poulet (figure 20.b) montre deux bandes intenses A et B d'un poids moléculaire environ de 37 et 33 kDa respectivement, qui représentent la pepsine du poulet. Selon Bohak, 1969; Green et Lewellin, 1973, le poids moléculaire de la pepsine du poulet est de 34 kDa. Nous remarquons une autre bande (C) qui est apparue dans le gel, elle est considérée comme des produits de l'autolyse de l'enzyme ou des impuretés du fait que l'extrait n'a pas été purifié.

1.1.3. Conditions optimales de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques

Dans le but de déterminer les conditions physico-chimiques optimales pour l'action des extraits de la ficine, et de la pepsine du poulet, nous avons déterminé l'influence du pH et la température sur leurs activités.

1.1.3.1. Effet du pH

L'influence du pH sur l'activité protéolytique des extraits de la ficine et de la pepsine du poulet a été étudiée par l'ajustement des pH de l'enzyme et l'hémoglobine de 5 à 8,5 pour la ficine et de 1 à 5,5 pour la pepsine du poulet. L'hydrolyse a été réalisée à une température de 37 °C. La figure 21 montre l'évolution de l'activité protéolytique de chaque extrait enzymatique en fonction du pH.

Les résultats indiquent que l'activité protéolytique augmente avec l'augmentation du pH du milieu jusqu'à une activité optimale pour chaque enzyme, au-delà de ce pH nous observons une diminution de l'activité à cause de l'inactivation de l'enzyme.

L'activité protéolytique maximale de l'extrait de la ficine se situe entre le pH 7 et 8 avec un optimum à 7,5 correspondant à une activité de 111,7 U. L'enzyme est plus active dans la gamme du pH neutre à basique que le pH acide. Plusieurs travaux ont étudié l'activité coagulante de l'extrait de la ficine, mais aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent sur son activité protéolytique proprement dite. Devaraj et al. (2011), ont rapporté que la ficine est active dans la plage du pH de 6,5 à 8,5 avec une activité optimale à pH 7, et inactive à pH < 3. Grzonka et al. (2007), ont signalé qu'elle est très active dans la gamme du pH de 5 à 8. La différence du pH optimum de l'activité de la ficine dépend principalement du substrat utilisé, selon Gagaoua et al. (2014) le pH optimum de la ficine est de 7,5 et 6,7 pour les substrats de la gélatine et la caséine respectivement. A des pH acide, l'enzyme est presque inactive.

Pour l'extrait de la pepsine du poulet, le pH optimum est de 2 avec une activité de 50 U et se stabilise à pH 5,5. Cette activité est inférieure à celle rapportée par Bohak, (1969) qui ont signalé que le pH optimum de la pepsine du poulet sur l'hémoglobine est de 2,8 alors que Crevieu-Gabriel et al. (1999) ont rapporté que le pH optimal est de 2,5 à 3 sur l'hémoglobine. Probablement, la différence du pH optimal de l'activité de la pepsine du poulet est due aux conditions d'extraction de l'enzyme, et la qualité des proventricules utilisés (l'âge et l'espèce du poulet).

Nous avons remarqué également que l'activité protéolytique de la ficine est nettement supérieure à celle de la pepsine du poulet et quel que soit le pH.

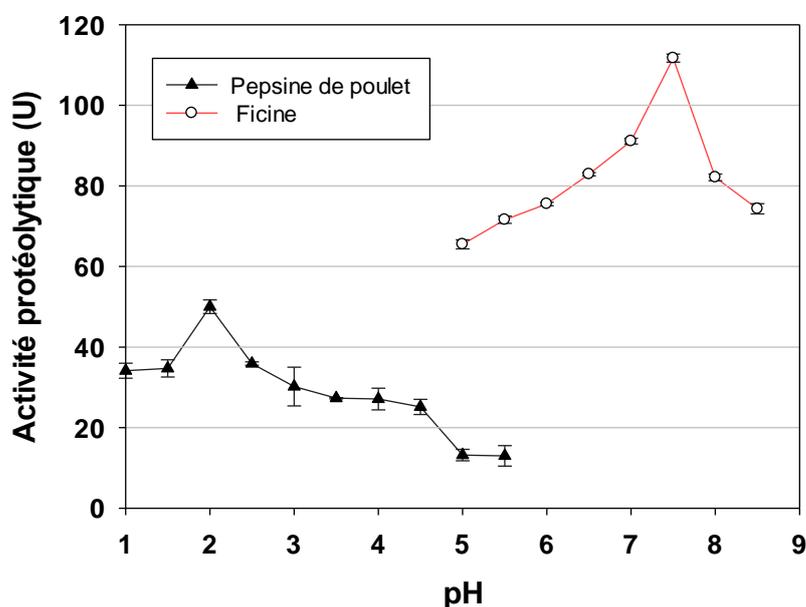


Figure 21: Effet du pH sur l'activité protéolytique des extraits enzymatiques

1.1.3.2 Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité protéolytique des deux extraits enzymatiques étudiés est déterminé par la mesure l'activité protéolytique dans une plage de température de 35 et 90 °C au pH optimal de chaque enzyme. La figure 22 montre l'évolution de l'activité protéolytique des extraits enzymatiques en fonction de la température.

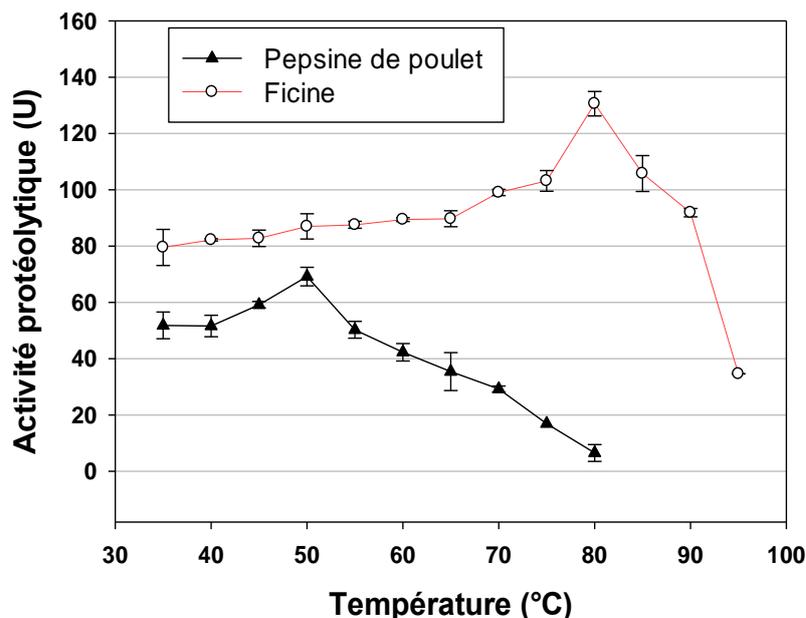


Figure 22 : Effet de la température sur l'activité protéolytique des extraits enzymatique

D'après la figure (22), nous pouvons observer une différence du comportement à l'hydrolyse entre les deux extraits enzymatiques. L'activité protéolytique augmente avec l'augmentation de la température d'incubation jusqu'à la température optimale pour chaque enzyme où l'activité est maximale, au-delà de cette température nous pouvons constater une baisse de l'activité à cause de la dénaturation de l'enzyme par la chaleur.

Pour l'extrait de la ficine, la température optimale est de 80 °C correspondant à une activité de 130,57 U. Ces résultats sont très proches de ceux obtenus par Nouani et al. (2009) où la température optimale a été estimée à 82 °C, et supérieur à ceux rapportés par Fadyloglu, (2001) où la température optimale est de 60 °C. Ces résultats confirment la thermostabilité de la ficine déclarée par plusieurs auteurs (Nassar et al., 1987; Grzonka et al., 2007; Feijoo-Siota et al., 2011 et Bekhi et al., 2013).

Pour l'extrait de la pepsine du poulet, la température optimale est de 50 °C correspondant à une activité de 70 U. Ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par Nouani et al. (2011) qui ont estimé la température optimale de la pepsine du poulet à 40 °C.

Nous pouvons également noter que l'activité protéolytique de la ficine est nettement plus élevée sur tout l'intervalle de température, elle est deux fois plus élevée celle de la pepsine du poulet quel que soit la température.

1.2. Caractéristiques des hydrolysats

Afin d'étudier l'impact de l'hydrolyse sur les protéines du lactosérum, nous avons suivi une cinétique de l'hydrolyse durant 6h par les deux extraits enzymatiques préparés (ficine et pepsine du poulet) en les comparant aux produits de l'hydrolyse par la pepsine porcine. Nous avons étudié deux ratios E/S de 0,5 % (1:200) et 1% (1:100). L'hydrolyse des protéines du lactosérum a été effectuée aux conditions optimales des deux enzymes déterminées précédemment, la ficine à pH 7,5/80 °C et la pepsine du poulet à pH 2/50 °C. Pour la pepsine porcine nous avons suivi les recommandations du fournisseur pH 1,6/37 °C.

1.2.1. Degré d'hydrolyse (DH)

L'évolution de l'hydrolyse des protéines du lactosérum par la ficine, la pepsine du poulet et la pepsine porcine à 0, 0,5, 1, 2, 4 et 6 h pour les deux ratios E/S est présentée en figures (23.a, b, c, d, e).

Le DH augmente significativement avec l'augmentation du temps. La cinétique de l'hydrolyse est divisée en trois phases, une première phase à vitesse rapide durant les premières 30 min du traitement enzymatique, suivi d'une phase à vitesse d'hydrolyse réduite de la première à la 5^{ème} heure. A partir de la 5^{ème} heure l'hydrolyse semble se stabiliser et l'augmentation du DH semble nulle pour la ficine (figure 23.a) alors que pour les deux pepsines (24.b et 24.c), la vitesse semble en augmentation continue à très faible vitesse et peut encore se poursuivre au-delà des 6 h étudiées.

Le taux d'hydrolyse des protéines du lactosérum par la ficine est significativement ($p < 0,05$) supérieure à celui des deux pepsines, alors que la différence n'est pas significative entre les deux pepsines (figure 23.d et 23.e).

Le DH maximal atteint est de 37,57% après 6h à un ratio E/S de 1% pour la ficine, et atteint déjà 35,36% après 2h de traitement. La poursuite de l'hydrolyse au-delà de 2h n'est pas intéressante car la différence n'est plus significative au-delà de ce temps. Le DH maximal atteint pour la pepsine du poulet est de 13,36% et est de 12,51% pour la pepsine porcine pour le ratio E/S de 1%.

Pour le ratio E/S de 0,5%, le DH maximal atteint est de 35,7% pour la ficine, alors qu'il est de 12,87% et 11,66% seulement pour la pepsine du poulet et la pepsine porcine respectivement après 6h d'hydrolyse.

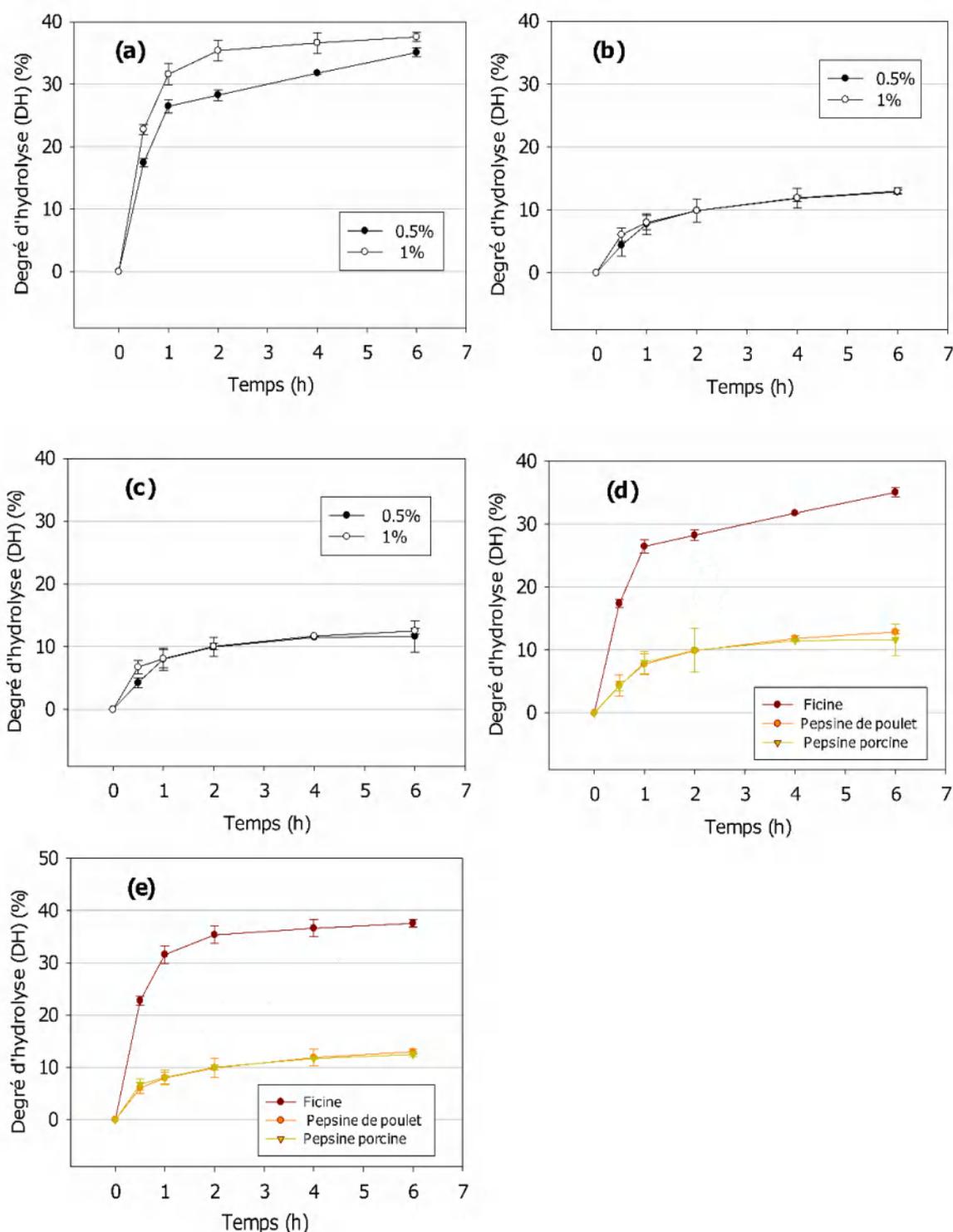


Figure 23 : Degré d'hydrolyse (DH) en fonction de temps pour les trois enzymes aux deux ratios E/S. Hydrolyse des protéines du lactosérum par **(a)**: Ficine; **(b)**: Pepsine du poulet; **(c)**: Pepsine porcine; **(d)**: Trois enzymes à ratio E/S de 0,5%; **(e)**: Trois enzymes à ratio E/S de 1%

L'analyse statistiques par le modèle de régression linéaire a montré une différence significative ($p < 0,05$; $R^2 = 0,99$) entre les deux ratios E/S (1% et 0,5%) pour l'enzyme de la ficine, et aucune différence significative pour les deux pepsines.

Aucune étude n'a été réalisée sur l'impact de la ficine sur les protéines du lactosérum, cependant les études de l'impact d'autres protéases sur ces protéines ont montré un effet très réduit. Dryáková et al. (2010), ont rapporté un DH des protéines du lactosérum de 7%, 15,2%, 3,8% et 2,5% par l'hydrolyse par l'alcalase, la flavourzyme, la neutrase et la protamex respectivement pour un ratio de 1%, alors que Kim et al. (2007) ont signalé un DH de 11% par la pepsine porcine après 2h (avec ratio E/S 1%).

Ces résultats démontrent que la ficine a un fort pouvoir protéolytique sur les protéines du lactosérum supérieur à celui des deux pepsines étudiées et nettement supérieur à toutes les protéases rapportées par la bibliographie. Il semble que la thermostabilité de la ficine a favorisé le déploiement des protéines toute en augmentant leur exposition à l'action de l'enzyme à des températures élevées.

La sensibilité des protéines à l'action des enzymes dépend du type de l'enzyme, leur spécificité, et la disposition des régions sensibles au clivage dans la structure du substrat protéique. Par exemple, l' α -La est résistante à l'action de l'hydrolyse par la trypsine alors que la β -Lg est résistante à la pepsine (Cheison et al., 2012).

Selon Kleekayai et al. (2020), le DH ne donne qu'une indication de l'étendue globale du clivage des liaisons peptidiques en comparaison avec la protéine non hydrolysé.

La thermo-stabilité des enzymes est toujours recherchée dans l'industrie alimentaire ainsi que d'autres technologies non alimentaires. L'application des protéases exige souvent qu'elles maintiennent une activité élevée dans des conditions non physiologiques telles que des températures et des pH élevés, en présence d'agents chélateurs de calcium intensifs et des détergents (Li et al., 2013). Une thermo-stabilité élevée est une propriété critique requise des protéases pour les applications dans les détergents à lessive par exemple. La ficine est une enzyme thermostable qui peut être convenable pour d'autres industries exigeant des températures élevées et une activité protéolytique élevée.

1.2.2. Longueur moyenne de la chaîne peptidique (LMCP)

Les longueurs moyennes des chaînes peptidiques (LMCP) des hydrolysats obtenus par la ficine, la pepsine du poulet et la pepsine porcine sont présentées en figure (24).

Les LMCP des hydrolysats de la ficine sont significativement ($p < 0,05$) plus faible par rapport à celles des deux pepsines, alors qu'il n'existe aucune différence significative entre les deux pepsines.

D'une manière générale, les longueurs moyennes des chaînes peptidiques (LMCP) diminuent avec l'augmentation du degré d'hydrolyse (DH). Les hydrolysats de la ficine sont composés essentiellement de peptides de faible taille avec 3 résidus d'acides aminés pour le DH maximal (37%), il se stabilise à cette valeur après 4h pour le ratio de 0,5%, et après 1h pour le ratio de 1%.

Les LMCP des hydrolysats de la pepsine du poulet et de la pepsine porcine sont composés de résidus de 6 à 10 acides aminés respectivement pour un ratio de 0,5% après 6h.

L'analyse statistique indique qu'il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre les deux ratios testés (0,5 et 1%) pour les LMCP calculées des hydrolysats de la ficine, alors que la différence n'est pas significative pour les hydrolysats des deux pepsines. Aussi, le temps a un effet significatif ($p < 0,05$) sur LMCP calculé pour les trois enzymes.

Ces résultats sont en accord avec les résultats du DH, donc la ficine présente une grande affinité à l'hydrolyse des protéines du lactosérum, contrairement à la pepsine du poulet et la porcine qui ont une faible affinité.

Dryáková et al. (2010) ont indiqué que les LMCP des hydrolysats des protéines du lactosérum par l'acalase et la flavourzyme sont de 9 et 3 acides aminés respectivement. Il a également été rapporté que les hydrolysats peptiques étaient composés de long peptides (plus de 7 acides aminés) (Embiriekah et al., 2018).

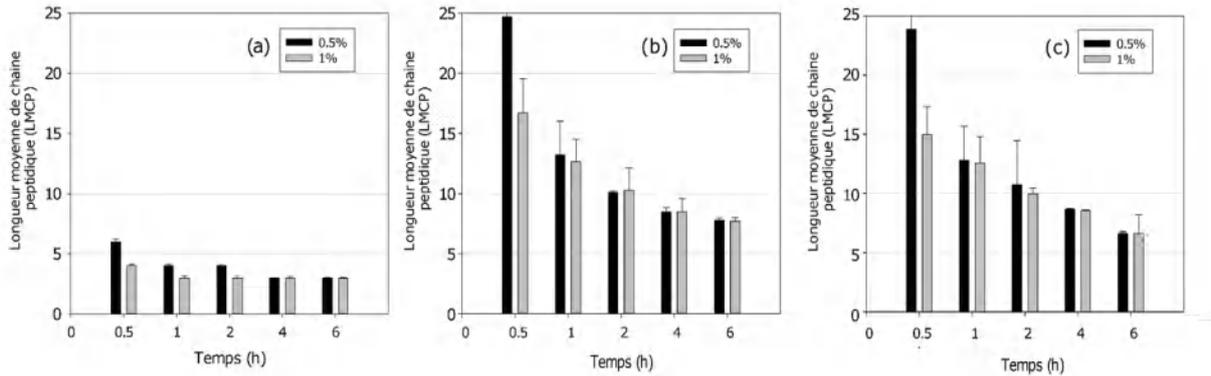


Figure 24 : Longueur moyenne de chaîne peptidique (LMCP) des hydrolysats des trois enzymes en fonction de temps pour les deux ratios E/S. (a): *Hydrolysats de la ficine*, (b): *Hydrolysats de la pepsine du poulet* et (c): *Hydrolysats de la pepsine porcine*.

1.2.3. Profil électrophorétique des hydrolysats

Les profils électrophorétiques des hydrolysats des protéines du lactosérum pour les trois enzymes à différents temps d'hydrolyse (0, 0,5, 2 et 6h) et pour les deux ratios E/S (0,5% et 1%) ont été déterminés par SDS-PAGE. Les gels sont présentés en figure (25).

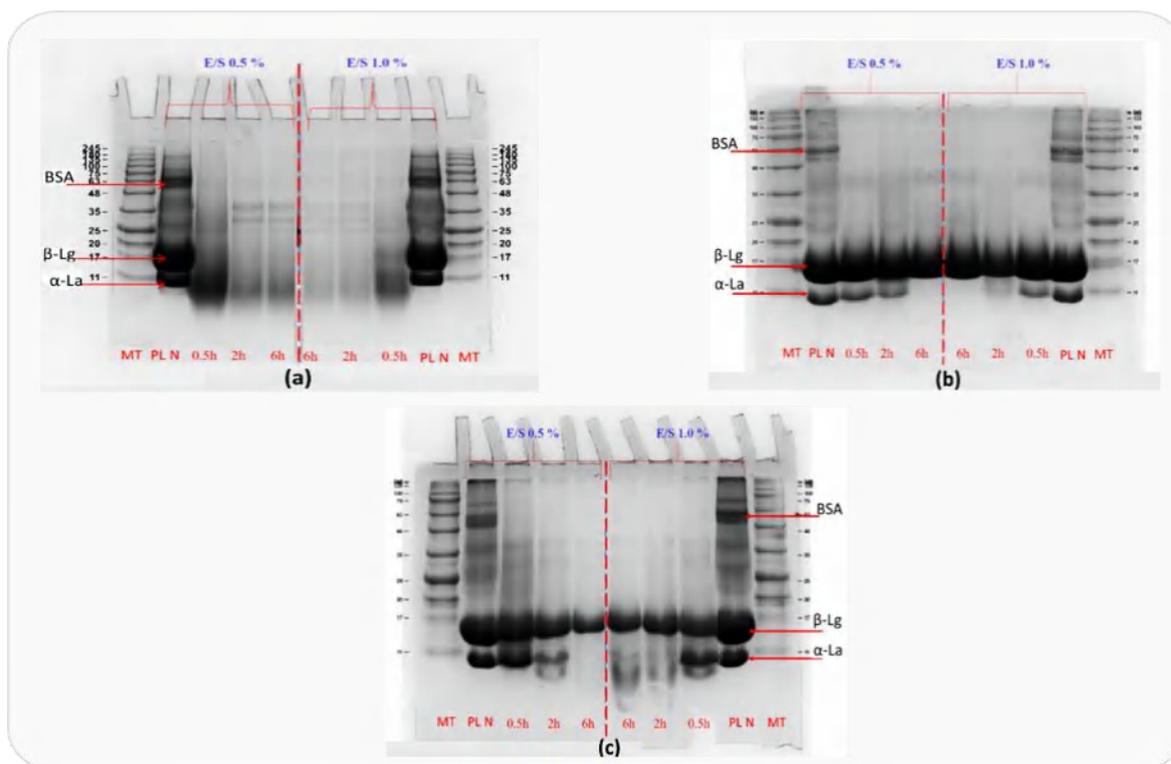


Figure 25 : Profils électrophorétiques des hydrolysats des protéines du lactosérum par les trois enzymes à différents temps d'hydrolyse (0, 0,5, 2 et 6h) pour les deux ratios E/S. **(a)**: Hydrolysats de la ficine, **(b)**: Hydrolysats de la pepsine de poulet; **(c)**: Hydrolysats de la pepsine porcine. **PL. N**: Protéine du lactosérum native. **MT**: Marqueur de taille.

Le profil électrophorétique des hydrolysats de la ficine (figure 25.a) a montré la disparition complète des protéines du lactosérum principalement la β -Lg et l' α -La après 30 min d'incubation pour les deux ratios E/S, ce qui indique leur hydrolyse totale par la ficine. L'hydrolyse est plus poussée pour la ratio 1% que 0,5% où les peptides issus de l'hydrolyse ne sont plus détectés ce qui signifie qu'ils ont un PM très bas et concorde avec les résultats des Longueurs moyennes de chaîne peptidique (LMCP) obtenus.

Les profils électrophorétiques des hydrolysats de la pepsine du poulet (figure 25.b) et la pepsine porcine (figure 25.c) ont montré que la β Lg présente une nette résistance à l'hydrolyse, une grande partie de cette protéine reste intacte après 6h d'hydrolyse pour les deux ratios. L' α -La est plus sensible à l'hydrolyse peptique, la disparition totale de sa bande est notée après 2h pour le ratio E/S 1% et après 6h à un ratio E/S de 0,5% pour les deux pepsines correspondant à leur hydrolyse complète.

Des bandes de poids moléculaires faibles (< 11 kDa) sont apparus après 2h d'hydrolyse et qui sont plus intense pour les hydrolysats de la pepsine porcine, ces bandes ne sont pas détectés pour la pepsine du poulet, ce qui indique que les peptides produits par la pepsine du poulet ont des poids moléculaires plus faibles que les peptides de la pepsine porcine. La

protéolyse des autres protéines du lactosérum comme la BSA s'est produite dans les 30 premières min.

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par la plupart des auteurs, Lin et al. (2012) ont signalé que l' α -La est complètement hydrolysée par la pepsine alors la β -Lg résiste à l'hydrolyse, aussi Shin et al. (2007) ont trouvé que l'hydrolyse des protéines du lactosérum par la combinaison de la papaïne-neutrase conduit à l'hydrolyse complète de α -La après 180 min mais était incapable d'hydrolyser la β -Lg. Selon Mohan et al. (2015), la β -Lg peut être largement résistante à la protéolyse peptique, car à un pH acide, elle était structurellement stable avec plus de liaisons hydrogènes internes qui contribuent à sa résistance de la digestion par la pepsine.

1.2.4. Suivi de l'évolution de l'hydrolyse FPLC

Les profils chromatographiques déterminés par FPLC de l'évolution de l'hydrolyse sont présentés en figures 26, 27, 28 pour les hydrolysats de la ficine, la pepsine du poulet et la pepsine porcine respectivement à différents temps d'hydrolyse (0, 0,5, 2 et 6h) et pour les ratios E/S 0,5% et 1%.

Le profil (a) dans chaque figure représente les protéines natives du lactosérum, comme prévu, il montre clairement les principales protéines, la β -Lg (pic 3 avec un temps de rétention (TR) de 23,5 min; structure dimérique avec une masse moléculaire de 36 kDa), et l' α -La (pic 4 avec un TR de 26,15 min; correspondant à une masse moléculaire 14 kDa). D'autres pics ont également été trouvés comme les protéines mineures tels que les Immunoglobuline (Ig) et la BSA (pics 1 et 2 avec un TR de 14,57 et 19.91 min respectivement et de poids moléculaire de 172 kDa et 69 kDa respectivement).

Comme le montre la figure 26(b-g), le profil FPLC des hydrolysats de la ficine pour les deux ratios E/S indique une disparition progressive de la β -Lg et l' α -La représentés par la réduction des pics 3 et 4 jusqu'à la disparition (après 30 min pour α -La et 1h pour la β -Lg). Nous avons noté également l'apparition de nouveaux pics (5, 6, 7) en fonction du temps d'hydrolyse, ces pics sont apparus à des TR compris entre 30 à 60 min correspondant à des peptides de faible poids moléculaire. Le pic 5 ayant la surface la plus importante représente donc la majorité des peptides produits.

Il est à noter que la ficine affecte également les Ig, ceci est montré par la diminution de la surface du pic 1 au fil du temps.

Les figures 27(b-g) et 28(b-g) correspondent aux profils chromatographiques des hydrolysats produits par la pepsine du poulet et la pepsine porcine respectivement. Il apparaît clairement que le β -Lg (pic 3) est présente tout au long de la cinétique de l'hydrolyse. Il apparaît également une légère diminution de ce pic au cours du traitement enzymatique ce qui signifie une dégradation partielle de la β -Lg par les deux pepsines.

Le pic 4, représentant l' α -La, est réduit en fonction du temps d'hydrolyse jusqu'à sa disparition après 2h pour la pepsine du poulet et 6h pour la pepsine porcine pour le ratio E/S de 1%, et après 6h pour le ratio E/S 0,5% pour les deux pepsines ce qui indiquent sa complète dégradation.

Nous pouvons observer également que l'intensité de la réduction des pics est plus élevée pour les hydrolysats de la pepsine du poulet que pour les hydrolysats de la pepsine porcine, ce qui montre une activité protéolytique de la pepsine du poulet supérieure à celle de la pepsine porcine.

Les pics 5, 6, 7 représentant les peptides produits par l'hydrolyse sont apparus à un TR plus long indiquant un poids moléculaire faible. Le TR des hydrolysats s'étend jusqu'à 40 min pour les hydrolysats des deux pepsines et 60 min pour les hydrolysats de la ficine, ce qui signifie que les peptides de la ficine ont un poids moléculaire plus faible que celui des deux pepsines. Ces résultats ont confirmé ce qui a rapportés précédemment par le degré d'hydrolyse, les LMCP, et la SDS-PAGE.

L'analyse FPLC permet de conclure que le degré d'hydrolyse élevée noté précédemment pour l'hydrolyse par la ficine pourrait s'expliquer par la dégradation complète de la β -Lg qui est la protéine majeure des protéines du lactosérum, en revanche, la faible dégradation de la β -Lg par les deux pepsines explique le faible degré d'hydrolyse.

La ficine a montré une forte activité sur la β -Lg, résultat qui n'a jamais été signalé auparavant avec d'autres enzymes protéolytiques. Barros & Malcata (2006) et Mazorra-Manzano et al. (2020) ont rapporté que la β -Lg présente une résistance très élevée à l'action protéolytique de toutes les protéases acides.

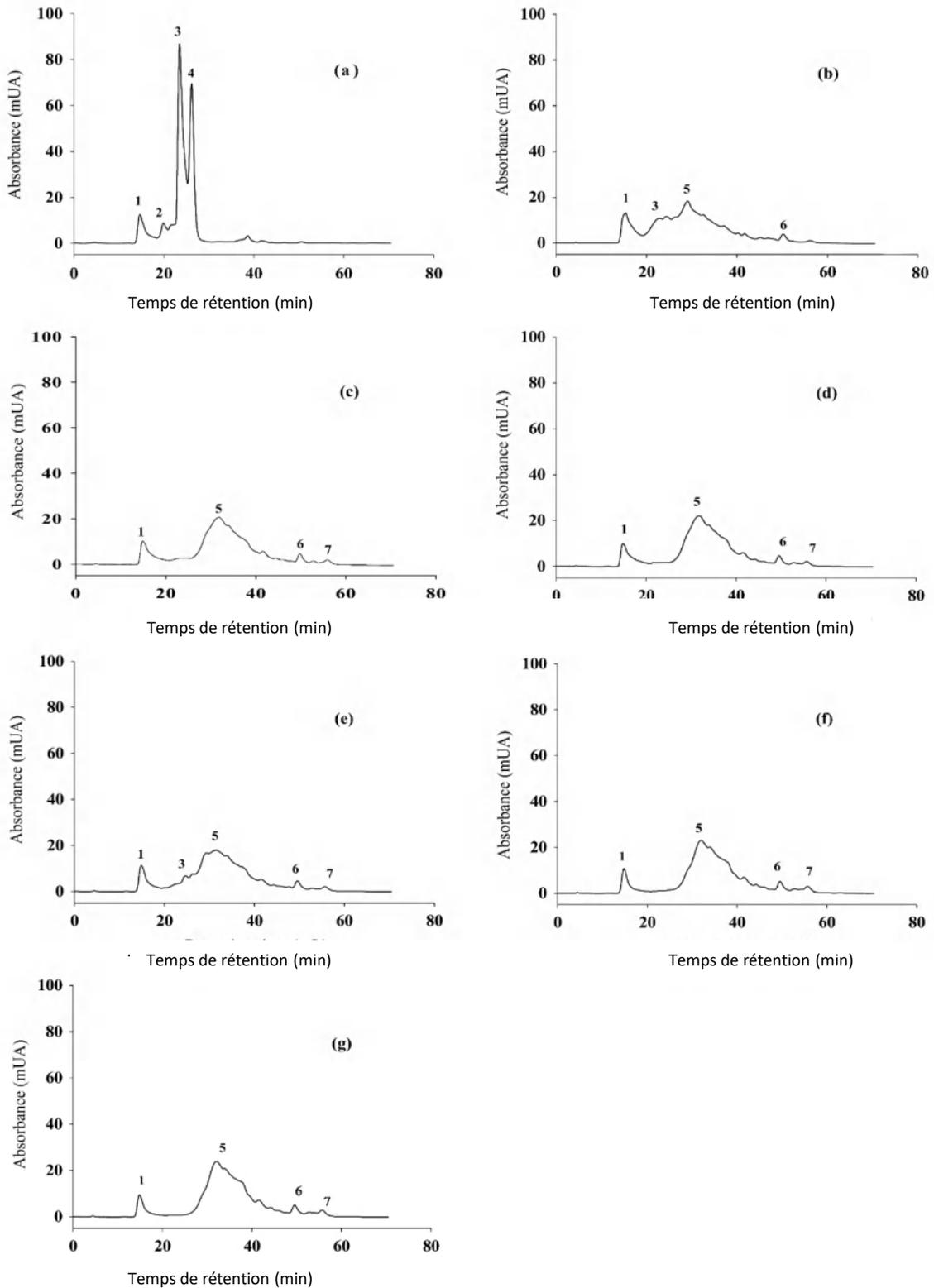


Figure 26 : Chromatogrammes exclusion de taille des: (a) protéines du lactosérum native, et des hydrolysats de la ficine (b) E/S 0,5% à 30 min; (c) E/S 0,5% à 2h; (d) E/S 0,5% à 6h; (e) E/S 1% à 30 min; (f) E/S 1% à 2h; (g) E/S 1% à 6h, mesurée à 280 nm. **1:** Ig; **2:** BSA; **3:** β -Lg; **4:** α -L; **5-7:** Zone de peptides générés par hydrolyse

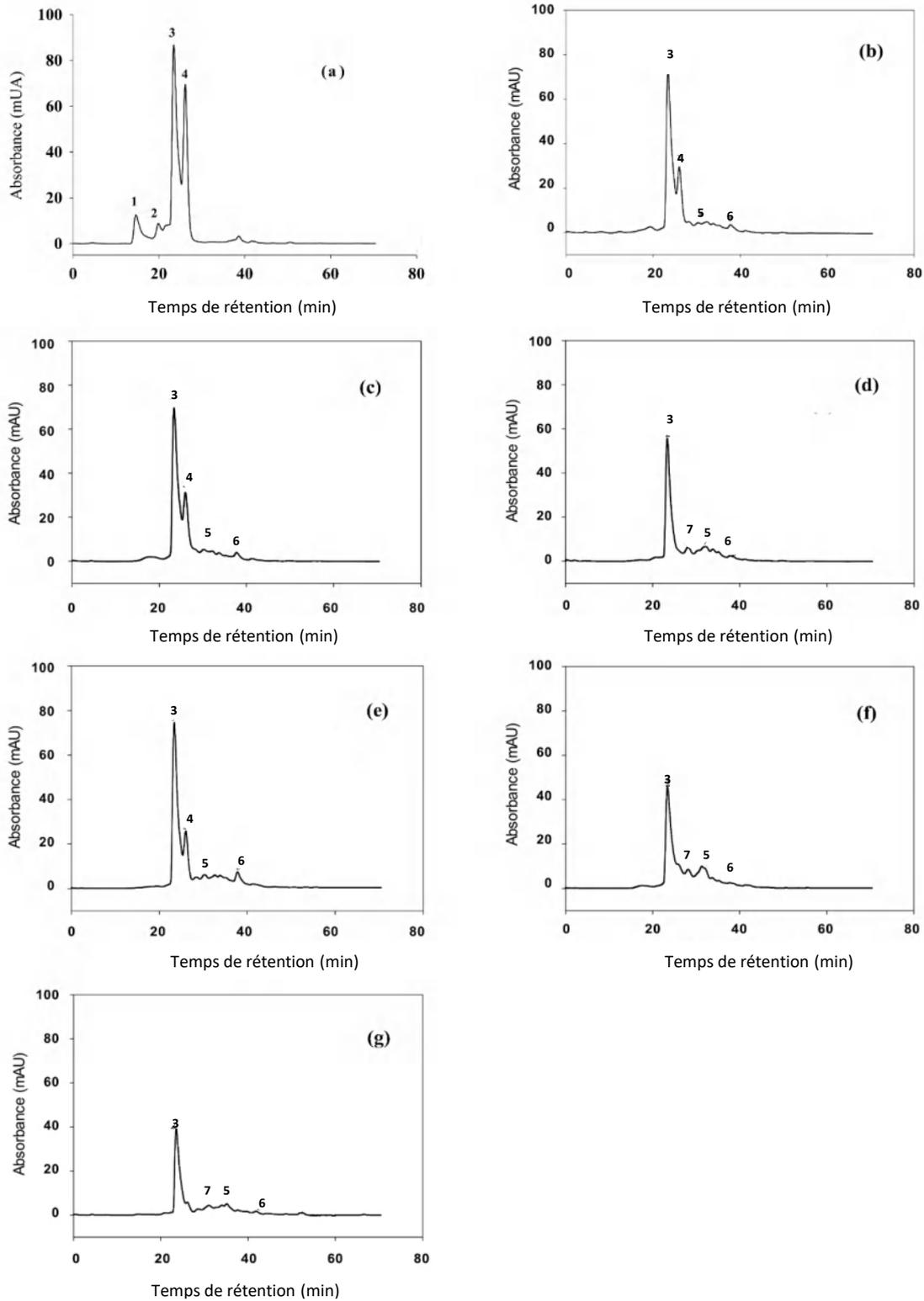


Figure 27 : Chromatogrammes exclusion de taille des: **(a)** protéines de lactosérum native et des hydrolysats de la pepsine du poulet ; **(b)** e/s 0,5% à 30 min; **(c)** e/s 0,5% à 2h; **(d)** e/s 0,5% à 6h ; **(e)** e/s 1% à 30 min ; **(f)** e/s 1% à 2h ; **(g)** e/s 1% à 6h, mesurée a 280 nm

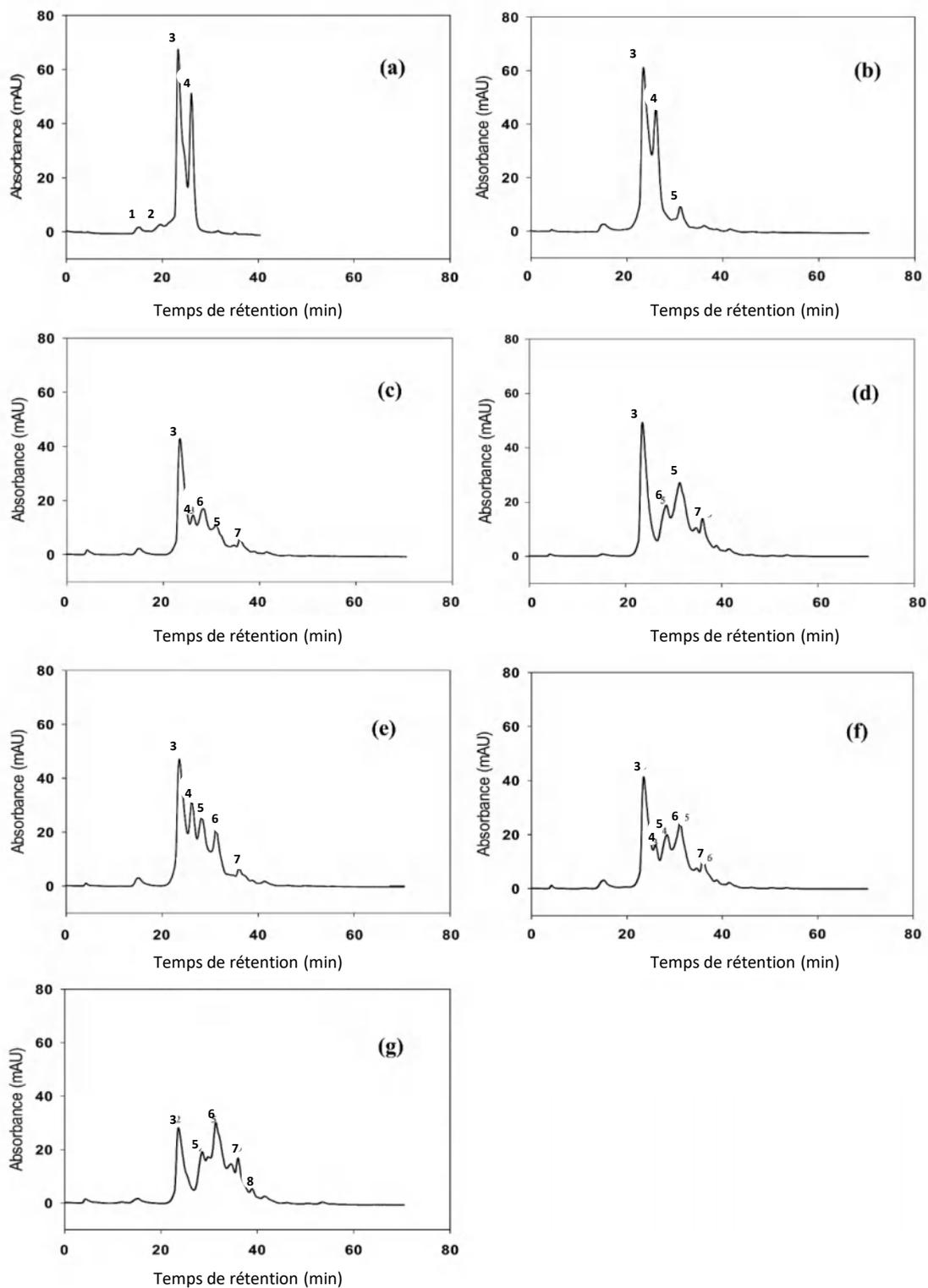


Figure 28 : Chromatogrammes exclusion de taille des: **(a)** protéines du lactosérum natives, et des hydrolysats de la pepsine porcine ; **(b)** E/S 0,5% à 30 min ; **(c)** E/S 0,5% à 2h; **(d)** E/S 0,5% à 6h; **(e)** E/S 1% à 30 min; **(f)** E/S 1% à 2h ; **(g)** E/S 1% à 6h, mesurée à 280 nm. **1**: BSA; **2**: β -Lg; **3**: α -L; **4-8**: Zone de peptides générés par hydrolyse

1.2.5. Taux des protéines non dégradées

Après FPLC nous avons pu quantifier le taux des protéines restant intactes après l'hydrolyse par la détermination de la concentration de chaque fraction dans chaque échantillon.

La figure (29) montre le taux des protéines de β -Lg et α -La restant à différents temps d'hydrolyse (0, 0,5, 2 et 6h) par la ficine, la pepsine du poulet et la pepsine porcine pour les deux ratios E/S.

L'analyse statistique indique que le temps de l'hydrolyse a un effet significatif ($p < 0,05$) sur la quantité de protéines restantes. En revanche, l'augmentation du ratio E/S de 0,5 à 1% n'a montré aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les taux des protéines restants intactes après l'hydrolyse.

Pour le ratio E/S de 0,5% et après 30 min d'hydrolyse, environ 87%, 13% et 11% de la β -Lg est hydrolysée par la ficine (figure 29.a), la pepsine du poulet (figure 29.b), et la pepsine porcine (figure 29.c) respectivement.

Après 2h et 6h le taux de β -Lg non hydrolysé est de 2,63% et 1,29% respectivement pour les hydrolysats de la ficine, 80,51% et 62,77% respectivement pour les hydrolysats de la pepsine du poulet, et 86,42% et 72,35% pour les hydrolysats de la pepsine porcine respectivement.

A un ratio E/S de 1%, la β -Lg est dégradée complètement après 2h pour la ficine, alors qu'elle est restée intacte avec un taux de 55,24% et 60,10% sans dégradation pour la pepsine du poulet et la pepsine porcine respectivement après 6h d'hydrolyse.

Les taux de β -Lg restants après hydrolyse par la ficine sont significativement différents ($p < 0,05$) de ceux des deux pepsines.

D'un autre côté, environ 90,33% d' α -La sont hydrolysés par la ficine (figure 30.d) après 30 min à un ratio de 0,5%, et 98,33% pour un ratio de 1% avec une dégradation complète après 2h pour les deux ratios. Pour les deux pepsines, au ratio de 0,5%, environ 60% d' α -La est dégradée après 30 min et elle est entièrement dégradée après 6h. Pour le ratio de 1%, l' α -La n'est plus détectée après 2h pour la pepsine du poulet (figure 29.e), et après 6h pour la pepsine porcine (figure 29.f).

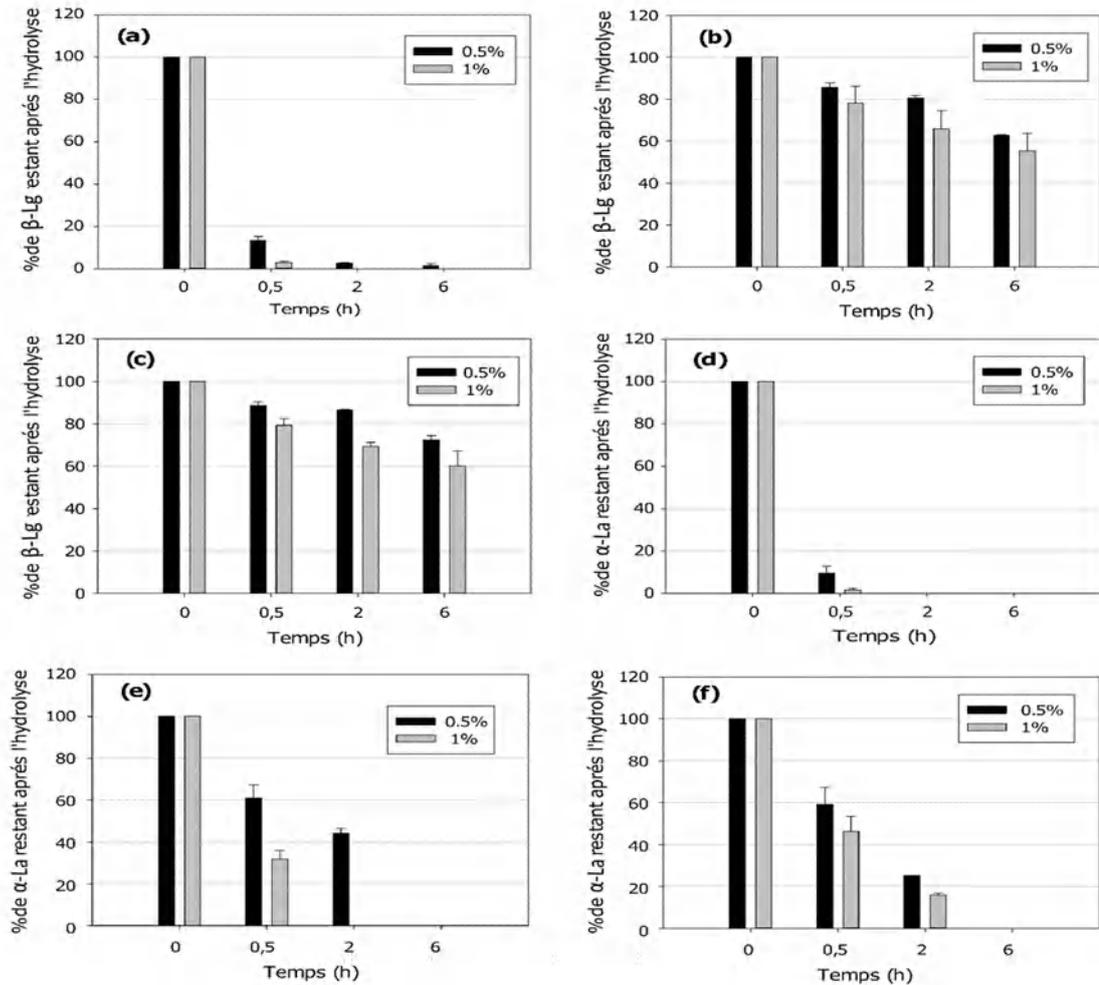


Figure 29 : Le taux de la β -Lg et α -La après l'hydrolyse par les trois enzymes à différents temps d'hydrolyse (0, 0,5, 2 et 6h) pour les deux ratios E/S.

- (a): Le taux de la β -Lg restant par l'hydrolyse de la ficine
- (b): Le taux de la β -Lg restant par l'hydrolyse de la pepsine du poulet
- (c): Le taux de la β -Lg restant par l'hydrolyse de la pepsine porcine
- (d): Le taux d' α -La restant par l'hydrolyse de la ficine
- (e): Le taux d' α -La restant par l'hydrolyse de la pepsine du poulet
- (f): Le taux d' α -La restant par l'hydrolyse de la pepsine porcine

Les taux d' α -La restant après l'hydrolyse pour les différents temps par les trois enzymes montre une différence significative ($p < 0,05$). Ces résultats sont bien corrélés avec les résultats précédents.

Dans un travail récent de Mazorra-Manzano et al. (2020), à un ratio E/S de 5% et après 24h d'incubation, les protéases de melon ont laissé autour de 27% de β -Lg sans hydrolyse, alors que Tavares et al. (2011), ont indiqué que la β -Lg a résisté à l'hydrolyse par les cardosines, tandis que, α -La a été hydrolysée, à 87% après 7h d'incubation à (E/S) de 1,6%.

Nos résultats concernant la ficine sont pertinents et d'une application économique certaine, car la ficine a pu dégrader la β -Lg pendant une courte durée. Cette protéine est considérée comme l'allergène major des protéines du lactosérum avec une résistance à la protéolyse par différentes protéases (digestive ou d'autres origine) élevée. La β -Lg est connue par sa résistance aux enzymes digestives ce qui peut induire une réponse antigénique chez les nourrissons (Mazorra-Manzano et al., 2020).

1.2.6. Identification des fractions peptidiques par LC Ms/Ms

Dans le but d'identifier les peptides issus des dégradations par la ficine et la pepsine du poulet, les hydrolysats ayant le degré d'hydrolyse (DH) maximal correspondant à 35,36% pour la ficine et 12,87% pour la pepsine du poulet ont subi une ultrafiltration puis une identification par MALDI-TOF pour les fractions dont le poids moléculaire est inférieur à 3 kDa.

1.2.6.1. Peptides issus de l'hydrolyse par la ficine

Le tableau 13 présente les peptides prédominants de la fraction inférieure à 3 kDa identifiés par LC Ms/Ms des hydrolysats des protéines du lactosérum par la ficine (HPLF).

Différents peptides ont été identifiés à partir de la β -Lg et de l' α -La. Nous pouvons constater que 10 peptides sont produits à partir de la β -Lg, qui sont composés des mixtures des résidus des acides aminés hydrophobe (V, L, A) et hydrophiles (E, K, R, Q) aux extrémités aminées et carboxylées. Le peptide prédominant produit à partir de la β -Lg est localisée en (61-74) avec un taux d'abondance de 38,29%, ce peptide a un acide Glutamique (E) à l'extrémité aminée et la Leucine (L) à l'extrémité carboxylique. Alors que, le principal peptide se trouve presque en totalité avec un taux d'abondance de 99,49%, ce peptide est localisé en (29-38) avec un Arginine (R) à l'extrémité aminée et Glycine (G) à l'extrémité carboxylique. Les peptides résultants sont composés de 9 à 16 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire entre 970 et 1790 Da.

La ficine a présenté une grande affinité vers les protéines du lactosérum. Les résultats d'identification permettent de conclure que la ficine agit de manière très spécifique sur les liaisons peptidiques de l' α -La en produisant un seul peptide major alors que pour la β -Lg, la ficine a attaqué plusieurs sites en produisant différents peptides.

Tableau 13: Peptides prédominants identifiés par LC Ms/Ms de la fraction < 3 kDa des HPL.F

1.2.6.2. Peptides issus de l'hydrolyse par la pepsine du poulet

Les peptides prédominants de la fraction inférieure à 3 kDa des hydrolysats de la pepsine du poulet (HPL.PP) à partir des protéines majeures du lactosérum (β -Lg et α -La) sont identifiés par LC Ms/Ms et présentés dans le tableau 14.

Le taux d'abondance des peptides majeurs est inférieur à 10% pour les peptides produits à partir de la β -Lg et moins de 35% à partir de l' α -La. Nous avons constaté que les peptides issus de la β -Lg sont composés d'un mélange d'acides aminés hydrophobes (A, W, L, V, Y) et hydrophile (D, E, K) aux extrémités aminées et carboxylées.

Les trois peptides prédominant à partir de la β -Lg sont localisés en position (42-61), (41-57), et (39-61) respectivement.] avec une abondance relative de 8,29, 6,21 et 5,52% respectivement. Ces peptides

Les trois peptides majeurs produit à partir de l' α -La sont localisés en position (116-124), (60-71), et (60-72) avec une abondance relative de 32,05, 27,85, et 10,84 % respectivement.

La quasi-totalité des peptides obtenus avaient un poids moléculaire entre 800 et 2300Da, riche en acides aminés aromatiques hydrophiles et hydrophobes. Ces résultats concordent avec des résultats précédents concernant le degré d'hydrolyse (DH), la FPLC et la SDS–Page. Les résultats obtenus suggèrent que, la pepsine du poulet agit de manière étroitement spécifique sur l'extrémité N-terminale des liaisons peptidiques de β -Lg et α -La.

Tableau 14 : Peptides prédominants identifiés par LC Ms/Ms de la fraction < 3 kDa des HPL.PP

1.3. Impact de l'hydrolyse sur les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum

En général, la réduction du poids moléculaire des protéines causées par les enzymes protéolytiques, provoque l'exposition des groupes hydrophobes et l'augmentation des groupes ionisés. Ces modifications ont des effets substantiels sur les propriétés fonctionnelles des protéines (Kilara & Vaghela, 2018).

L'hydrolyse enzymatique des protéines confère des propriétés attrayantes aux hydrolysats comme l'amélioration de la solubilité à des valeurs du pH dans laquelle la protéine

native a une solubilité faible, en outre les propriétés bioactives, organoleptiques et émulsifiante peuvent être considérablement améliorés (Cheison et al., 2007).

Dans la présente étude, les propriétés techno-fonctionnelles ont été étudiées pour les hydrolysats, qui ont été préparées à un ratio E/S de 1% pendant 2h d'incubation pour la ficine (HPL.F), et à un ratio de 0,5% pendant 6h d'incubation pour la pepsine du poulet (HPL.PP) et pepsine porcine (HPL.P). Ces conditions ont été choisies parce qu'elles correspondent au maximum d'hydrolyse.

L'influence de l'hydrolyse par les trois enzymes sur la solubilité, l'indice d'émulsification et l'activité moussante en fonction du pH est présentée dans les figures 30, 31 et 32 respectivement.

1.3.1. Solubilité

La solubilité est parmi les propriétés fonctionnelle des protéines du lactosérum les plus importante grâce à son influence considérable sur les autres propriétés (moussante, émulsifiant, gélifiant etc.....) (Nishanthi et al., 2018; Pelegrine & Gasparetto, 2005). La figure (30) présente l'évolution de la solubilité en fonction du pH des trois hydrolysats en comparaison avec les protéines natives du lactosérum. La solubilité des hydrolysats était significativement ($p < 0,05$) plus élevée que les protéines natives du lactosérum quel que soit le pH. Ces résultats concordent avec ce qui est rapporté pour les HPL par la trypsine (Chobert et al., 1988).

Les protéines natives du lactosérum présentent une forte diminution de leur solubilité dans la zone du pH isoélectrique (4-5), cependant, les hydrolysats montrent une faible diminution. A pH 5, les protéines natives du lactosérum ont une solubilité minimale de 42%, alors que les HPL.F, HPL.PP et HPL.P ont montré une solubilité de 99%, 81,45 et 93% respectivement. Selon Severin & Xia (2006) la solubilité des protéines du lactosérum hydrolysées par l'alcalase à un DH de 5, 10, 15 et 20% dans la zone du pH isoélectrique est passée de 75,5 à 80,5, 80,8, 84,0 et 85,8%, respectivement. Selon Ghanimah & Ibrahim (2018), le pH de la solution des protéines peut influencer la solubilité par la modification de la répulsion entre les molécules. L'agrégation intermoléculaire maximale de la β -Lg sans traitement thermique est proche au pH isoélectrique en raison de la neutralisation des charges d'interaction via des forces hydrophobes (Jeevanthi et al., 2015).

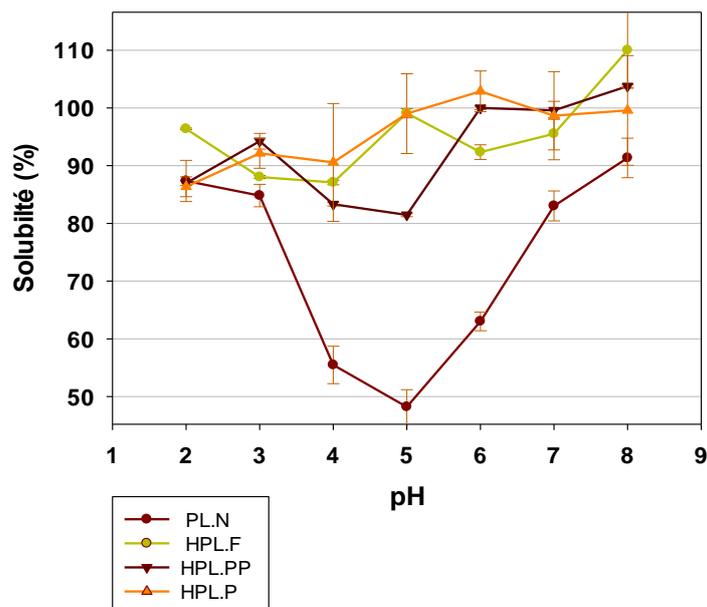


Figure 30 : Solubilité des protéines natives du lactosérum et des hydrolysats par les trois enzymes en fonction du pH. **PL.N:** Protéines du lactosérum natives. **HPL.F:** Hydrolysats de la ficine; **HPL.PP:** Hydrolysats de la pepsine du poulet; **HPL.P:** Hydrolysats de la pepsine porcine

La solubilité est fortement corrélée à la réduction du poids moléculaire. Elle est augmentée lorsque les peptides générés étaient plus petits et ont des groupes plus hydrophiles (augmentation du nombre des groupes ionisables (NH_4^+ , COO^-)), elle est diminuée lorsque les peptides exposés ont des groupes plus hydrophobes (de Castro et al., 2015; Jeewanthi et al., 2015). La spécificité des enzymes est le facteur clé qui influence le nombre et l'emplacement des liaisons peptidiques hydrolysés (Kilara & Vaghela, 2018). La solubilité des protéines dépend aussi d'autres facteurs y compris la surface d'hydrophobicité, la taille des peptides et les répulsions électrostatiques entre les protéines (Al-Shamsi et al., 2018).

L'hydrolyse par les trois enzymes a causé la réduction du poids moléculaire avec exposition probable des groupes hydrophiles plus que les groupes hydrophobes ce qui a conduit à l'augmentation de la solubilité des hydrolysats et particulièrement dans la zone isoélectrique du pH.

L'analyse statistique a indiqué qu'il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre la solubilité des protéines du lactosérum natives et les trois hydrolysats, alors que la différence n'est pas significative entre les trois hydrolysats ($p > 0,05$).

1.3.2. Indice d'activité émulsifiante (IAE)

L'indice d'activité émulsifiante (IAE) correspond à la capacité des protéines à rester à l'interface huile-eau après la formation d'émulsion (Herceg et al., 2007). L'IAE a été mesuré pour les protéines du lactosérum natives et les hydrolysats en fonction du pH. Les résultats obtenus sont présentés en figure (31). L'IAE diminue significativement pour les HPL.F pour toute la plage du pH étudiée, la diminution est limitée pour les HPL.P qui est réduite seulement au pH 3-6. En revanche, l'IAE des HPL.PP est augmenté significativement sur toute la gamme du pH. Les changements du pH modifient la conformation et la charge nette des couches de protéines adsorbées à l'interface (Ghanimah & Ibrahim, 2018).

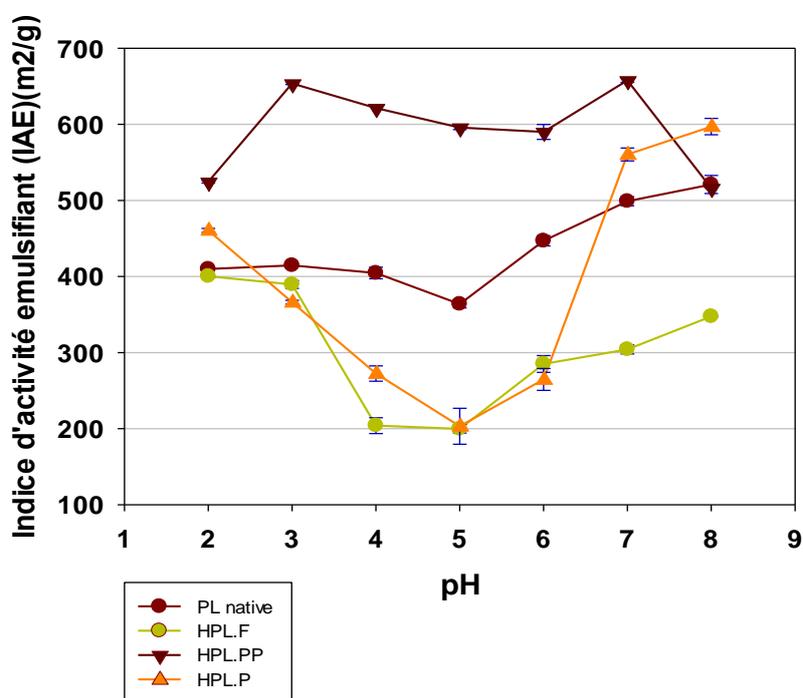


Figure 31 : Indice d'activité émulsifiante (IAE) des protéines natives du lactosérum et des hydrolysats par les trois enzymes en fonction du pH. **PL.N:** Protéines du lactosérum native. **HPL.F:** Hydrolysats de la ficine; **HPL.PP:** Hydrolysats de la pepsine du poulet; **HPL.P:** Hydrolysats de la pepsine porcine.

A pH 5, l'IAE est réduit d'environ de 44% pour les HPL.F (200 m²/g) et HPL.P (203,15 m²/g), alors que pour les HPL.PP, il est augmenté de 70% (610 m²/g) en comparaison avec les protéines natives du lactosérum (360 m²/g).

L'analyse statistique indique que l'IAE des HPL.PP a une différence significative ($p < 0,05$) avec les HPL.F, HPL.P et les protéines natives du lactosérum, alors que la différence n'est pas significative entre ces trois derniers.

Embiriekah et al. (2018) ont signalé que les hydrolysats des protéines du lactosérum par la trypsine ont un IAE supérieur à celui des hydrolysats de la pepsine. Certaines études ont suggéré que la capacité des protéines à agir comme émulsifiant est attribuée à la surface d'hydrophobicité (Banach et al., 2013).

Il a été démontré que les hydrolysats des protéines du lactosérum avec des degrés d'hydrolyse (DH) faible où élevé (4-10% ou 27-35%) ont une capacité émulsifiante plus faible que les protéines natives du lactosérum, tandis que les HPL avec un DH de (20-27%) ont montré une meilleure capacité de formation d'émulsion (Schröder et al., 2017). En revanche, Abd El-Salam & El-Shibiny (2017) ont rapporté que le maximum de capacité d'émulsification des HPL est obtenue à un DH entre 10 et 20%. De Castro et al. (2015) ont rapporté que pour obtenir une bonne propriété émulsifiante, la longueur de la chaîne peptidique devait être supérieure à vingt acides aminés. Les grands peptides obtenus à faible DH, peuvent se déplier et se réorienter à l'interface alors que les petits peptides à faible poids moléculaire sont moins efficaces pour réduire la tension à l'interface et ne sont peut-être pas suffisamment amphiphiles pour présenter des propriétés émulsifiantes appropriées (Karami & Akbari-adergani, 2019).

Les résultats obtenus dans le présent travail, ont montré que les groupes exposés par les hydrolysats sont amphiphiles avec des groupes plus hydrophiles pour les HPL.F et HPL.P et plus hydrophobes pour les HPL.PP ce qui peut expliquer les résultats de l'activité émulsifiante.

Ces résultats sont valables pour une émulsion huile dans eau, il serait intéressant de les vérifier sur une émulsion eau dans l'huile où l'agent émulsifiant doit être de nature plus hydrophile qu'hydrophobe.

1.3.3. Activité moussante

La figure 32 montre l'activité moussante des protéines natives du lactosérum et de leurs hydrolysats en fonction du pH. Les HPL.F ont montré une activité moussante significativement ($p < 0,05$) inférieure à celle des protéines natives du lactosérum quel que soit le pH. L'activité moussante des HPL.PP est significativement plus élevée par rapport aux protéines natives du lactosérum et les autres hydrolysats. Une amélioration de l'activité moussante des hydrolysats autour du point isoélectrique est notée pour les HPL.PP et HPL.P. Il est intéressant de noter qu'à pH 5, l'activité moussante des HPL.PP est de 118,5%, alors que pour les HPL.F, HPL.PP et protéines natives du lactosérum, l'activité moussante est de 6%, 75% et 49% respectivement.

Il est connu que la taille et la charge des peptides peuvent être différentes pour les hydrolysats produits par différentes peptidases. La propriété moussante a été accrue lorsque la charge nette a été augmentée, par ce que cette dernière affecte l'adsorption des protéines à l'interface air-eau (Karami & Akbari-adergani, 2019). Selon Klompong et al. (2007), la différence des valeurs du pouvoir moussant entre les hydrolysats peut être due au degré d'hydrolyse (DH) obtenus pour chaque enzyme, et le type des acides aminés exposés à la surface du peptide.

Les résultats de l'activité moussante sont en accord avec ceux de l'IAE. Il est possible de conclure que les HPL.F ont des peptides de petite taille avec exposition plus des groupes hydrophiles, alors que HPL.P ont des peptides de taille moyenne avec exposition des groupes hydrophobes, les HPL.PP pourrait exposer plus des groupes hydrophobes, ce qui a conduit à obtenir de meilleures activités moussantes et émulsifiantes que les autres hydrolysats.

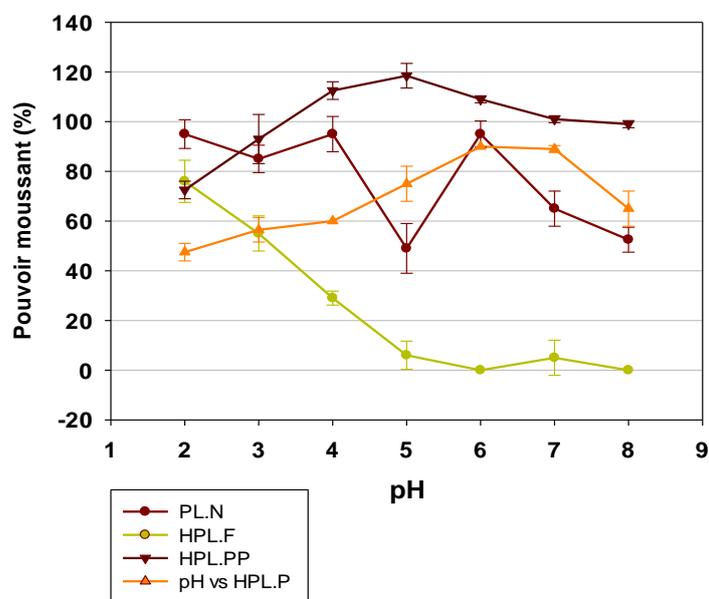


Figure 32 : Activité moussante des protéines natives du lactosérum et des hydrolysats par les trois enzymes en fonction du pH. **PL.N:** Protéines du lactosérum native. **HPL.F:** Hydrolysats des protéines du lactosérum la ficine; **HPL.PP:** Hydrolysats des protéines du lactosérum la pepsine du poulet; **HPL.P:** Hydrolysats des protéines du lactosérum la pepsine porcine.

1.4. Impact de l'hydrolyse sur les propriétés biologiques des protéines du lactosérum

1.4.1. Activité antioxydante

Le mécanisme d'action des peptides antioxydants peut être évalué par différentes méthodes dont principe est le piégeage des radicaux libres, la chélation des ions métalliques de

transition ou l'inhibition de la peroxydation des lipides (Mann et al., 2019). Les essais de piégeage des radicaux libres peuvent être divisés en deux catégories, basé sur les principes chimiques de transfert d'électrons (TE) ou transfert d'atomes d'hydrogène (TAH) (Power et al., 2013).

L'activité antioxydante des protéines natives du lactosérum et les hydrolysats de la ficine, de la pepsine du poulet et de la pepsine porcine à différents temps d'hydrolyse (0, 0,5, 1, 2, 4 et 6h) et pour les deux ratios E/S (0,5 et 1%) a été déterminée par les méthodes d'ABTS et ORAC. Les résultats sont présentés dans les figures 33 et 34.

1.4.1.1. Activité antioxydante par la méthode ABTS

La capacité antioxydante des protéines du lactosérum a été améliorée pour les trois produits de l'hydrolyse par la ficine (figure 33.a), par la pepsine du poulet (figure 33.b) et par la pepsine porcine (figure 33.c). Cette capacité augmente significativement avec l'augmentation du temps et du degré d'hydrolyse.

Les protéines natives du lactosérum ont présenté une activité antioxydante minimale de 0,03 $\mu\text{mol ET/mg}$ protéine. Les hydrolysats de la ficine, de la pepsine du poulet et la pepsine porcine ont présenté une activité de 1,26, 0,27 et 0,29 $\mu\text{mol ET/mg}$ de protéine respectivement après 6h à un ratio de 0,5%, alors que pour le ratio 1%, ils ont présenté une activité de 2,32, 0,36 et 0,31 $\mu\text{mol ET/mg}$ protéine respectivement.

L'activité antioxydante des hydrolysats de la ficine est significativement ($p < 0,05$) supérieure à celle des hydrolysats des deux pepsines, alors qu'elle n'est pas significative ($p > 0,05$) entre les deux pepsines.

L'augmentation du ratio E/S de 0,5 à 1% entraîne une augmentation significative de l'activité antioxydante ($p > 0,05$) pour les hydrolysats de la ficine, alors que la différence n'est pas significative ($p < 0,05$) pour les deux pepsines.

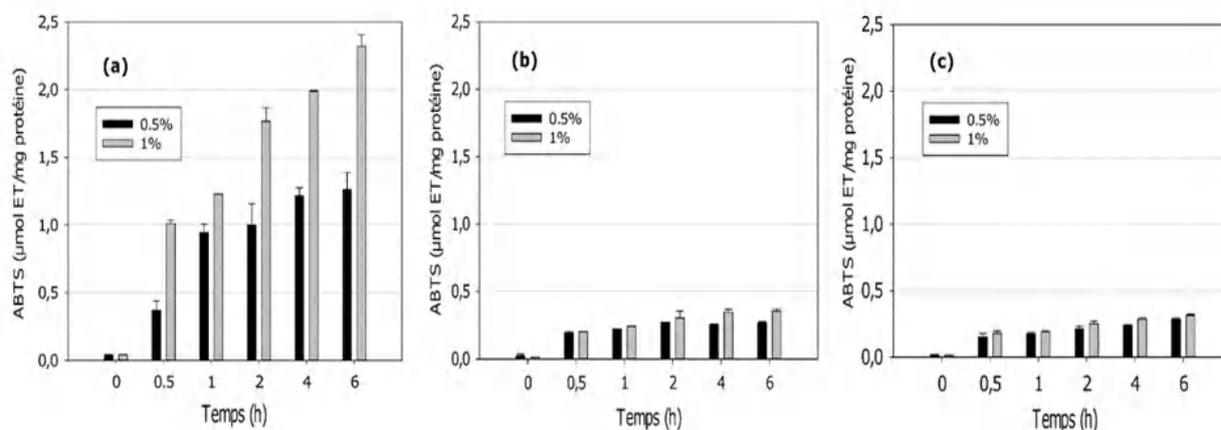


Figure 33 : Activité antioxydant des hydrolysats à ratio E/S de 0,5 et 1% mesurées par piégeage ABTS par rapport au temps d'hydrolyse exprimé en heures. **(a):** Hydrolysats de la ficine; **(b):** Hydrolysats de la pepsine du poulet; **(c):** Hydrolysats de la pepsine porcine

Différents auteurs ont rapporté que la protéolyse limitée améliore les capacités antioxydantes des protéines du lactosérum bovin et de camélin lors de la protéolyse par la pepsine, la chymotrypsine, et la thermolysine (Salami et al., 2010). Il existe une relation significativement positive entre le degré d'hydrolyse et l'activité antioxydante par ABTS (Lin et al., 2012).

Les résultats obtenus pour les hydrolysats de la ficine restent largement supérieurs aux autres types d'hydrolyses. Athira et al. (2015) ont rapporté que les hydrolysats des protéines du lactosérum produit par l'hydrolyse de l'alcalase à un ratio E/S de 1% après 8h est de 1,18 $\mu\text{mol ET/mg protéine}$, alors que les protéines natives du lactosérum ont une activité de 0,20 $\mu\text{mol ET/mg protéine}$ utilisant la méthode ABTS. Une autre étude de Adjonu et al. (2013), ont rapporté que l'hydrolyse des protéines du lactosérum par la trypsine, pepsine et chymotrypsine à un ratio E/S de (1:40) après 24h ont une activité de 0,30, 0,28 et 0,31 $\mu\text{mol ET/mg protéine}$, respectivement, tandis que 0,08 $\mu\text{mol ET/mg protéine}$ pour les protéines du lactosérum natives.

Les propriétés antioxydantes des peptides sont attribuées à leur poids moléculaire, la composition en acides aminés et leur position dans la séquence, ainsi que leur structure et leur hydrophobicité (Karami & Akbari-adergani, 2019; Mann et al., 2019). Salami et al. (2010); Coscueta et al. (2016) ont rapporté que plusieurs résidus des acides aminés (Cys Trp, Phe, Tyr et His) confèrent une activité antioxydante aux protéines à cause de leur capacité à donner un proton au radicale libre. La pepsine est connue pour cliver les liaisons peptidiques au niveau de la Phe, Tyr, Trp et Leu (Embiriekah et al., 2018).

Nos résultats ont montré que les hydrolysats de la ficine ont présenté l'activité antioxydante la plus élevée par rapport aux deux pepsines, ceci pourrait être lié au DH et la richesse en acides aminés suivant : Cys Trp, Phe, Tyr et His.

1.4.1.2. Activité antioxydante par la méthode ORAC

L'activité antioxydante par la méthode ORAC pour les hydrolysats de la ficine (figure 34.a), de la pepsine du poulet (figure 34.b) et de la pepsine porcine (figure 34.c) montre que l'hydrolyse des protéines du lactosérum a amélioré significativement ($p < 0,05$) la capacité de piégeage des radicaux libres avec l'augmentation du temps et du degré l'hydrolyse quel que soit l'enzyme.

L'activité antioxydante des protéines natives du lactosérum est entre 0,18 $\mu\text{mol ET/mg}$ protéine, ce qui est très faible en comparaison avec les hydrolysats. Après 6h d'hydrolyse, l'activité antioxydante la plus élevée est notée à un ratio de 1%, elle atteint 3,87 $\mu\text{mol ET/ mg}$ de protéine pour les hydrolysats de la ficine, de 0,65 et 1,34 $\mu\text{mol ET/ mg}$ protéine pour la pepsine du poulet et la pepsine porcine respectivement.

L'analyse statistique montre une différence significative entre les deux ratios E/S (0,5% et 1%) pour la ficine, et aucune différence significative pour les deux pepsines.

Hernández-Ledesma et al. (2005) ont signalé que l'hydrolyse de la β -Lg et l' α -La par la carolase PP donne un activité de 2,15 et 2,31 $\mu\text{mol ET/ mg}$ protéine respectivement. Bien que Adjonu et al. (2013) ont rapporté une activité antioxydante par la méthode ORAC pour la pepsine de 0,62 $\mu\text{mol ET/ mg}$ de protéine après 12 h d'incubation.

Assem et al. (2017) ont rapporté qu'à partir de la digestion des caséines, un hexa-peptide (Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu) a été identifié comme peptide ayant un potentiel antioxydant, ce peptide s'est avéré perdre son activité lors de la suppression de la Tyr et la Phe de sa structure. Ceci peut expliquer la différence de l'activité ORAC entre les hydrolysats par la différence des types des acides aminés formant les peptides résultants et leur position dans la séquence.

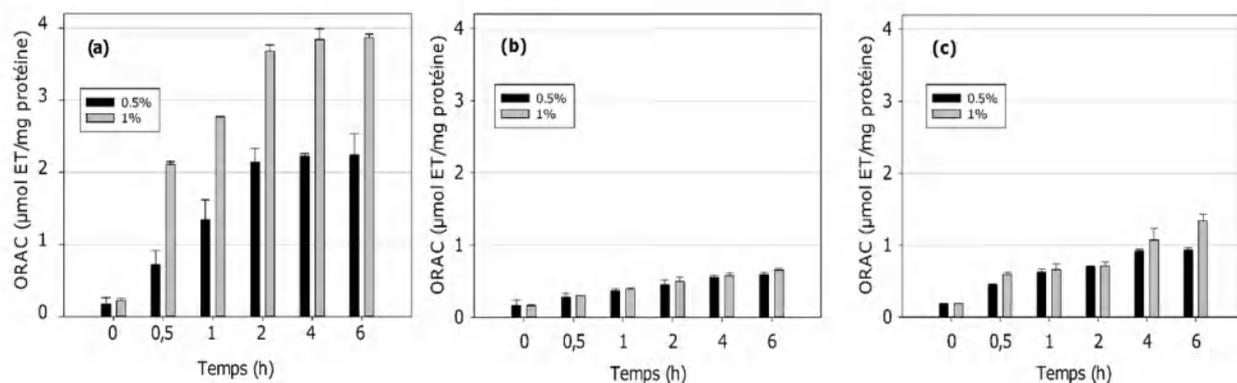


Figure 34 : Activité antioxydante des hydrolysats à ratio E/S de 0,5 et 1% mesurée par piégeage ORAC en fonction du temps d'hydrolyse. **(a):** Hydrolysats de la ficine; **(b):** Hydrolysats de la pepsine du poulet; **(c):** Hydrolysats de la pepsine porcine

1.4.2. Détermination de la fraction responsable de l'activité antioxydante

Nous avons testé l'activité de piégeage des radicaux libre par la méthode ORAC sur les deux fractions dont le poids moléculaire est inférieur et supérieur à 3 kDa ainsi que pour l'hydrolysat global. Le tableau 15 présente l'activité antioxydante des différentes fractions des hydrolysats de la ficine (HPL.F) et de la pepsine du poulet (HPL.PP).

Nous observons que la fraction < 3 kDa a présenté une capacité de piégeage des radicaux libres par ORAC significativement plus élevée ($p < 0,5$) que pour la fraction > 3 kDa et pour les hydrolysats totaux et cela pour les deux enzymes. Ceci montre que les peptides dont le poids moléculaire < 3 kDa sont principalement responsables de l'activité antioxydante en raison du type d'acides aminés dans la séquence, de leur composition et de leur poids moléculaire. Les fractions obtenues par l'hydrolyse de la ficine ont une activité supérieure à celle trouvée par la pepsine du poulet.

Ces résultats sont correspondus aux études précédentes, en effet, Hogan et al. (2009) ont détecté que la fraction < 3 kDa des hydrolysats de protéines de lait préparés par protéase microbienne (*Aspergillus oryzae*) présentant l'activité antioxydante la plus élevée. Hernández-Ledesma et al. (2005) ont rapporté que les hydrolysats d' α -La et de β -Lg possèdent une forte activité de piégeage des radicaux et les activités antioxydantes du perméat de 3 kDa obtenu à partir d' α -La et de β -Lg par la corolase PP étaient 71% et 85% plus élevées que l'activité totale de leurs hydrolysats correspondants. Alvarado Pérez et al. (2018) ont signalé également que les peptides < 3 kDa ont présenté le plus fort effet d'extinction des radicaux et que l'activité de piégeage élevée a également été attribuée à la l'existence de Leu, Tyr, Gly, Phe, Pro et Ile dont

certaines sont identifiés comme des résidus des acide aminé hydrophobes responsable de la propriété antioxydante.

Tableau 15 : Activité antioxydante par ORAC des fractions

Fractions	Hydrolysats de la ficine	Hydrolysats de la pepsine du poulet
	ORAC ET/mg protéine	ORAC ET/mg protéine
< 3 kDa	13,21 ± 2,47 ^{*a}	3,65 ± 0,22 ^{*a}
> 3 kDa	9,83 ± 0,74 ^{*b}	0,58 ± 0,03 ^{*b}
Hydrolysats	6,26 ± 0,19 ^{*c}	1,40 ± 0,03 ^{*c}

* $P < 0,05$; les moyennes ne partageant aucune lettre (a, b, c) sont significativement différent.

La majorité des peptides identifiés dans les fractions < 3 kDa de la ficine et de la pepsine du poulet ont la Leu (L) à leur C-terminal ce qui peut contribuer à l'activité antioxydante. Selon Bamdad et al. (2017), la Leu a été signalé comme contribuant positivement à l'activité antioxydante des peptides.

Nous pouvons supposer que les peptides prédominant dans les fractions identifiées ont contribué à la l'activité antioxydante.

Deux peptides prédominant dans la fraction < 3 kDa de la ficine sont identifiés, l'un à partir de β -Lg, localisé en position (61-74) et possède Leu à leur C-terminal, et l'autre peptide à partir de α -La, localisé en position (29-38) et possède la Gly à leur C-terminal. Ces deux peptides ont fortement contribué à cette activité.

Alors que pour la fraction de la pepsine du poulet trois peptides localisés en position (42-61, 41-57, et 39-61) à partir de la β -Lg, et trois peptides à partir de l' α -La localisés en position (116-124, 60-71, et 60-72) sont probablement responsable de cette activité antioxydante.

Corrochano et al. (2018) ont rapporté que plusieurs peptides de β -Lg et α -La ont été fréquemment identifiés dans les fractions antioxydantes produites par hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum. Un grand nombre de peptides de β -Lg se trouvaient dans 3 points

de localisation (42-61, 77-110, et 123-135), alors que les peptides de α -La de l'emplacement 15-23.

Les peptides identifiés sont considérés comme des nouveaux peptides antioxydants, car il ne sont pas identifiés auparavant sauf pour le peptide β -Lg f(42-61) dans la fraction de la pepsine du poulet qu'était identifié dans d'autres études comme antioxydant.

1.4.3. Activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)

Le tableau 16 présente l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) des fractions des hydrolysats de la ficine (HPL.F) et de la pepsine du poulet (HPL.PP).

Tableau 16: Activité inhibitrice de l'ECA des fractions

L'activité inhibitrice de l'ECA représente la concentration capable d'inhiber 50% de l'activité enzymatique (IC50). Cette activité a été testée sur les deux fractions dont le poids moléculaire est supérieur et inférieur à 3 kDa ainsi que pour l'hydrolysat total.

Les résultats obtenus montrent que l'activité inhibitrice de l'ECA des hydrolysats de la ficine est largement supérieur à celle des hydrolysats de la pepsine du poulet. Il en ressort également que la fraction < 3 kDa présente l'activité la plus élevée avec des valeurs de IC50 de 125 μ g protéine/mL et 458 μ g protéine/mL pour l'hydrolyse par la ficine et la pepsine du poulet respectivement.

La fraction dont le poids moléculaire est supérieur à 3 kDa a présenté une activité inférieure à l'hydrolysat total avec des IC 50 de 374 μ g protéine/mL et 6864 μ g protéine/mL pour la l'hydrolysat ficine et pepsine respectivement contre 276 μ g protéine/mL et 2702 μ g protéine/mL pour l'hydrolysat total de ficine et pepsine du poulet respectivement.

Pihlanto-Leppälä et al. (2000) ont montré que les fractions de 1–30 kDa des hydrolysats des protéines du lactosérum par trypsine et la combinaison entre la pepsine, trypsine et chymotrypsine ont une activité antihypertensive qui varie entre 485 et 1134 μ g protéine /mL, alors que les fractions < 1 kDa varie entre 109 et 837 mg protéine /mL. Tavares et al. (2011) ont rapporté que IC50 d'inhibition de l'ECA des hydrolysats de protéines du lactosérum par la cardosine et de la fraction (< 3 kDa) est de 105,4 et 25,6 μ g/mL respectivement. Alors que selon Cheung et al. (2015) les fractions de 200-1000 Da présentaient la plus forte activité inhibitrice de l'ECA.

L'activité inhibitrice de l'ECA dépend de la source de protéines, la spécificité des enzymes protéolytiques et les conditions d'hydrolyse (le temps d'hydrolyse et le rapport E/S) utilisé pour la production des hydrolysats (Mann et al., 2019; Van der Ven et al., 2002).

Il a été démontré également que l'ECA préfère les substrats contenant un résidu d'acide aminé hydrophobe (chaînes latérales aromatiques ou ramifiées) en position C-terminale (Ferreira et al., 2007). La majorité des peptides identifiés dans les fractions < 3 kDa pour la ficine et la pepsine du poulet ont des acides aminés hydrophobe tel que Ala (A), Leu (L), Phe (F), Gly (G) à leur C-terminale ce qui améliore l'activité inhibitrice de l'ECA et nous supposons que les peptides prédominant dans ces fractions ont une grande contribution à cette activité.

Les peptides identifiés dans ce travail sont considérés comme des nouveaux peptides antihypertensifs, car ils n'ont jamais été identifiés auparavant.

1.4.4. Prédiction du potentiel allergène

Dans l'industrie alimentaire, l'hydrolyse enzymatique des protéines du lactosérum est la technique la plus efficace qui permet d'obtenir des hydrolysats avec une distribution de poids moléculaire déterminée et une antigénicité résiduelle faible voire nulle. La réduction de l'antigénicité du complexe protéique du lactosérum est possible grâce à l'élimination ou le clivage des composants allergènes de haut poids moléculaire, notamment la β -Lg (Kęska et al., 2019).

Le potentiel des peptides obtenus par l'hydrolyse à induire des allergies alimentaires a été évalué sur la base de données BIOPEP. La recherche de séquences d'identité locale en utilisant des épitopes comme séquences de requêtes est la stratégie la plus simple possible pour la bio-informatique pour chercher de nouveaux allergènes. Différentes études ont utilisé cet outil bio-informatique pour la prédiction de l'allergénicité des protéines (Ji et al., 2019; Kęska et al., 2019).

Nous avons déterminé le potentiel allergénique des fractions dont le poids moléculaire est inférieur à 3 kDa en utilisant la base de donnée BIOPEP. Les résultats sont montrés en tableau 17.

Tableau 17 : Fréquence d'apparition des épitopes dans la séquence des protéines et le taux de réduction de l'allergénicité

D'après le tableau 17, nous observons que la fréquence d'apparition des épitopes dans les séquences des peptides de β -Lg et α -La produits lors de l'hydrolyse est réduite significativement en comparaison avec leur fréquence dans les protéines natives du lactosérum, ce qui indique que l'hydrolyse de ces protéines par la ficine et la pepsine du poulet a permis l'élimination de 63,04% et 62,6% respectivement de l'antigénicité de la β -Lg et de 36,95% et

55,91% respectivement pour l' α -La en clivant les liaisons peptidiques dans les épitopes antigéniques de ces deux protéines.

L'étude de Melnikova et al. (2022) a montré qu'un taux de réduction de 65% pour la β -Lg et 40% pour l' α -L de ces liaisons peptidiques a été rompu lors de l'hydrolyse du concentré d'ultrafiltration du lactosérum par un mélange d'enzymes microbiennes par cette méthode de prédiction.

L'utilisation des méthodes innovantes pour la prédiction de l'allergénicité dépend largement du choix des bases de données. Déterminer l'allergène potentiel n'est pas suffisant pour prouver l'allergénicité des peptides. D'autres études basées sur des tests biochimiques et biologiques sont nécessaires pour confirmer le potentiel allergénique de ces hydrolysats

2. Impact du traitement par DIC sur la structure et les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum

En deuxième partie de cette thèse nous avons recherché l'impact d'un traitement physique sur les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum. Nous avons choisi comme traitement la détente instantanée contrôlée (DIC). Pour répondre à cette question nous avons appliqué un plan d'expériences composite centré à deux facteurs (pression et temps) avec deux applications sèche et humide. Les protéines du lactosérum ont été traitées par une pression allant de 0,2 à 0,5 MPa équivalent à des températures comprises entre 120 et 158 °C et un temps de maintien compris entre 15 et 45s.

2.1. Ajustement du modèle

Une analyse des niveaux de signification pour chaque facteur du traitement pression et temps (P et T) sur les différentes réponses ont été étudiés avec une analyse ANOVA (modèle de régression linéaire). La signification a été définie à $p > 0,05$, et le coefficient de détermination satisfaisant ($R^2 > 70$) (Granato & de Araújo Calado, 2014; Mahroug et al., 2020). Les résultats de l'analyse statistique sont présentés dans les tableaux 18 et 19 pour les deux applications DIC-H (traitement humide) et DIC-S (traitement sec) respectivement en donnant les coefficients des effets linéaires et quadratiques pour chaque facteur et l'interaction entre eux.

Dans l'application de la DIC à base sèche (DIC-S) (tableau 18), l'analyse de régression indique que les propriétés chimiques des protéines du lactosérum après le traitement par la DIC tels que les concentrations des thiols libres, le taux des protéines β -Lg, α -La, et BSA montre que les modèles sont significatifs ($R^2 > 70\%$) et pourraient expliquer 93,97% et 76,24%, 80,34% et 73,20% de la variance des données successivement. En ce qui concerne les propriétés techno-fonctionnelles, seulement la solubilité, indice d'activité émulsifiante (IAE), la stabilité de la mousse, et la capacité d'absorption d'eau (CAE) montre que les modèles sont significatifs ($R^2 > 70\%$, $p > 0,05$) et ont obtenu une variance de données R^2 de 88,82%, 73,23%, 84,92% et 88,83% respectivement. Les modèles des autres propriétés ne sont pas significatifs ($R^2 < 70\%$).

Pour l'application de la DIC à base humide (DIC-H) (tableau 18) l'analyse de la régression indique que les propriétés chimiques des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC tels que la teneur en thiols libres et les concentrations des protéines de β -Lg et α -La seulement, montre que les modèles sont significatifs ($R^2 > 70\%$, $p < 0,05$) et pourraient expliquer 92,96%, 79,82% et 75,06% de la variance des données respectivement. Concernant les propriétés techno-fonctionnelles, seulement la solubilité montre que le modèle est significatif avec un R^2 de 70,9%. Les modèles pour les reste des propriétés ne sont pas significatifs ($R^2 < 70\%$).

Tableau 18 : Modèles de régression pour les variables de réponse pour l'application de la DIC à base sèche (DIC-S).

Variables	Propriétés chimiques				Propriétés techno-fonctionnelles						
	Thiols libres ($\mu\text{mol/g}$ de protéines)	Concentration (mg/mL) à partir FPLC	α -La	BSA	Solubilité (%)	IAE (m ² /g)	AM (%)	SM (%)	CAE (g H ₂ O/g éch.)	CAH (g huile/g éch.)	
Pression (X₁)	-1,631*	β -Lg -0,2954*	-0,0919*	-0,0371*	-9,90*	-47,6*	-8,67NS	-15,99*	0,428*	0,263*	
Temps (X₂)	-1,638*	-0,2122*	-0,1479*	-0,0383*	-8,51*	-27,6NS	-8,61NS	-7,54N	0,165NS	-0,0520NS	
Pression \times Temps (X₁X₂)	-0,591*	-0,100NS	0,0071NS	0,0316*	4,13NS	13,7NS	-1,43NS	12,24*	0,005NS	-0,108NS	
Pression² (X₁²)	2,714*	0,504*	0,1868*	0,1021*	17,03*	-116*	5,70NS	25,16*	-1,4746*	-0,111NS	
Temps² (X₂²)	1,234*	0,314NS	0,0516NS	0,02635S	7,09*	-42,1NS	8,32NS	30,4*	-0,217NS	-0,447*	
R² (%)	93,97	76,24	80,34	73,20	88,82	73,27	50,36	84,92	88,83	69,17	
R² ajusté	91,23	67,11	72,78	62,90	84,51	62,99	31,27	79,12	84,53	57,31	

NS: Non significative

* $p < 0,05$

IAE: Indice d'activité émulsifiant; AM : Activité moussante ; SM: Stabilité de la mousse; CAE: Capacité d'absorption d'eau; CAH: Capacité d'absorption d'huile

Tableau 19 : Modèles de régression pour les variables de réponse de la DIC a base humide (DIC-H).

Variables		Propriétés chimiques					Propriétés techno-fonctionnelles				
Facteurs	Thiols libres ($\mu\text{mol/g}$ de protéines)	Concentration β -Lg	α -La	BSA	FPLC	Solubilité (%)	IAE (m^2/g)	AM (%)	SM (%)	CAE ($\text{g H}_2\text{O}/\text{g éch.}$)	CAH ($\text{g oil}/\text{g éch.}$)
Pression (X₁)	-1,666*	-0,3676*	-0,1561*	-0,0245NS	-7,41*	-41,3NS	-3,76NS	-1,95NS	0,028NS	0,092NS	
Temps (X₂)	-0,324*	-0,0086NS	-0,0147NS	-0,0105NS	-1,55NS	-3,8NS	2,41NS	-2,83NS	0,143NS	0,237NS	
Pression×Temps (X₁X₂)	0,080NS	0,0002NS	-0,0062NS	0,0413NS	11,23*	50,8NS	0,63NS	30,48*	-0,397 NS	-0,294NS	
Pression² (X₁²)	0,266NS	0,333*	0,0432NS	0,0259NS	8,06NS	61,2NS	8,27NS	-7,21NS	-0,391NS	0,367NS	
Temps²(X₂²)	0,097NS	0,012NS	-0,831NS	0,0275NS	2,90NS	4,9NS	-7,38NS	1,07NS	-0,248	-0,113N	
R² (%)	92,96	79,82	75,06	48,43	70,9	48,14	64,41	57,92	28,31	40,95	
R² ajusté	90,25	72,12	65,74	28,60	59,70	28,20	50,72	41,74	0,73	18,24	

NS: Non significative

* $p < 0,05$

IAE: Indice de l'activité émulsifiante; AM : Activité moussante ; SM: Stabilité de la mousse; CAE: Capacité d'absorption d'eau; CAH: Capacité d'absorption d'huile

Figure 35 : Aspect de la poudre de protéines du lactosérum après traitement DIC pour les deux applications (Photographie). **A:** Application de la DIC à base humide (DIC-H); **B:** Application de la DIC à base sèche (DIC-S); **PL.NT:** Protéines du lactosérum non traité.



2.2. Modifications de la structure des protéines du lactosérum par le traitement DIC

2.2.1. Effet de la DIC sur la structure quaternaire des protéines du lactosérum

Les changements de la structure quaternaire des protéines du lactosérum induit par la DIC ont été étudiés par la détermination de la concentration qui reste de chaque protéine (β -Lg, α -La, et BSA) sous leurs formes natives dans chaque échantillon par FPLC.

La figure 36 montre le diagramme de Pareto et des effets directs pour les concentrations des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications.

Pour les conditions étudiées, dans le cas de l'application à base sèche (DIC-S): L'effet quadratique de la pression, l'effet linéaire de la pression et le temps du traitement sont les facteurs qui influent significativement sur la concentration de la β -Lg. Le modèle de régression est donné avec $R^2 = 76,24\%$:

Concentration $\beta - Lg$ (DIC - S)

$$= 5,820 - 18,96 \times P - 0,1133 \times T + 22,38 \times P^2 + 0,001394 \times T^2 + 0,044P \times T$$

Pour la concentration d' α -La, l'effet linéaire du temps, l'effet quadratique de la pression et l'effet linéaire de la pression sont les facteurs qui influent significativement.

Le modèle de régression est donné avec $R^2 = 80,34\%$:

Concentration $\alpha - La$ (DIC - S)

$$= 1,949 - 6,52 \times P - 0,0247 \times T + 8,30 \times P^2 + 0,000229 \times T^2 + 0,0031 P \times T$$

Pour la concentration de la BSA, l'effet quadratique de la pression, est plus important que celui du temps. Le modèle de régression ($R^2 = 73,22\%$) est trouvé:

Concentration BSA (DIC - S)

$$= 1,013 - 3,845 \times P - 0,01375 \times T + 4,54 \times P^2 + 0,000105 \times T^2 + 0,01404 P \times T$$

Pour l'application de la DIC à base humide (DIC-H), la pression semble être le facteur majeur qui affecte la concentration de la β -Lg, puis l'effet quadratique de la pression a un effet aussi significatif. L'effet du temps de traitement semble négligeable. Le modèle de régression est donné avec $R^2 = 79,87\%$:

$$\text{Concentration de } \beta - Lg \text{ (DIC - S)} = 3,158 - 12,80 \times P - 0,0039 \times T + 14,78 \times P^2 + 0,000055 \times T^2 + 0,0001 P \times T$$

Pour la concentration d' α -La, la pression semble être le facteur majeur qui affecte la influent significativement. Le modèle de régression est donné avec $R^2=75,09\%$:

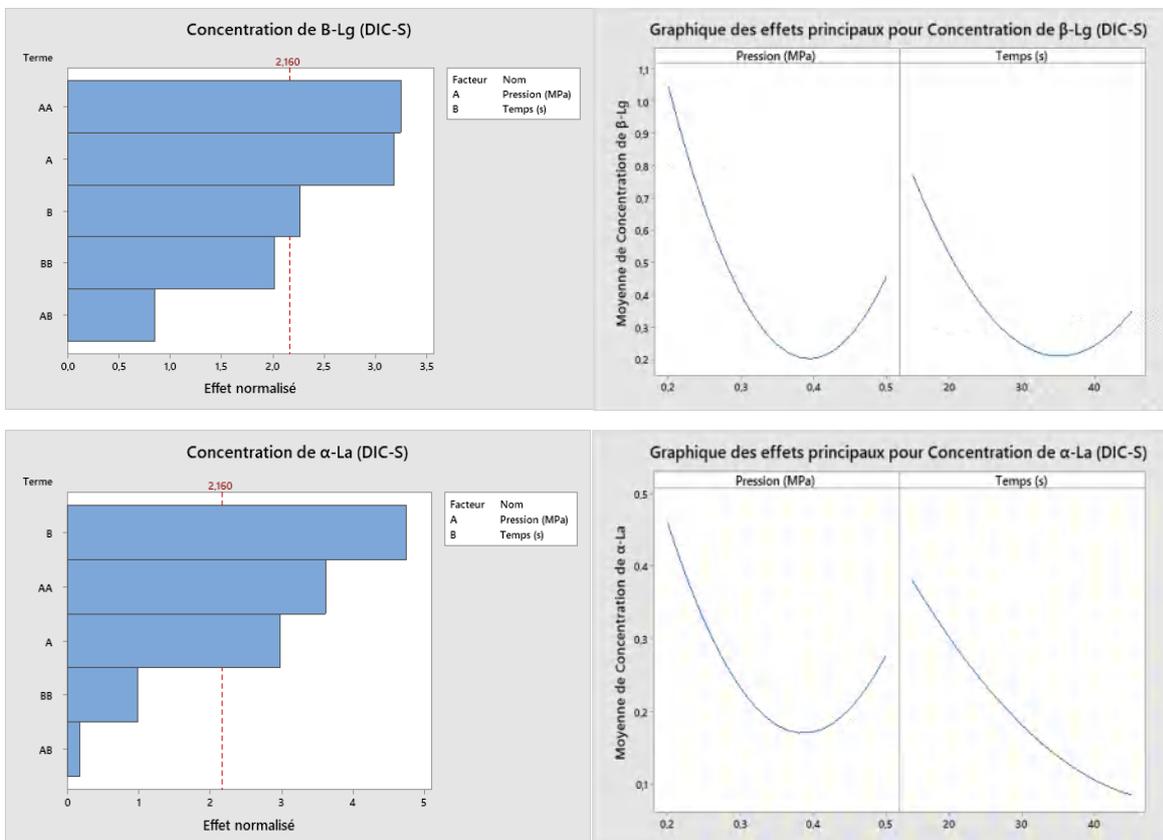
Concentration de α -La (DIC - H)

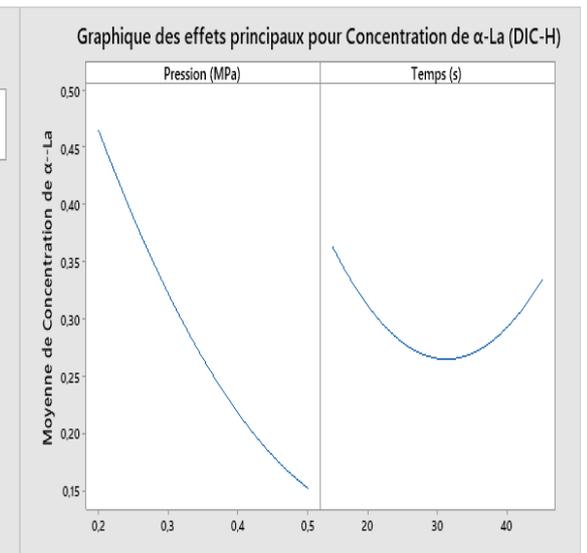
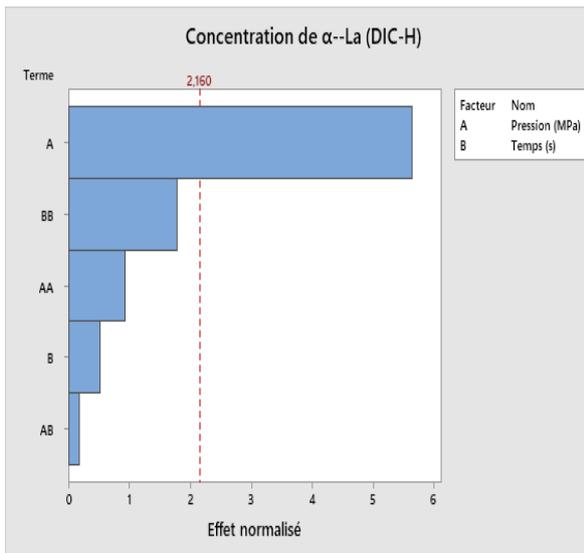
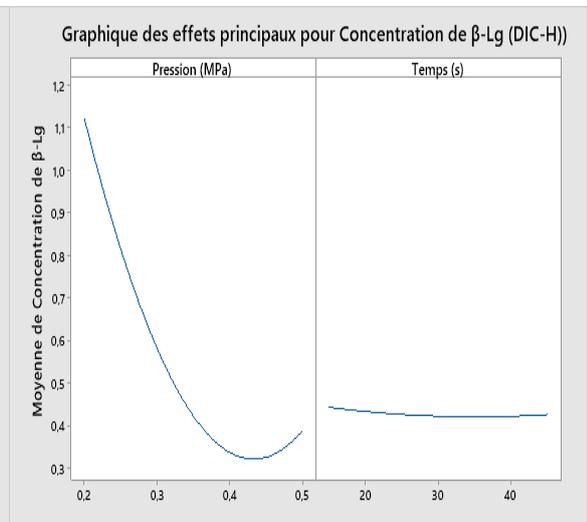
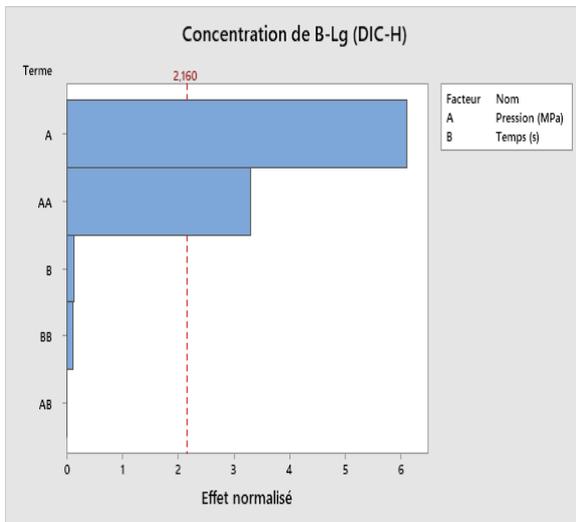
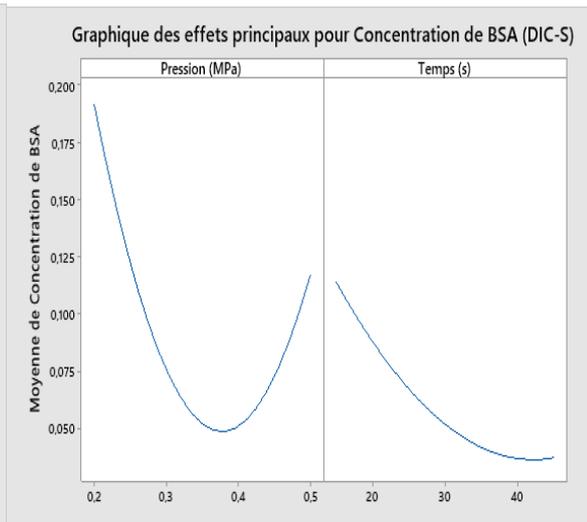
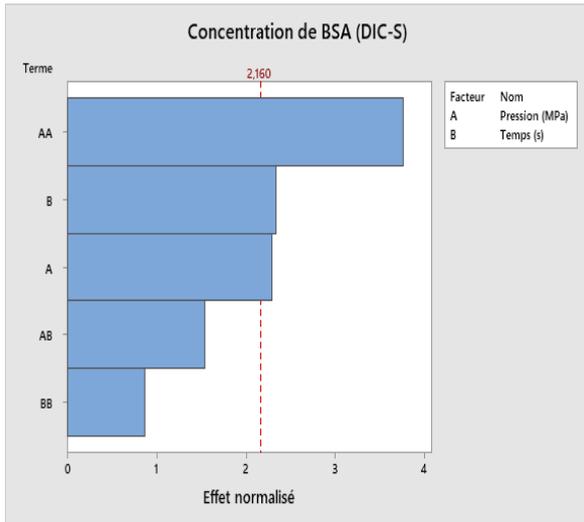
$$= 1,198 - 2,30 \times P - 0,0222 \times T + 1,92 \times P^2 + 0,000369 \times T^2 - 0,0028$$

Pour la concentration de la BSA, les effets quadratiques et linéaire des facteurs n'ont pas un effet significatif sur la concentration de BSA. Le model de regression donné avec $R^2 = 48,43\%$:

Concentration de BSA (DIC - H)

$$= 0,558 - 1,520 \times P - 0,01446 \times T + 1,15 \times P^2 + 0,000122 \times T^2 + 0,01836 \times P \times T$$





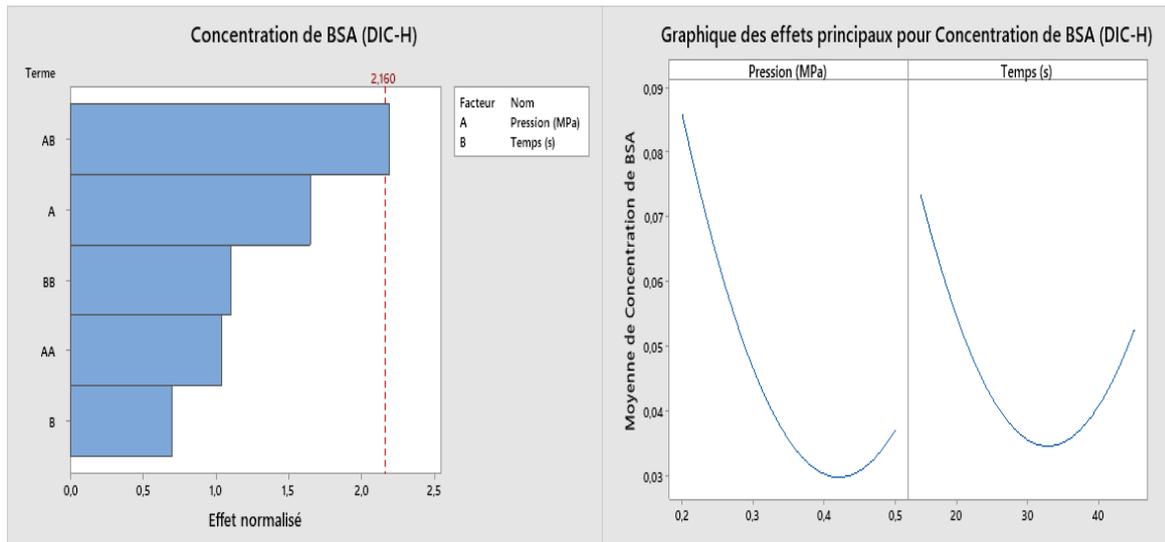


Figure 36: Diagramme de Pareto et les effets directs normalisés avec le modèle de régression ajustée pour les concentrations des protéines restant intactes après le traitement de la DIC pour les deux applications

Les modèles non significatifs ne sont pas représentés par les surfaces de réponse. Les surfaces de réponses sont tracées uniquement pour les réponses significatives suivantes : concentration de β -Lg, d' α -La et de BSA pour l'application sèche et la concentration de β -Lg et d' α -La, pour l'application humide (Figure 37 a, b).

Avant le traitement de la DIC, les concentrations de la β -Lg, l' α -La, et la BSA étaient de 4,61, 1,20, et 0,27 mg/mL, respectivement. Après traitement par la DIC, ces concentrations ont été réduites en fonction de l'augmentation de la pression et du temps pour tous les échantillons par rapport au contrôle. Cette diminution pourrait résulter d'une agrégation de ces protéines.

Figure 37 : Surfaces de réponses de l'effet de la DIC sur la concentration des protéines du lactosérum (β -Lg, α -La, et BSA) pour les deux applications. **(a) :** Application de la DIC à base humide (DIC-H); **(b):** Application de la DIC à base sèche (DIC-S). **H1, S1:** Concentration de β -Lg, **H2, S2:** Concentration α -La, **S3:** Concentration de BSA

Selon les surfaces de réponses, dans le cas de l'application de la DIC-S (Figure 37.a), la concentration des trois protéines diminue avec l'augmentation de la pression et le temps. Tandis que pour l'application DIC-H (figure 37.b), la concentration de β -Lg et α -La diminue avec l'augmentation de la pression quel que soit le temps.

Les concentrations maximales restantes des protéines ont été notées pour les conditions de traitement les plus bas (0,2 MPa /15s) pour les deux applications de la DIC. Le taux minimal

de dénaturation est de 60% pour la β -Lg, 40% pour l' α -La et 3% pour la BSA pour l'application de DIC-S. Alors qu'il est de 76% pour la β -Lg et 51% pour l' α -La pour l'application de DIC-H. Ce taux représente le taux minimal d'agrégation.

Le taux maximal de dénaturation représentant l'agrégation maximale induite par la DIC est différent pour chaque protéine et pour chaque application.

Pour l'application de la DIC-S, le taux maximal de dénaturation est obtenu à un traitement de 0,5 MPa/ 30s et de 0,46 MPa/ 40,6s pour la β -L avec un taux de 94%, l' α -La est totalement dénaturée à 0,35 MPa/ 45s et 0,46 MPa/ 40,6s, et 89% de la BSA est dénaturée à 0,5 MPa /30s.

Pour l'application de DIC-H, le taux maximal de dénaturation est obtenu pour le traitement à 0,5 MPa/ 30s avec 97% d'agrégation de la β -Lg et 100% de l' α -La.

D'après les résultats obtenus, la β -La se dénature plus rapidement que l' α -La et la BSA, nous pouvons supposer que la DIC provoque la formation des ponts disulfures d'abord entre les molécules de β -Lg puis entre β -Lg et α -La ou BSA car ces deux protéines sont moins exposées que la β -Lg.

Le changement de la structure quaternaire des protéines du lactosérum induit par la DIC est également affecté par la teneur en humidité initial. En effet le taux de dénaturation a été nettement supérieur lors de l'application DIC humide que la DIC à base sèche. Selon Sui et al. (2011), la réhydratation des protéines du lactosérum traitées à 72 °C/10 min et 90 °C/10 min a montré une forte diminution dans les deux monomères de α -La et β -Lg, qui indique leur agrégation.

2.2.2. Teneur en groupements thiols libres

La figure 38 montre les diagrammes de Pareto et des effets directs pour les deux applications.

Dans l'application de la DIC à base sèche (DIC-S), l'effet linéaire de la pression et du temps et les effets quadratiques de la pression et du temps ont un effet significatif sur le taux de groupements thiols libres. Le model de régression est le suivant ($R^2 = 93,67$):

$$\text{Thiols libres (DIC - S)} = 25,07 - 87,3 \times P - 0,345 \times T + 120,6 \times P^2 + 0,00549 \times T^2 - 0,266 P \times T$$

En revanche, pour l'application de la DIC à base humide (DIC-H), l'effet linéaire de la pression est le facteur majeur qui influe sur la teneur en groupement thiols libre, puis le temps. Le model de régression est le suivant ($R^2 = 92,96\%$):

Thiols libres (DIC – H)

$$= 8,10 - 20,46 \times P - 0,0083 \times T + 11,83 \times P^2 - 0,000430 \times T^2 + 0,0356 P \times T$$

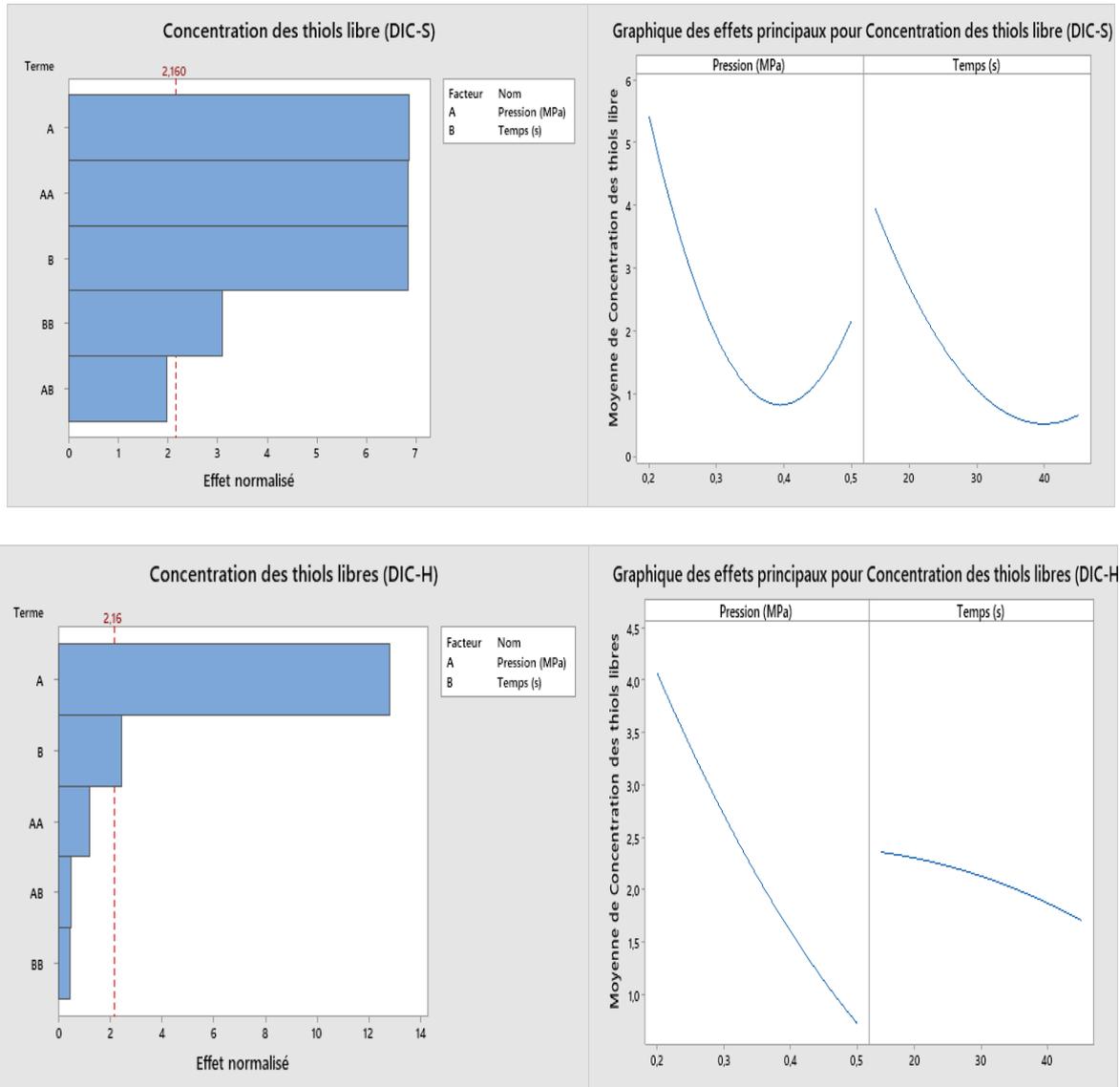


Figure 38: Diagramme de Pareto et des effets directs pour les concentrations en groupement thiols libres des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications

La figure (39) présente la surface de réponse de l'effet de la DIC sur la teneur en groupements thiols libres des protéines du lactosérum pour les deux applications.

La teneur en groupement thiols libres des protéines du lactosérum avant le traitement est de 8 $\mu\text{mol/g}$ de protéines. Après le traitement DIC à base sèche, cette teneur diminue pour atteindre 7,20 à 0,48 $\mu\text{mol/mg}$ de protéines correspondant à des taux de réduction entre 10 et

94%. Pour l'application de la DIC-H, la teneur en groupement thiols atteint 4,72 à 0,41 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéine correspondant à des taux de réduction entre 59 à 95%.

La teneur en groupement thiols libres diminue avec l'augmentation de la pression et le temps dans le cas de l'application DIC-S (figure 39.S), alors qu'elle diminue avec l'augmentation de la pression quel que soit le temps dans le cas de l'application DIC-H (figure 39.H).

La concentration maximale des groupements thiols libres est notée pour le traitement aux conditions minimales de DIC (0,2 MPa/ 15s) pour les deux applications. Pour l'application DIC-S la concentration est de 7,20 $\mu\text{mol}/\text{g}$ correspondant à un taux de réduction de 10%, alors que pour l'application DIC-H la concentration est de 4,72 $\mu\text{mol}/\text{g}$ protéines correspond à un taux de réduction de 59%. Ces conditions ont présenté le minimum d'agrégation/ déploiement, ce degré est plus élevé pour l'application DIC-H. La dénaturation est donc causée plus rapidement pour l'application DIC-H que l'application DIC-S.

Figure 39: Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la teneur en groupements thiols libres des protéines du lactosérum pour les deux applications de la DIC. **S:** Application de la DIC à base sèche (DIC-S); **H:** Application de la DIC à base humide (DIC-H)

L'humidité initiale des protéines semble avoir un effet significatif sur les changements de la structure des protéines du lactosérum induit par la DIC.

Si l'agrégation dépend uniquement de la formation des liaisons disulfures, nous pouvons conclure que le maximum d'agrégation correspond à la concentration minimale en groupes thiols libres, qui sont atteints aux conditions de 0,5 MPa-30s avec des taux de réduction de 94% pour les deux applications. Ces résultats ont également été rapportés pour d'autres protéines, en effet Mahroug et al. (2020) ont montré que l'application du traitement de la DIC sur la poudre du gluten de blé réduit également les taux des groupements thiol libres.

La différence de la concentration en groupes thiols libre pour les deux applications aux conditions minimales du traitement de la DIC, pourrait être due à des taux d'humidité plus élevés pour l'application DIC-H qui semblent accélérer la formation d'agrégats, et la ralentie aux conditions maximales par rapport à l'application DIC-S.

Kurz et al. (2020) ont rapporté que l'oxydation des groupes thiols a provoqué la formation de liaisons disulfures des protéines du lactosérum durant le traitement thermique. Ces

changements ont des effets très importants sur les propriétés techno-fonctionnelles car les ponts disulfures jouent un rôle dans la rigidité de la protéine, tandis que les groupes sulfhydryle sont impliqués dans la flexibilité moléculaire (Dissanayake & Vasiljevic, 2009). Nunes & Tavares, (2019) ont confirmé que l'agrégation des protéines du lactosérum, causée par les traitements thermiques, est fortement corrélée à la formation de liaisons disulfures, tandis que pour les traitements par ultrasons, l'agrégation dépend davantage de l'interaction hydrophobe intermoléculaire partielle que de la formation de liaisons disulfures.

2.2.3. Effet de la DIC sur la structure primaire des protéines du lactosérum (Tricine-SDS-PAGE)

Afin d'étudier l'effet de la DIC sur la structure primaire des protéines du lactosérum, une séparation électrophorétique des protéines natives et traitées par la DIC en fonction de leur poids moléculaire a été réalisée par la Tricine SDS-PAGE. Les profils électrophorétiques des deux applications sont illustrés dans la figure (40.a, b).

Les résultats montrent une différence significative entre les profils des protéines de différents traitements par rapport aux protéines natives. Le nombre et l'intensité des bandes des formes monomériques de β -Lg, α -La, et autres protéines mineurs ont été diminué dans tous les échantillons. Ces bandes ont disparues complètement lors de certains traitements (S3, S5, S6, S8, H1-H3, H5, H6) ce qui correspond au taux de dénaturation le plus élevé (> 90% pour la β -Lg, et > 80% pour α -La, et BSA, et > 90% pour le taux de réduction des groupements de thiols libre (selon les résultats de FPLC) dans ces échantillons par rapport aux autres échantillons. Nous pouvons supposer qu'il y a eu formation d'agrégats insolubles dans ces échantillons.

La disparition de la bande d' α -La et la diminution de l'intensité de la bande β -Lg sont notées pour (H8, H9, H15, H17 S12, S15, S17 et S18) en fonction de l'augmentation des conditions de traitement. La diminution de l'intensité des bandes signifie une diminution de la concentration et suggèrent que la DIC induit une modification probable de la structure primaire des protéines du lactosérum.

Nos résultats sont similaires avec ceux rapportés par Guillamón et al. (2008) où les profils électrophorétiques des protéines extraites à partir des graines de lupin traitées par la DIC ont montré une diminution dans l'intensité des bandes de conglutine α et la disparition de conglutine β avec l'augmentation du temps de traitement. L'effet de la DIC sur les protéines dépend de la matrice alimentaire et des conditions de traitement (Mahroug et al., 2020).

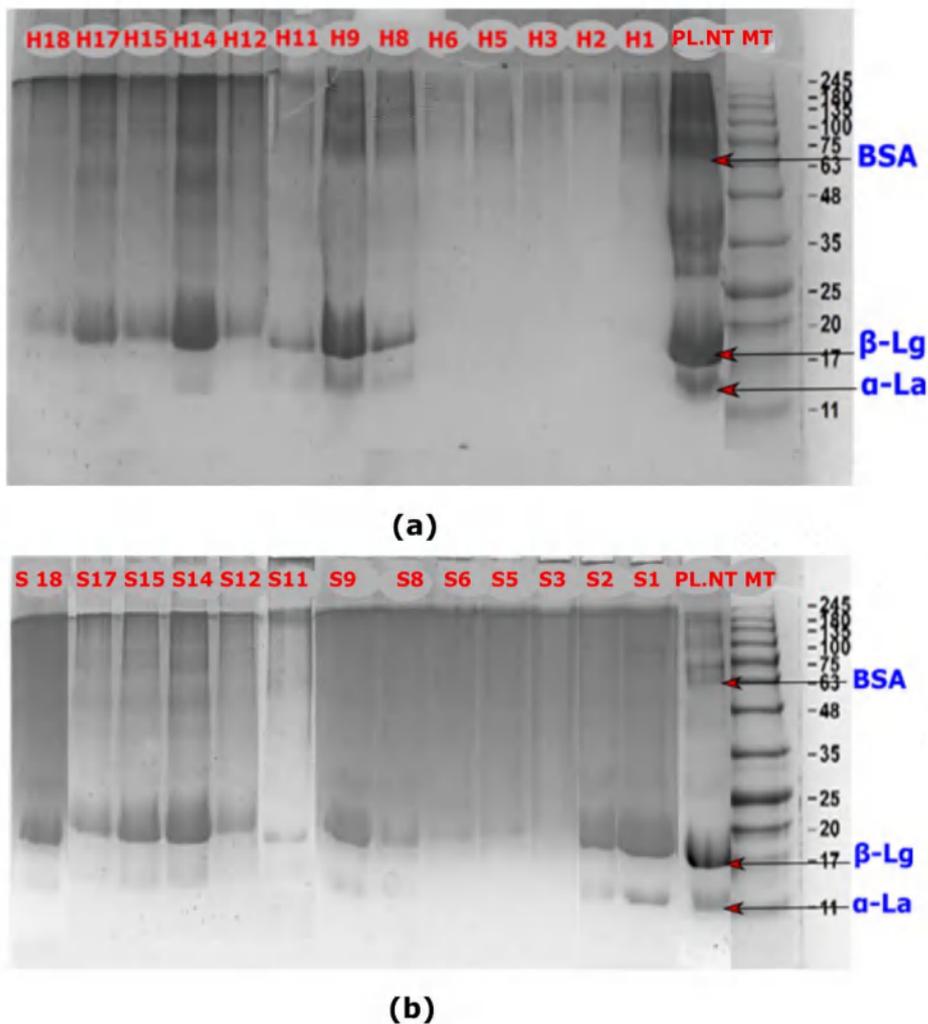


Figure 40: Profils électrophorétiques des protéines du lactosérum témoin et traités par la DIC pour les deux applications. **(a):** Application de la DIC à base humide (DIC-H); **(b):** Application de la DIC à base sèche (DIC-S). **MT:** Makeur de taille (kDa); **PL.NT:** Protéines du lactosérum non traité

Nous pouvons aussi constater que la DIC induit une modification faible dans les échantillons S14 et H14 par rapport aux autres échantillon ce qui pourrait être dû au fait qu'ils sont traités à faibles conditions de DIC (0,2 MPa pour 15 s) et présentent les faibles taux de dénaturation des protéines ce qui concorde avec les résultats précédents.

D'après les résultats obtenus, aux conditions minimales du traitement, la DIC provoque un degré de dénaturation sur les protéines du lactosérum plus élevé dans l'application à base humide que dans l'application à base sèche, donc l'humidité accélère la dénaturation. A base sèche, la dénaturation se fait progressivement avec le temps et la pression, par contre à base humide la dénaturation se fait instantanément avec l'augmentation de la pression. Aux conditions maximales de la DIC, il semble que la dénaturation est plus élevée dans l'application à base sèche qu'à base humide.

2.3. Impact de la DIC sur les propriétés techno-fonctionnelles des protéines du lactosérum

La structure des protéines peut changer lorsqu'ils sont soumis à différents traitements. Ces changements peuvent entraîner des comportements techno-fonctionnels différents (Nunes & Tavares, 2019). Dans cette partie de notre travail nous allons déterminer l'impact des traitements par la DIC sur les propriétés technologiques des protéines du lactosérum.

2.3.1. Solubilité

La Figure 41 montre les diagrammes de Pareto et des effets directs sur la solubilité pour les deux applications.

Pour l'application DIC à base sèche (DIC-S), l'effet linéaire de la pression et le temps et l'effet quadratique de la pression ont un effet significatif sur la solubilité des protéines. La solubilité diminue avec l'augmentation de la pression et le temps. Le modèle de régression est le suivant ($R^2 = 88,82$):

$$\text{Solubilité (DIC - S)} = 205,8 - 651 \times P - 3,102 \times T + 757 \times P^2 + 0,0315 \times T^2 + 1,84 \times P \times T$$

Pour l'application de la DIC à base humide (DIC-H), l'effet linéaire et quadratique de la pression ont un effet significatif sur la solubilité. La solubilité diminue avec l'augmentation de la pression. Le modèle de régression est le suivant ($R^2 = 70,90\%$):

$$\text{Solubilité (DIC - H)} = 2122,6 - 312 \times P - 1,664 \times T + 320 \times P^2 + 0,0185 \times T^2 + 1,29 \times P \times T$$

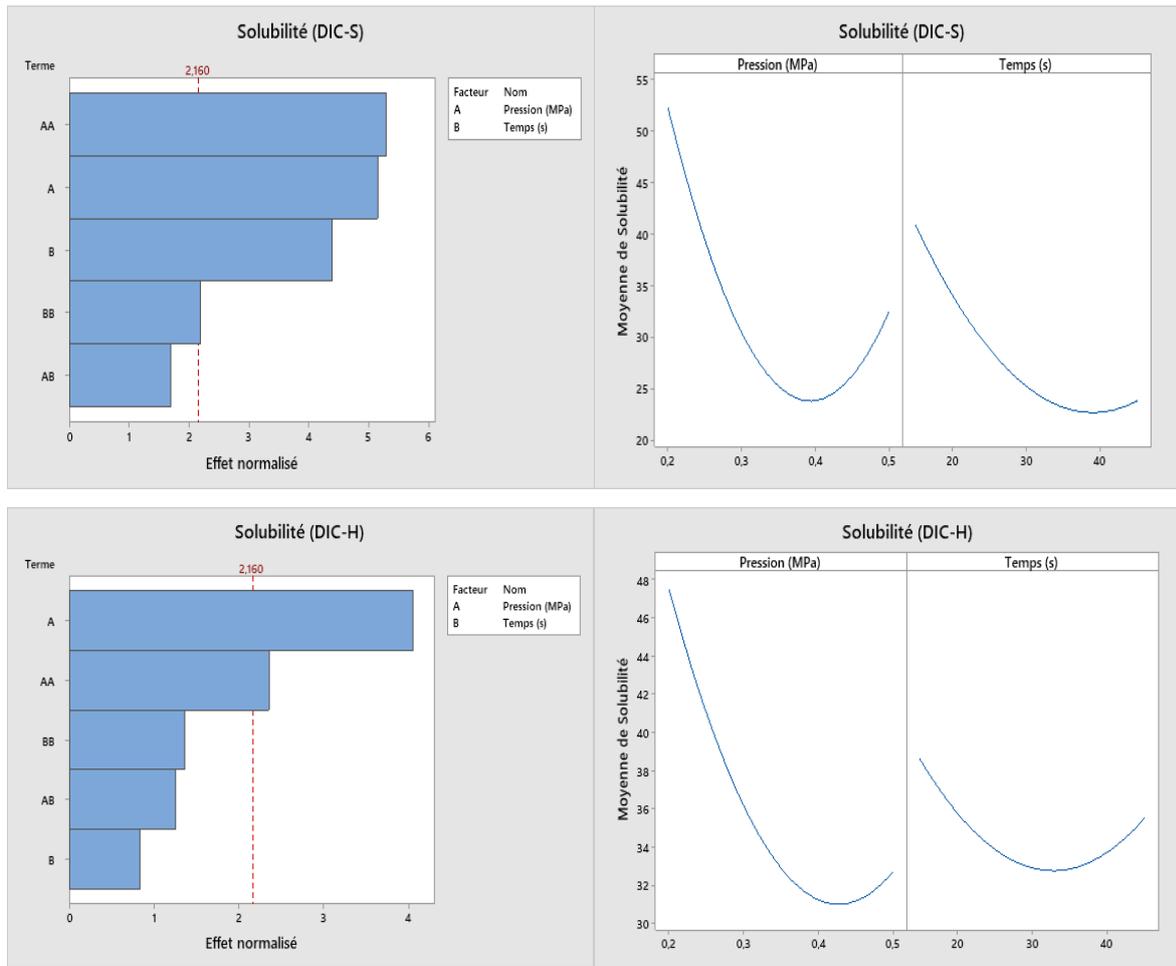


Figure 41: Diagramme de Pareto et des effets directs pour la solubilité des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications

La figure (42) présente les surfaces de réponse de l'effet de la DIC sur la solubilité des protéines du lactosérum pour les deux applications. Le traitement de la DIC a réduit significativement la solubilité, elle est passée de 89,79% pour les protéines du lactosérum natives à des solubilités qui varient entre 23 et 82% pour l'application DIC-S. et entre 25 et 60% pour l'application DIC-H.

La solubilité diminue avec l'augmentation de la pression et le temps. Le maximum de la solubilité est observé à 0,2 MPa/ 15s pour les deux applications avec une valeur de 81,23% correspondant à un taux de diminution de 9% pour DIC-S contre 60,44% correspond à un taux de diminution de 33% pour l'application DIC-H, ces conditions correspondent à une agrégation minimale.

Pour l'application DIC-S, le taux de la réduction maximale de la solubilité est de 76,15% correspondant à une solubilité minimale de 23,85% à 0,35 MPa/ 45s. En revanche pour l'application DIC-H, le taux de la réduction maximale de la solubilité est de 73,4% correspond à une valeur minimale de solubilité de 25,6% à 0,5 MPa/ 30s qui correspond au intervalle maximum de dénaturation de β -Lg.

Le taux de réduction maximale de la solubilité pour le traitement DIC-S ne correspond pas aux conditions de l'agrégation maximale et le minimum de la teneur en groupement thiols libres notées précédemment pour l'application a base sèche. Nous pouvons suggérer que pour ces conditions, il s'agissait d'un maximum d'agrégation avec une rupture des interactions hydrophobes intermoléculaires plus importante que la formation de liaisons disulfures.

Figure 42 : Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la solubilité des protéines du lactosérum pour les deux applications. **S:** Application de la DIC à base sèche (DIC-S); **H:** Application de la DIC à base humide (DIC-H)

Boughelout (2014), ont rapporté que la solubilité minimale des protéines du lactosérum traitées par DIC a été obtenue pour des pressions supérieures à 0,46 MPa et des temps supérieurs à 39s avec des taux inférieurs à 48%.

La réduction de la solubilité sous l'effet du traitement par la DIC a été également rapporté par Mahroug et al. (2020) pour le gluten où la solubilité des protéines est réduite de manière significative de 20 à 100%.

Selon Shen et al. (2016), la solubilité des protéines est liée aux interactions hydrophobes de surface (protéine-protéine) et hydrophiles (protéine-solvant). La solubilité d'une poudre pourrait être liée au degré de dénaturation des protéines (Mounir et al., 2010). Mahroug et al. (2020) ont rapporté que le traitement de la DIC induit des changement sur la l'hydrophobicité de surface du gluten. Certains changements irréversibles tels que la dénaturation, l'agrégation, le changement de l'hydrophobicité de surface et la perturbation de la conformation globulaire des protéines du lactosérum peuvent être causés par l'effet hydromécanique et thermique de la pression. Ces changements sont probablement responsables de la diminution de la solubilité.

La différence dans le degré de la solubilité entre les deux applications humide et sèche de la DIC peut être expliqué par le degré de dénaturation des protéines induit par la DIC dans chaque application.

2.3.2. Indice de l'activité émulsifiante (IAE)

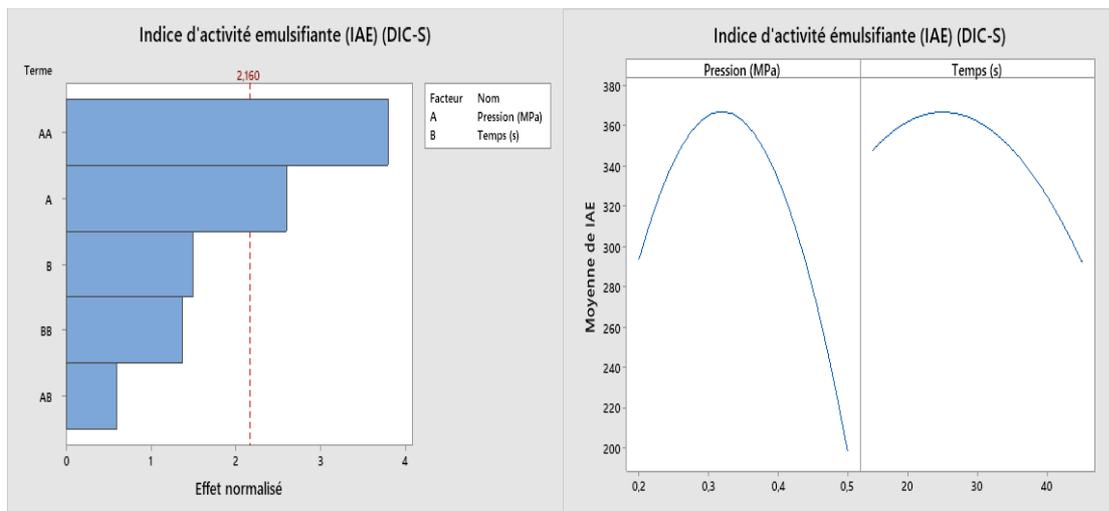
Les protéines sont des molécules amphiphiles qui permettent la production et la stabilisation des émulsions, elles se comportent comme de véritables agents tensioactifs en abaissant la tension interfaciale entre deux phases non miscibles et la formation d'un film rigide interfacial entourant les gouttelettes d'huile et cela en s'adsorbant aux interfaces.

D'après les diagrammes de Pareto et des effets directs (figure 43), l'effet quadratique et linéaire de la pression ont un effet significatif sur l'indice d'activité émulsifiante (IAE) dans l'application de la DIC-S. Le model de régression ($R^2= 73,27\%$) est suivant :

$$IAE (DIC - S) = -207 + 3107 \times P + 7,26 \times T - 5154 \times P^2 - 0,187 \times T^2 + 6,1 P \times T$$

Dans l'application DIC-H, la pression est le facteur majeur qui influe sur l'indice d'activité émulsifiante (IAE). Le model de régression ($R^2= 48,14\%$) est suivant :

$$IAE (DIC - S) = 893 - 1921 \times P - 17,3 \times T + 2258 \times P^2 + 0,272 \times T^2 + 2,2 P \times T$$



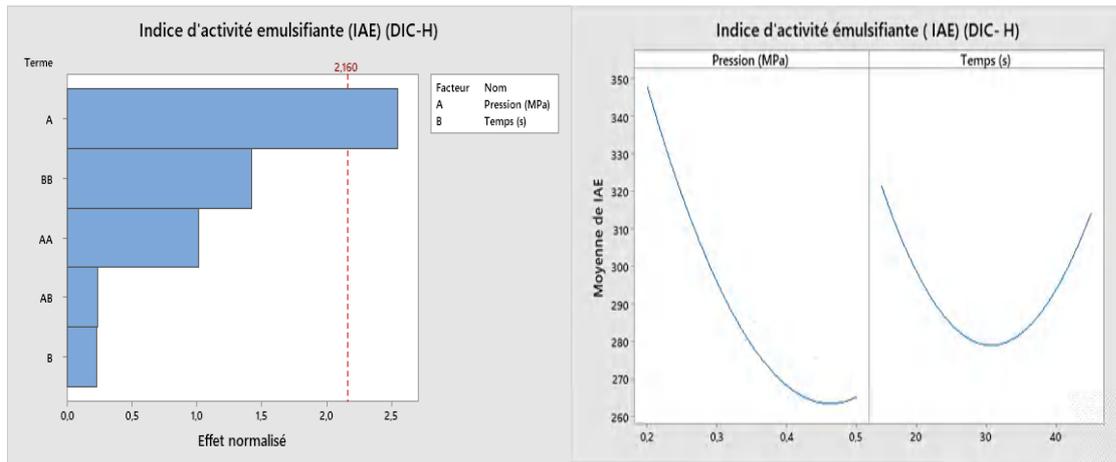


Figure 43 : Diagramme de Pareto et des effets directs pour l'indice de capacité émulsifiante (IAE) des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications

Les modèles non significatifs ne sont pas représentés par les surfaces de réponse. Dans ce cas nous avons tracé la surface de réponse de l'indice de capacité émulsifiante (IAE) de l'application à base sèche (DIC-S) qui présente $R^2=73,23\%$.

La figure (44) présente les surfaces de réponses de l'effet de la DIC sur l'IAE des protéines du lactosérum pour les deux applications. Les protéines du lactosérum natives ont une valeur d'IAE de $327 \text{ m}^2/\text{g}$, alors que les protéines du lactosérum traitées par la DIC changent de 167 à $384 \text{ m}^2/\text{g}$.

L'IAE a montré une amélioration après le traitement par la DIC-S pour des pressions entre $0,24$ et $0,40 \text{ MPa}$ et des temps inférieurs à 40s avec un IAE maximal de $383,66 \text{ m}^2/\text{g}$ à $0,35 \text{ MPa}/ 30\text{s}$ correspondant à un taux d'augmentation de 17% . Au-delà de ces conditions, l'IAE diminue avec l'augmentation des pressions et du temps et donne une activité minimale de $134,61 \text{ m}^2/\text{g}$ correspondant à un taux de réduction de $58,83\%$ aux conditions de $0,5 \text{ MPa}/ 30\text{s}$ correspondant au taux minimal de groupements thiols libres.

Boughelout, (2015), a montré que le pouvoir émulsifiant des protéines du lactosérum traité par la DIC présente une légère diminution qui ne dépasse pas les 10% quels que soient les conditions du traitement. Alors que Mounir & Allaf, (2017) ont montré que l'application de la DIC sur des protéines du jaune d'œuf améliore la capacité émulsifiante.

Les groupes hydrophobes se trouvent généralement à l'intérieur des molécules de protéines natives. Après le traitement de DIC, ces groupes peuvent être exposés à la surface et participer aux interactions intermoléculaires ce qui entraîne une augmentation de l'IAE dans certaines conditions de DIC.

Selon Baier et al. (2015), la pression élevée des traitements augmentait l'hydrophobicité de surface des protéines du lactosérum, en plus, les interactions hydrophobes jouent un rôle majeur dans l'émulsification, une hydrophobicité élevée provoque une augmentation de la probabilité d'adsorption des protéines à l'interface, donc elle influe sur la formation d'émulsion, mais n'affecte pas leur stabilisation.

Figure 44 : Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur l'indice d'activité émulsifiante (IAE) des protéines du lactosérum pour l'application de la DIC à base sèche (DIC-S).

2.3.3. Activité moussante et stabilité de la mousse

L'activité moussante est fortement liée à la capacité des protéines à être adsorbées rapidement à l'interface air-liquide durant le fouettage. Elle est également liée à sa capacité à former un film viscoélastique cohésif en raison des interactions intermoléculaire (Mounir & Allaf, 2017). Selon Audebert et al. (2019), l'activité de surface et la cinétique d'adsorption des protéines sont principalement déterminées par le pouvoir moussant, alors que les propriétés mécaniques du film déterminent la stabilité moussante.

Les diagrammes de Pareto et des effets directes (figure 45) montrent que les effets linéaires et quadratiques de la pression et le temps du traitement n'ont aucun effet significatif sur l'activité moussante dans l'application de la DIC-S. Le model de régression pour ($R^2=50,36\%$) est suivant :

Activité moussante (DIC – S)

$$= 152,2 - 216 \times P - 2,55 \times T + 253 \times P^2 + 0,0366 \times T^2 - 0,64 P \times T$$

Dans l'application de la DIC-H, l'effet quadratique du temps a un effet significatif sur l'activité moussante. Le model de régression ($R^2=64,41\%$) est le suivant :

Activité moussante (DIC – H)

$$= 95,6 - 98 \times P - 2,15 \times T + 244 \times P^2 + 0,0576 \times T^2 - 3,28 P \times T$$

Pour l'application de la DIC à base sèche (DIC-S), l'effet linéaire de la pression, quadratique de la pression et du temps ainsi que les interactions ont un effet significatif sur la stabilité de la mousse. Le model de régression ($R^2=84,92\%$) est le suivant :

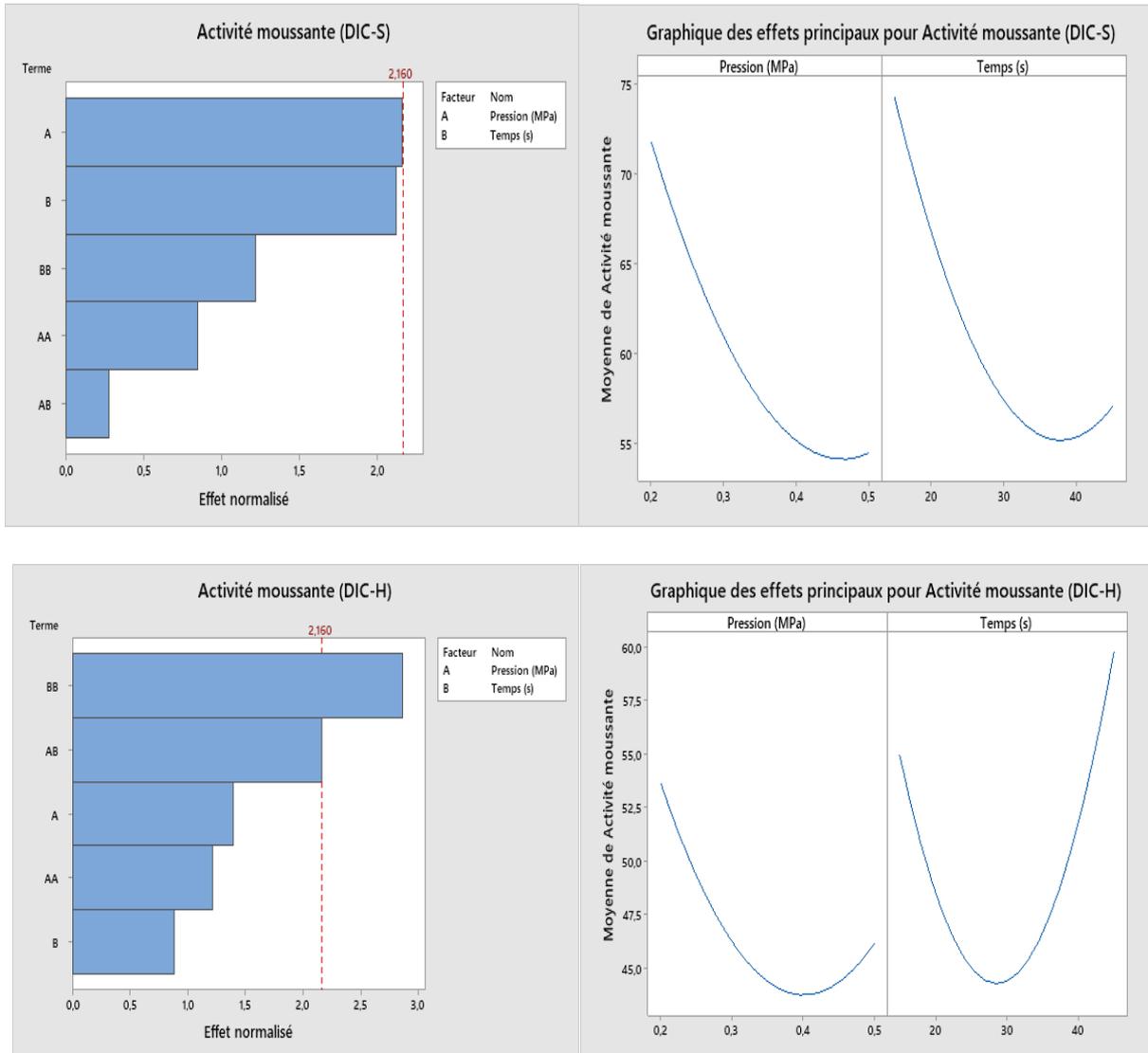
Stabilité moussante (DIC – S)

$$= 375,3 - 1118 \times P - 10,52 \times T + 1211 \times P^2 + 0,1352 \times T^2 + 5,44 P \times T$$

Dans l'application de la DIC-H, l'effet quadratique de la pression joue le rôle déterminant sur la stabilité de la mousse. Le model de régression ($R^2=57,92\%$) est le suivant:

Stabilité moussante (DIC – H)

$$= 131,6 - 833 \times P + 2,74 \times T + 1152 \times P^2 - 0,0516 \times T^2 + 0,47 P \times T$$



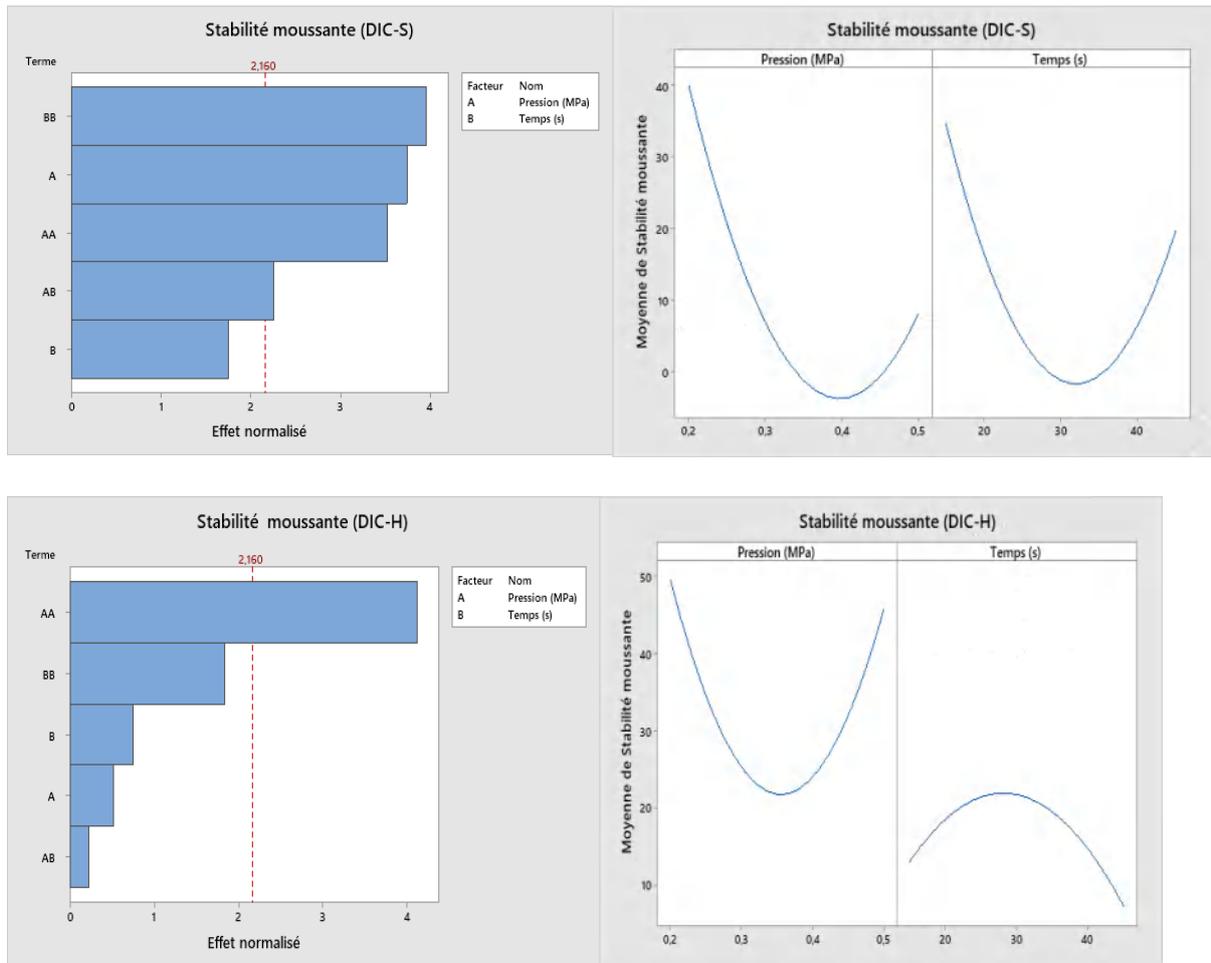


Figure 45: Diagramme de Pareto et des effets directs pour l’activité et la stabilité moussante des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications

Les modèles non significatifs ne sont pas représentés par les surfaces de réponse. Dans ce cas nous avons tracé uniquement la surface de réponse de la stabilité moussante de l’application à base sèche (DIC-S) qui présente $R^2=78,22\%$ (figure 46).

La stabilité de la mousse change entre 0 à 96,66% comparée à 20% pour les protéines du lactosérum native. La stabilité de la mousse diminue avec l’augmentation de la pression et du temps, le maximum de la stabilité moussante correspond aux faibles conditions de traitement (0,2 MPa/ 15s), avec un taux de 96,99% correspondant à un taux d’augmentation d’environ 76% par rapport aux protéines natives. Le minimum de la stabilité de la mousse a été observé à des pressions et de temps supérieur à 0,35 MPa et 25s respectivement avec des taux inférieurs à 20%.

Selon Mounir & Allaf, (2017), l’augmentation de volume de la mousse peut être due à certains facteurs structurels (comme la structure conformationnels de la protéine et les interactions protéine-protéine) autres que l’hydrophobie de la surface. Un dépliage plus rapide

et une plus grande interaction intermoléculaire à l'interface devrait former un film plus cohésif. L'interaction protéine-protéine renforce la nature cohésive du film, ce qui confère une stabilité et élasticité à la membrane.

Figure 46: Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la stabilité moussante des protéines du lactosérum pour l'application de la DIC à base sèche (DIC-S)

2.3.4. Capacité d'absorption d'eau (CAE)

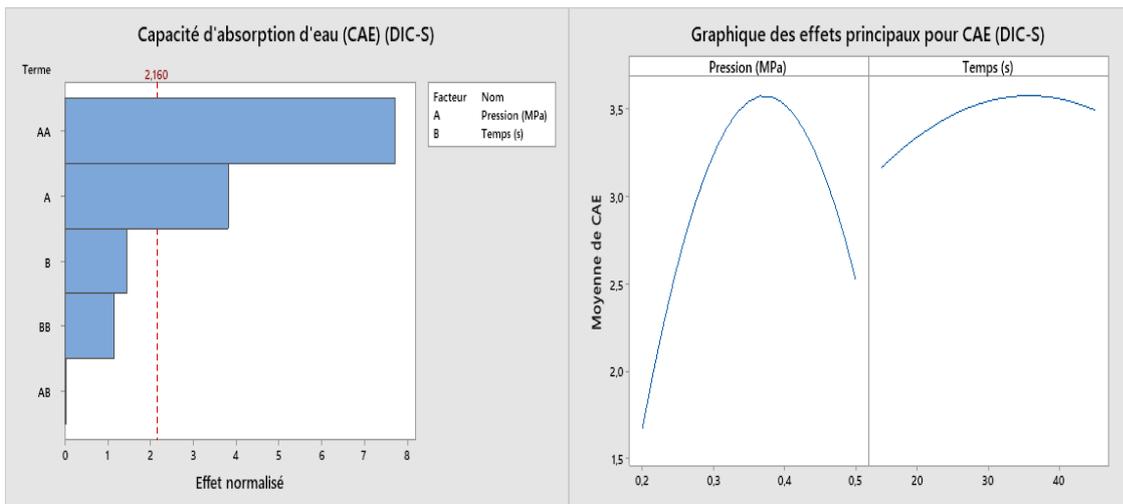
La CAE correspond à la quantité d'eau retenue ou absorbée par une matrice alimentaire humide ou sèche dans des conditions définies, y compris l'eau liée, l'eau hydrodynamique, l'eau capillaire, et l'eau piégée physiquement ou chimiquement (Mounir & Allaf, 2017).

Les diagrammes de Pareto et des effets directs (figure 47) montrent qu'uniquement l'effet quadratique et linéaire de la pression sont significatif pour la capacité d'absorption de l'eau (CAE) dans l'application de la DIC-S. Le model de régression est le suivant ($R^2=88,83\%$):

$$CAE (DIC - S) = -6,50 + 47,76 P + 0,0680 \times T - 64,26 \times P^2 - 0,000963 \times T^2 + 0,0023 \times P \times T$$

Dans l'application de la DIC-H, aucun effet n'est significatif. Le model de régression est le suivant ($R^2=28,31\%$):

$$CAE (DIC - H) = -0,39 + 8,48 \times P + 0,0915 \times T - 7,12 \times P^2 - 0,00072 \times T^2 - 0,1100 \times P \times T$$



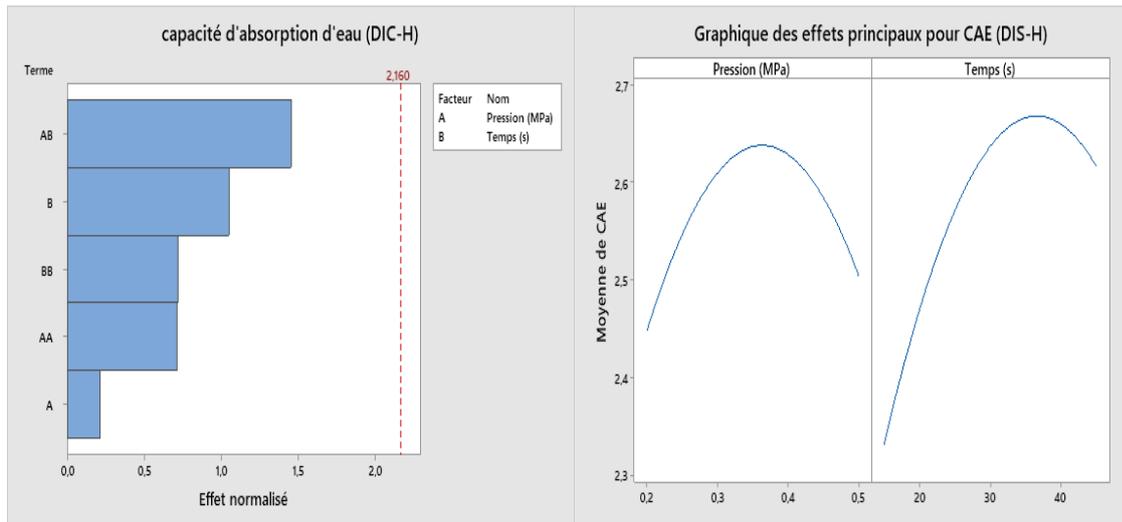


Figure 47: Diagramme de Pareto et des effets directs pour la capacité d'absorption d'eau (CAE) des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications

Nous avons tracé la surface de réponse de la capacité d'absorption de l'eau (CAE) de l'application à base sèche (DIC-S) ($R^2=88,83\%$) (figure 48).

Le traitement de la DIC-S améliore la CAE des protéines du lactosérum elle varie entre 0,80 et 3,76 g H₂O/g échantillon contre 0,10 g H₂O/g échantillon pour les protéines natives du lactosérum.

La CAE minimale a été observé dans les conditions de traitements minimales, tandis que le maximum a été observé à des pressions supérieures à 0,24 MPa quel que soit le temps.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la liaison entre l'eau et les protéines est renforcée par la dénaturation des protéines par la DIC et l'apparition ou l'exposition de résidus hydrophiles possibles ce qui améliore la CAE.

Nos résultats sont en bon agrément avec l'étude de Mounir & Allaf, (2017) qui ont rapporté que le traitement de la DIC augmente la CAE de la poudre du blanc et du jaune d'œuf, et qu'il peut s'expliquer par la dénaturation de l'albumen du blanc où les conditions sévères de chauffage peuvent renforcer la liaison entre les protéines et les molécules d'eau, donc la protéine serait dépliée présentant une augmentation de CAE.

La quantité d'eau liée aux protéines est strictement liée à leur acides aminés et augmente avec le nombre de résidus chargés, conformation, hydrophobie, pH, température, force ionique et concentration en protéines (Moure et al., 2006).

La DIC provoque l'expansion de la structure des protéines ce qui permet d'obtenir une structure poreuse qui a la capacité de piéger l'eau. Cet effet est plus significatif dans l'application à base sèche qu'à base humide.

Figure 48 : Surface de réponse de l'effet de traitement DIC sur la capacité d'absorption d'eau (CAE) des protéines du lactosérum de l'application de la DIC a base sèche (DIC-S).

2.3.5. Capacité d'absorption d'huile (CAH)

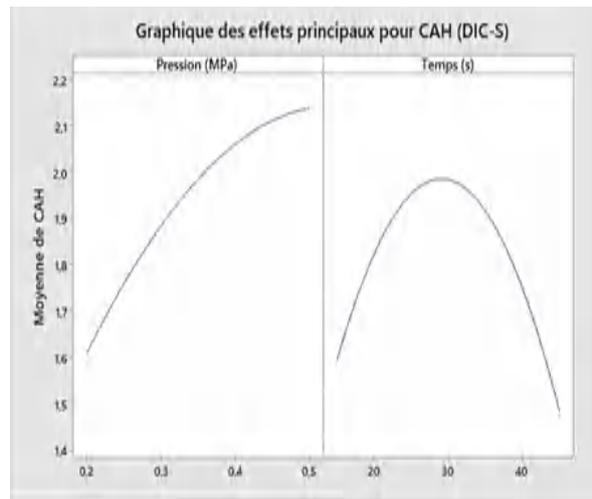
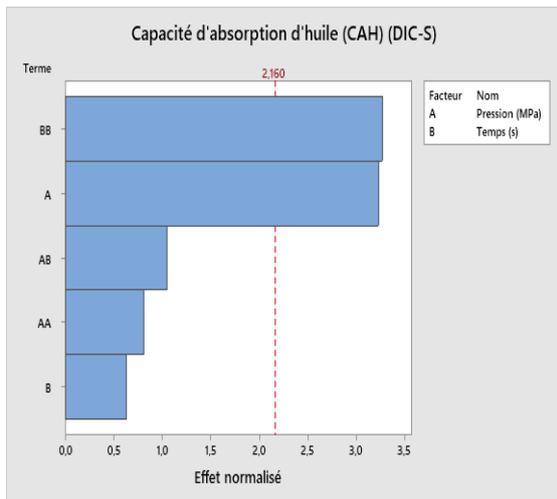
La CAH est déterminée par la quantité d'huile absorbée par le matériau, elle a été attribuée au piégeage physique d'huile dans des protéines, et aux liaisons non covalentes tels qu'hydrophobique, électrostatique, et les liaisons hydrogènes comme forces impliquées dans les interactions lipides-protéines (Wang et al., 2020).

Les diagrammes de Pareto et des effets directs (figure 49) montrent que l'effet quadratique du temps et linéaire de la pression ont un effet significatif sur la capacité d'absorption de l'huile (CAH) dans l'application de la DIC-S. Le model de régression est le suivant ($R^2 = 69,17\%$):

$$CAH(DIC - S) = -1,422 + 6,64 \times P + 0,1326 \times T - 4,92 \times P^2 - 0,001988 \times T^2 - 0,0481 \times P \times T$$

Dans l'application de la DIC-S, aucun effet n'est significatif sur la CAE. Le model de régression est le suivant ($R^2 = 40,95\%$):

$$CAH(DIC - H) = -1,61 + 16,75 \times P - 0,0191 \times T - 20,89 \times P^2 + 0,000876 \times T^2 - 0,0503 \times P \times T$$



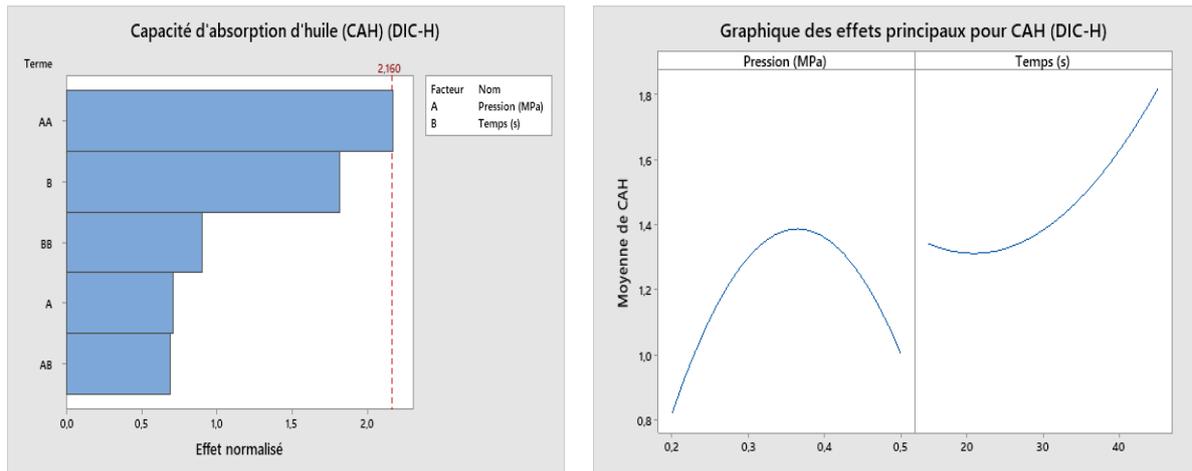


Figure 49 : Diagramme de Pareto des effets directs pour la capacité d’absorption d’huile (CAH) des protéines du lactosérum après le traitement de la DIC pour les deux applications.

Les modèles pour les deux applications ne sont pas significatifs ($R^2 < 70\%$)

La CAH est liée à la disponibilité des groupes non polaires de la protéine, qui peuvent interagir avec les lipides. Nous pouvons supposer que ces groupes sont peut-être exposés à la surface des protéines par rapport aux groupes polaires après le traitement de la DIC. Notons également que les conditions douces de chauffage (minimum température/ minimum pression- courte durée) dans le cas du jaune d’œuf ne devraient pas impliquer une force d’expulsion suffisante pour rejeter la graisse. Cette huile superficielle agirait ensuite comme une barrière empêchant l’absorption d’eau (Mounir & Allaf, 2017).

Les résultats obtenus ont montré que les poudres des protéines du lactosérum texturées par la DIC à base sèche présentaient des attributs de qualité élevés par rapport à celles obtenues à base humide. De plus, elles étaient meilleures que les poudres non traitées en termes de stabilité moussante et capacité d’absorption d’eau.

2.4. Corrélation entre les facteurs de traitement et les variables étudiées

L’analyse de l’ACP a été réalisée pour analyser la relation entre les facteurs de la DIC (pression et temps) et les différentes propriétés chimiques et techno-fonctionnelles étudiées dans cette partie de travail.

Dans le cas de l’application de la DIC à base sèche (DIC-S) (tableau 20), la pression et le temps sont inversement corrélés avec le taux des thiols libres, la concentration des protéines du lactosérum (β -Lg, α -La) et la solubilité. Alors que la pression est en corrélation positive avec la capacité d’absorption d’eau (CAE) (0,65) et capacité d’absorption d’huile (CAH) (0,72).

Le taux des groupements thiols libres est positivement corrélé avec la concentration de β -Lg, α -La et BSA.

La solubilité est positivement corrélée à la concentration de β -Lg (0,87), α -La (0,92) et BSA (0,81) et la teneur en thiols libres (0,89).

L'activité moussante est positivement corrélée à la concentration de BSA (0,64), et en thiols libres (0,65). La stabilité moussante est en corrélation positive avec la concentration de BSA, le taux de thiols libres et la solubilité.

La capacité d'absorption d'eau (CAE) est en corrélation inverse avec la concentration des protéines du lactosérum (β -Lg et l' α -La), la teneur en groupements thiols (0,85), la solubilité (0,84) et stabilité moussante (0,76)

La capacité d'absorption d'huile (CAH) est inversement corrélée à la concentration de BSA, le taux de thiols libres, la solubilité, l'activité et la stabilité moussante, et en corrélation positive avec la CAE (0,63).

Dans le cas de l'application de la DIC à base humide (DIC-H) (tableau 21), la pression et le temps sont inversement corrélés à la concentration des protéines du lactosérum de β -Lg. La pression est inversement corrélée avec la concentration d' α -La et BSA, le taux de thiols libres et la solubilité. Le temps est positivement corrélé avec la capacité d'absorption d'huile (CAE) (0,57).

Le taux des thiols libres est positivement corrélé avec la concentration de la β -Lg (0,89), l' α -La (0,94), et BSA (0,78).

La solubilité est positivement corrélée avec le taux de la β -Lg (0,95), de l' α -La (0,97), de la BSA (0,91), du taux des thiols libres (0,90). La capacité d'absorption d'eau (CAE) est inversement corrélée avec la concentration d' α -La (0,58), BSA (0,75), et la solubilité (0,61).

Selon Mounir et al. (2010), l'effet texturant de la DIC dépend de la quantité de vapeur générée par l'auto-vaporisation et de la transition vitreuse, ces deux facteurs sont donc très corrélés à la teneur en eau initiale du matériau. Zhou et al. (2008), ont signalé que divers facteurs ont un effet sur l'agrégation, notamment la teneur en eau, le pH, et le taux de NaCl.

Tableau 20: Matrice de corrélation (Pearson) des propriétés chimique et techno-fonctionnelle des protéines du lactosérum traitées par la DIC à base sèche (DIC-S)

Variables	Pression (MPa)	Temps (s)	Concentration de β -Lg	Concentration de α -La	Concentration de BSA	Concentration des thiols libres	Concentration des thioles libres	Indice d'activité d'emulsification (IAE)	Activité moussante (%)	Stabilité de la mousse (%)	Capacité d'absorption d'eau	Capacité d'absorption d'huile (CAH)
Pression (MPa)	1	0.354	-0.708	-0.660	-0.491	-0.613	-0.694	-0.339	-0.288	-0.311	0.488	0.720
Temps (s)	0.354	1	-0.620	-0.743	-0.486	-0.604	-0.628	-0.220	-0.303	-0.151	0.313	0.359
Concentration de β -Lg	-0.708	-0.620	1	0.915	0.688	0.743	0.874	-0.028	0.268	0.328	-0.678	-0.857
Concentration de α -La	-0.660	-0.743	0.915	1	0.826	0.862	0.916	0.078	0.412	0.407	-0.724	-0.810
Concentration de BSA	-0.491	-0.486	0.688	0.826	1	0.881	0.809	-0.034	0.635	0.586	-0.756	-0.755
Concentration des thiols libres	-0.613	-0.604	0.743	0.862	0.881	1	0.889	-0.093	0.646	0.656	-0.851	-0.717
Solubilité	-0.694	-0.628	0.874	0.916	0.809	0.889	1	-0.099	0.307	0.638	-0.840	-0.761
Indice d'activité d'emulsification (IAE)	-0.339	-0.220	-0.028	0.078	-0.034	-0.093	-0.099	1	0.142	-0.348	0.369	-0.063
Activité moussante (%)	-0.288	-0.303	0.268	0.412	0.635	0.646	0.307	0.142	1	0.437	-0.433	-0.458
Stabilité de la mousse (%)	-0.311	-0.151	0.328	0.407	0.586	0.656	0.638	-0.348	0.437	1	-0.763	-0.443
Capacité d'absorption d'eau	0.488	0.313	-0.678	-0.724	-0.756	-0.851	-0.840	0.369	-0.433	-0.763	1	0.633
Capacité d'absorption d'huile	0.720	0.359	-0.857	-0.810	-0.755	-0.717	-0.761	-0.063	-0.458	-0.443	0.633	1

Tableau 21 : Matrice de corrélation (Pearson) des propriétés chimique et techno-fonctionnelle des protéines de lactosérum traitées par la DIC à base humide (DIC-H).

Variables	Pression (MPa)	Temps (s)	Concentration de β -Lg (mg/mL)	Concentration de α -La (mg/mL)	Concentration de BSA (mg/mL)	Concentration des thiols libres	Solubilité (%)	IAE	Activité moussante (%)	Stabilité de la mousse (%)	CAE	CAH
Pression (MPa)	1	0.354	-0.782	-0.851	-0.625	-0.955	-0.782	-0.460	-0.165	0.012	0.330	0.422
Temps (s)	0.354	1	-0.542	-0.515	-0.486	-0.524	-0.531	-0.096	0.135	-0.033	0.449	0.565
Concentration de β -Lg (mg/mL)	-0.782	-0.542	1	0.959	0.810	0.893	0.952	0.367	0.097	0.062	-0.495	-0.536
Concentration de α -La (mg/mL)	-0.851	-0.515	0.959	1	0.841	0.941	0.974	0.481	0.147	0.101	-0.579	-0.463
Concentration de BSA (mg/mL)	-0.625	-0.486	0.810	0.841	1	0.784	0.906	0.475	-0.036	0.112	-0.751	-0.426
Concentration des thiols libres	-0.955	-0.524	0.893	0.941	0.784	1	0.904	0.506	0.086	0.073	-0.465	-0.501
Solubilité (%)	-0.782	-0.531	0.952	0.974	0.906	0.904	1	0.516	0.156	0.188	-0.613	-0.521
IAE	-0.460	-0.096	0.367	0.481	0.475	0.506	0.516	1	0.322	0.430	-0.106	-0.176
Activité moussante (%)	-0.165	0.135	0.097	0.147	-0.036	0.086	0.156	0.322	1	0.081	0.287	-0.140
Stabilité de la mousse (%)	0.012	-0.033	0.062	0.101	0.112	0.073	0.188	0.430	0.081	1	-0.165	-0.089
CAE	0.330	0.449	-0.495	-0.579	-0.751	-0.465	-0.613	-0.106	0.287	-0.165	1	0.256
CAH	0.422	0.565	-0.536	-0.463	-0.426	-0.501	-0.521	-0.176	-0.140	-0.089	0.256	1

**CONCLUSION
GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES**

Le lactosérum est un ingrédient laitier à part entière toujours utilisé en alimentation humaine. Les protéines du lactosérum sont largement utilisées, pour leurs propriétés nutritionnelles et fonctionnelles, dans l'industrie agroalimentaire. Ce sont également des ingrédients bien adaptés pour les aliments diététiques, elles sont utilisées dans la formulation des laits maternisés pour nourrissons, des laits hypoallergéniques et des préparations infantiles de diversification. Les protéines du lactosérum présentent l'inconvénient d'être un allergène majeur des protéines du lait et présentent peu de propriétés fonctionnelles adaptées pour les conditions de travail de l'industrie alimentaire (pH, température).

L'objectif de notre travail visait l'étude de l'impact de l'hydrolyse par deux protéases ainsi que le traitement par la détente instantanée contrôlée (DIC) sur la structure et les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum.

Ce travail est divisé en deux parties, la première partie a été consacrée à l'étude de l'effet de l'hydrolyse enzymatique sur les protéines du lactosérum et leur propriétés biologiques et technologiques, en valorisant des protéases non utilisées jusqu'à présent à savoir la ficine extraite du latex du figuier et la pepsine du poulet, extraite du proventricule, sous-produit de la technologie aviaire. La deuxième partie a concerné l'étude de l'impact du traitement par la détente instantanée contrôlée (DIC) sur la structure et les propriétés technologiques des protéines du lactosérum.

Les résultats obtenus de la première partie ont montré que le rendement de l'extraction de la ficine est de 60% alors qu'il est de 5,4% pour la pepsine du poulet. L'activité spécifique de la ficine est 3 fois supérieure que l'activité de la pepsine du poulet. Le profil électrophorétique des extraits enzymatiques a montré que la ficine a présenté un poids moléculaire de 27,5 kDa, alors que la pepsine du poulet a présenté deux variant avec un poids moléculaire de 33 et 37 kDa. L'activité protéolytique maximale a été notée à pH 7,5 et une température de 80 °C pour la ficine, et à pH 2 et une température de 50°C pour la pepsine du poulet.

L'hydrolyse des protéines du lactosérum a montré que l'étendu de l'hydrolyse exprimé en degré d'hydrolyse par la ficine est significativement supérieur que celui de la pepsine du poulet et la pepsine porcine (pepsine pure utilisée comme référence). L'extrait de la ficine a présenté une grande affinité pour l'hydrolyse de la β -Lg et l' α -La, alors que la pepsine du poulet et la pepsine porcine ont hydrolysé principalement l' α -La et ont eu un effet très limité sur la β -Lg.

La quasi-totalité de la β -Lg est hydrolysée dès les premières 30 min par la ficine avec un taux d'hydrolyse de 87% et 97% pour les deux ratios E/S 0,5% et 1% respectivement. En revanche, 62,8% et 72,4% de la β -Lg sont restés intacts après hydrolyse par la pepsine du poulet et la pepsine porcine respectivement et cela après 6h d'hydrolyse a un ratio E/S 1%. L'hydrolyse de la presque totalité de la β -Lg dans un temps aussi court (30 min) sans aucun traitement préalable et sans combinaison d'enzyme est un résultat jamais rapporté par les travaux antérieurs et pour n'importe quelle protéase. Ceci ouvre la voie à des utilisations potentielles soit en technologie alimentaire (préparation d'hydrolysats poussés de protéines du lactosérum) ou autres technologies tels que les industries de détergents, de textile et de traitement des eaux usées etc.

L' α -La est complètement hydrolysée par la ficine à 30 min pour les deux ratios E/S. L'hydrolyse complète par les deux pepsines est beaucoup plus lente, elle se produit après 2h pour le ratio E/S 1% et après 6h pour le ratio E/S 0,5% pour la pepsine du poulet. En revanche la pepsine porcine a montré l'activité la plus faible avec un temps d'hydrolyse de 6h pour les deux ratios.

Les hydrolysats de ficine (HPL.F) et de pepsine de poulet (HPL.P) ont subi une ultrafiltration par une membrane de 3 kDa. Les fractions dont le poids moléculaire est inférieur à 3 kDa ont été identifiées par LC Ms/Ms.

Les peptides issus de la fraction HPL.F ont présenté un poids moléculaire allant de 970 à 1790 Da. L'hydrolyse de la β -Lg a produit 10 peptides avec une prédominance du peptide ELKPTPEGDLEILL, alors que l'hydrolyse de l' α -La n'a produite que 2 peptides où le peptide RELKDLKGYG représente la presque totalité. Ces résultats indiquent que la ficine agit de manière très spécifique sur une liaison peptidique de l' α -La et n'a pas de spécificité pour la β -Lg.

La fraction dont le poids moléculaire est inférieur à 3 kDa des hydrolysats de pepsine du poulet a montré la présence de 39 peptides riches en acides aminés aromatiques et hydrophobes dont le poids moléculaire varie entre 800 Da et 2300 Da. La pepsine du poulet semble agir de manière étroitement spécifique sur l'extrémité N-terminale des liaisons peptidiques de la β -Lg et l' α -La.

Pour les propriétés techno-fonctionnelles, nous avons noté que l'hydrolyse améliore la solubilité de tous les hydrolysats sur toute la gamme du pH et quel que soit la protéase utilisée en comparaison avec les protéines natives du lactosérum. La solubilité des hydrolysats de la

pepsine du poulet est plus faible par rapport à celle des hydrolysats de la ficine et de la pepsine porcine. En revanche, l'activité émulsifiante et le pouvoir moussant, ont été améliorés pour les hydrolysats de la pepsine du poulet quel que soit le pH et pour les hydrolysats de la pepsine porcine pour les pH supérieurs à 6.

Concernant les propriétés biologiques, l'hydrolyse a amélioré d'une façon notable les propriétés biologiques des hydrolysats quel que soit l'enzyme utilisée. L'activité antioxydante des hydrolysats de la ficine est 100 fois supérieure à celle des protéines natives, celle de la pepsine du poulet est 18 fois supérieure et de la pepsine porcine est 15 fois supérieure que celle des protéines natives.

La fraction dont le poids moléculaire est inférieur à 3 kDa a présenté une capacité de piégeage des radicaux libres par la méthode ORAC significativement plus élevée ($p < 0,5$) elle est supérieur que pour la fraction dont le poids moléculaire est supérieur à 3 kDa pour les hydrolysats de la ficine et la pepsine du poulet.

L'activité inhibitrice de l'Enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) (activité anti-hypertensive) des hydrolysats de la ficine est largement supérieure à celle des hydrolysats de la pepsine du poulet. Les fractions dont le poids moléculaire est inférieur à 3 kDa ont une activité inhibitrice supérieur aux hydrolysats et aux fractions dont le poids moléculaire est supérieur à 3 kDa.

La prédiction de l'allergénicité des peptides identifiés a été effectuée à l'aide de la base de donné BIOPEP, les résultats ont montré que la fréquence de l'allergénicité des peptides est diminuée en comparaison avec la protéine intacte, ce qui signifie que l'hydrolyse a réduit l'allergénicité de la β -Lg et de l' α -La avec des taux de réduction de 63,04% et 36,95% respectivement par la ficine, et de 62,6% et de et 55,91% respectivement par la pepsine du poulet.

Ces résultats innovant ont été valorisé à travers deux publications internationales de renom. La première publication intitulée «**Functional properties of peptides obtained from whey proteins by ficin extract hydrolysis**» a été publiée dans la revue «*Food Bioscience*». La deuxième publication est intitulée «**Whey protein derived peptides: the impact of chicken pepsin hydrolysis upon whey proteins concentrate on their biological and technological properties**» et publiée dans la revue «*International Dairy Journal*».

Les résultats obtenus dans la deuxième partie, ont montré que pour le traitement à base sèche et aux conditions minimales, la dénaturation des protéines se fait progressivement avec l'augmentation de la pression et le temps, cependant pour le traitement à base humide la dénaturation se fait instantanément avec l'augmentation de la pression. La dénaturation des protéines du lactosérum est plus importante dans l'application à base humide que dans l'application à base sèche. En revanche, aux conditions maximales de la DIC, il semble que la dénaturation est plus marquée dans l'application à base sèche qu'à base humide.

Les résultats obtenus ont montré que les poudres des protéines de lactosérum traitées par la DIC à base sèche présentaient des propriétés meilleures que celles obtenues à base humide. De plus, elles étaient meilleures que les poudres non traitées en termes de stabilité de la mousse et la capacité d'absorption d'eau.

Dans l'application à base sèche (DIC-S), la pression et le temps sont en corrélation négative avec les concentrations des protéines du lactosérum restant intactes, la teneur en thiols libres et la solubilité, et en corrélation positive avec la capacité d'absorption d'eau (CAE) et d'huile (CAH). En revanche dans l'application humide (DIC-H) la pression est le facteur majeur qui est corrélé négativement avec les concentrations des protéines du lactosérum restant intactes la teneur en thiols libres, et la solubilité. Le temps est corrélé positivement avec la capacité d'absorption d'huile (CAH).

Le traitement par la DIC a donné une poudre de protéines du lactosérum avec une qualité intermédiaire en terme de solubilité, d'indice d'activité émulsifiante, du pouvoir moussant, et une qualité supérieure en terme de stabilité moussante, capacité d'absorption d'eau et d'huile (CAE). Généralement, la qualité de la poudre des protéines du lactosérum a été améliorée pour l'application DIC-S que pour l'application DIC-H. Ce qui montre que l'humidité initiale de la poudre a un effet considérable sur le comportement des protéines lors de l'application de la DIC.

Les résultats de ce travail ont été rédigés et sont en cours de soumission, l'article est intitulé « **Impact of instant controlled pressure drop (DIC) treatment on the structure and techno-functional properties of whey proteins** ».

A l'issue de ce travail, les résultats obtenus sont très probant, nous avons pu démontrer que :

- La ficine présente un fort pouvoir protéolytique de la β -Lg qui a été complètement hydrolysée pendant une courte durée par rapport aux autres protéases. ;
- L'hydrolyse a donné des produits ayant des propriétés biologiques très intéressantes (activité antioxydante élevée, activité antihypertensive améliorée et potentiel immunoréactif réduit) ce qui augmente considérablement leur valeur ajoutée comme ingrédient diététique pour la formulation d'aliments fonctionnels ;
- L'hydrolyse a amélioré certaines propriétés technologiques telles que la solubilité l'indice d'activité émulsifiante (IAE) et l'activité moussante ;
- Le traitement de la DIC a provoqué l'agrégation des protéines et a pu améliorer certaines propriétés technologiques tels que la capacité d'absorption d'eau (CAE) et d'huile (CAH).

En perspective et en complément de ce travail il serait intéressant de :

- Optimiser les conditions d'hydrolyse des protéines par les deux protéases (ficine, pepsine du poulet)
- Etudier l'impact de l'hydrolyse sur l'immunoréactivité des protéines du lactosérum en utilisant des tests in vitro et in vivo
- Formuler des produits diététiques à base de ces hydrolysats (formules infantiles hypoallergéniques ou de diversification.... etc.)
- Etudier le comportement à l'hydrolyse des protéines du lactosérum après traitement par la DIC
- Déterminer l'impact de la DIC sur la structure des protéines du lactosérum
- Optimiser les conditions du traitement de la DIC en ajoutant le facteur d'humidité.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S. L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010>
2. Abd EL Rahim, A. (2020). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Enzymatic Hydrolysates of Camel's Milk Whey Protein and Casein. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 11(2), 45-50. <https://doi.org/10.21608/jfds.2020.78877>
3. Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2017). Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1119-1132.
4. Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2019). Reduction of Milk Protein Antigenicity by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. A Review. *Food Reviews International*, 37(3), 276-295. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1701010>
5. Abrar, T. (2017). Bacterial Protease Enzyme: Safe and Good Alternative for Industrial and Commercial Use. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 3, 1-10.
6. Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality : Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1435-1443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.053>
7. Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1256-1262.
8. Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19870419770>
9. Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 244-256. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.003>
10. Alais, C., Linden, G., & Miclo, L. (2003). Biochimie alimentaire. 5ème édition de l'abrégé. *Dunod, Paris*.

11. Allaf, K., & Vidal, P. (1989). Feasibility study of a new process of drying/swelling by instantaneous decompression towards vacuum. *Chemical Engineering Department, University of Technology of Compiègne, Compiègne, France.*
12. Alvarado Pérez, Y., Muro Urista, C., Maciel Cerda, A., Álvarez Sánchez, J., & Riera Rodríguez, F. (2018). Antihypertensive and Antioxidant Properties from Whey Protein Hydrolysates Produced by Encapsulated *Bacillus subtilis* Cells. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(2), 681-689. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9714-9>
13. Ambrosi, V., Polenta, G., Gonzalez, C., Ferrari, G., & Maresca, P. (2016). High hydrostatic pressure assisted enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.009>
14. Amundson, C. H., Watanawanichakorn, S., & Hill, C. G. (1982). Production of enriched protein fractions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from cheese whey. *Journal of Food Processing and Preservation*, 6(2), 55-71. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.1982.tb00643.x>
15. Arrutia, F., Rubio, R., & Riera, F. A. (2016). Production and membrane fractionation of bioactive peptides from a whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 184, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.010>
16. Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018>
17. Assem, F. M., Abd El-Gawad, M. A. M., Kassem, J. M., & Abd El-Salam, M. H. (2017). Proteolysis and antioxidant activity of peptic, tryptic and chymotryptic hydrolysates of cow, buffalo, goat and camel caseins. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 236-242. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12400>
18. Athira, S., Mann, B., Saini, P., Sharma, R., Kumar, R., & Singh, A. K. (2015). Production and characterisation of whey protein hydrolysate having antioxidant activity from cheese whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(14), 2908-2915. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7032>
19. Audebert, A., Beaufils, S., Lechevalier, V., Le Floch-Fouéré, C., Saint-Jalmes, A., & Pezennec, S. (2019). How foam stability against drainage is affected by conditions of prior whey protein powder storage and dry-heating : A multidimensional experimental

- approach. *Journal of Food Engineering*, 242, 153-162.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.029>
20. Baier, D., Schmitt, C., & Knorr, D. (2015). Changes in functionality of whey protein and micellar casein after high pressure – low temperature treatments. *Food Hydrocolloids*, 44, 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.010>
21. Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278(1-3), 381-386. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.05.055>
22. Ballatore, M. B., Bettiol, M. del R., Vanden Braber, N. L., Aminahuel, C. A., Rossi, Y. E., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Cavaglieri, L. R., & Montenegro, M. A. (2020). Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chemistry*, 319, 126472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126472>
23. Bamdad, F., Bark, S., Kwon, C. H., Suh, J.-W., & Sunwoo, H. (2017). Anti-Inflammatory and antioxidant properties of peptides released from β -lactoglobulin by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis. *Molecules*, 22(6), 949. <https://doi.org/10.3390/molecules22060949>
24. Banach, J. C., Lin, Z., & Lamsal, B. P. (2013). Enzymatic modification of milk protein concentrate and characterization of resulting functional properties. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.023>
25. Barros, R. M., & Malcata, F. X. (2002). Modeling the kinetics of whey protein hydrolysis brought about by enzymes from *Cynara cardunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4347-4356. <https://doi.org/10.1021/jf0200319>
26. Barros, R. M., & Malcata, F. X. (2006). Molecular characterization of peptides released from β -lactoglobulin and α -lactalbumin via cardosins A and B. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 483-494. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72111-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72111-7)
27. Bohak, Z. (1970). [22] Chicken pepsinogen and chicken pepsin. In *Methods in Enzymology* (Vol. 19, p. 347-358). Elsevier.
28. Bordenave-Juchereau, S., Almeida, B., Piot, J.-M., & Sannier, F. (2005). Effect of protein concentration, pH, lactose content and pasteurization on thermal gelation of acid caprine whey protein concentrates. *Journal of dairy research*, 72(1), 34-38.

29. Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., & Legrand, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 16(4), 275-284. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.05.004>
30. Boughellout H., (2014). *Allergies aux protéines du lait de vache en Algérie: Solutions technologiques proposées*. Thèse de doctorat, Université Frère Mentouri Constantine1, Alg
31. Boughellout, H., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J. M., Haertle, T., Mounir, S., Allaf, K., & Zidoune, M. N. (2013). Effect of instant controlled pressure drop (DIC) treatment on milk protein's immunoreactivity. *Food and Agricultural Immunology*, 26(1), 71-81.
32. Bozanic, R., Barukcic, I., Lisak Jakopovic, K., & Tratnik, L. (2014). Possibilities of whey utilisation, Austrin. *J Nutr Food Sci*, 2, 7.
33. Brandelli, A., Daroit, D. J., & Corrêa, A. P. F. (2015). Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149-161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016>
34. Brew, K., & Grobler, J. A. (1992). α -lactalbumin. *Advanced dairy chemistry-1 : Proteins*, 191-229.
35. Brodkorb, A., Croguennec, T., Bouhallab, S., & Kehoe, J. J. (2016). Heat-induced denaturation, aggregation and gelation of whey proteins. In *Advanced dairy chemistry* (pp. 155-178). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_6
36. Buggy, A. K., McManus, J. J., Brodkorb, A., Carthy, N. M., & Fenelon, M. A. (2017). Stabilising effect of α -lactalbumin on concentrated infant milk formula emulsions heat treated pre- or post-homogenisation. *Dairy Science & Technology*, 96(6), 845-859. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0306-1>
37. Caessens, P. W. J. R., Gruppen, H., Visser, S., van Aken, G. A., & Voragen, A. G. J. (1997). Plasmin Hydrolysis of β -Casein : Foaming and Emulsifying Properties of the Fractionated Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2935-2941. <https://doi.org/10.1021/jf9700889>
38. Carullo, D., Barbosa-Cánovas, G. V., & Ferrari, G. (2020). Changes of structural and techno-functional properties of high hydrostatic pressure (HHP) treated whey protein isolate over refrigerated storage. *LWT*, 137, 110436. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110436>

39. Carvalho, N. C. de, Pessato, T. B., Fernandes, L. G. R., Zollner, R. de L., & Netto, F. M. (2017). Physicochemical characteristics and antigenicity of whey protein hydrolysates obtained with and without pH control. *International Dairy Journal*, *71*, 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.02.007>
40. Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater : Characterization and treatment. *Science of the total environment*, *445*, 385-396.
41. Chatterton, D. E. W., Smithers, G., Roupas, P., & Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin—Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, *16*(11), 1229-1240. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.001>
42. Cheison, S. C., & Kulozik, U. (2015). Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis : A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(2), 418-453. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.959115>
43. Cheison, S. C., Leeb, E., Toro-Sierra, J., & Kulozik, U. (2011). Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native alpha-lactalbumin. *International Dairy Journal*, *21*(3), 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.008>
44. Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S.-Y. (2007). Preparation of whey protein hydrolysates using a single- and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: Characterization by Multivariate Data Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(10), 3896-3904. <https://doi.org/10.1021/jf062936i>
45. Cheung, L. K. Y., Aluko, R. E., Cliff, M. A., & Li-Chan, E. C. Y. (2015). Effects of exopeptidase treatment on antihypertensive activity and taste attributes of enzymatic whey protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, *13*, 262-275. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.036>
46. Chicón, R., Belloque, J., Alonso, E., & López-Fandiño, R. (2009). Antibody binding and functional properties of whey protein hydrolysates obtained under high pressure. *Food Hydrocolloids*, *23*(3), 593-599. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.04.001>
47. Chicón, R., López-Fandiño, R., Alonso, E., & Belloque, J. (2008). Proteolytic pattern, antigenicity, and serum Immunoglobulin E binding of β -Lactoglobulin hydrolysates obtained by pepsin and high-pressure treatments. *Journal of Dairy Science*, *91*(3), 928-938. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0657>

48. Cho, D.-Y., Jo, K., Cho, S. Y., Kim, J. M., Lim, K., Suh, H. J., & Oh, S. (2014). Antioxidant effect and functional properties of hydrolysates derived from egg-white protein. *Food Science of Animal Resources*, 34(3), 362-371. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.3.362>
49. Chobert, J.-M., Bertrand-Harb, J. C., & Nicolas, M.-G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 883-892.
50. Chrysina, E. D., Brew, K., & Acharya, K. R. (2000). Crystal structures of apo-and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 37021-37029.
51. Contreras, M. del M., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Martín-Álvarez, P. J., & Recio, I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin : Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.017>
52. Corrochano, A. R., Buckin, V., Kelly, P. M., & Giblin, L. (2018). Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4747-4761. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13618>
53. Coscueta, E. R., Amorim, M. M., Voss, G. B., Nerli, B. B., Picó, G. A., & Pintado, M. E. (2016). Bioactive properties of peptides obtained from Argentinian defatted soy flour protein by Corolase PP hydrolysis. *Food Chemistry*, 198, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.068>
54. Crévieu-Gabriel, I., Gomez, J., Caffin, J.-P., & Carré, B. (1999). Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis. *Reproduction Nutrition Development*, 39(4), 443-454.
55. Croguennec, T., O’Kennedy, B., & Mehra, R. (2004). Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: Kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14(5), 399-409.
56. Crowther, J. M., Jameson, G. B., Hodgkinson, A. J., & Dobson, R. C. J. (2016). Structure, Oligomerisation and Interactions of β -Lactoglobulin. *Milk Proteins—From Structure to Biological Properties and Health Aspects*. <https://doi.org/10.5772/62992>
57. Dahdah, L., Roelofs, M., Knipping, K., de Vries, E., Rijniere, A., Garssen, J., Brand, P. L. P., & Fiocchi, A. (2022). Hypoallergenicity assessment of an extensively hydrolyzed whey-protein formula in cow’s milk allergic infants. *Pediatric Allergy and Immunology*, 33(6), e13814. <https://doi.org/10.1111/pai.13814>

58. Dannenberg, F., & Kessler, H.-G. (1988). Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, 53(1), 258-263.
59. de Castro, R. J. S., Bagagli, M. P., & Sato, H. H. (2015). Improving the functional properties of milk proteins : Focus on the specificities of proteolytic enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 1, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.004>
60. de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 80-88.
61. Demers-Mathieu, V., Gauthier, S. F., Britten, M., Fliss, I., Robitaille, G., & Jean, J. (2013). Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *International Dairy Journal*, 28(2), 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.09.003>
62. Devaraj, K. B., Kumar, P. R., & Prakash, V. (2011). Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry*, 46(2), 458-464. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.016>
63. de wit, J. N. (1989). *The use of whey protein products: A review*. Ede, Neth: NIZO. <http://ariane.ulaval.ca/cgi-bin/recherche.cgi?qu=01-0037459>
64. deWit, J. N., & Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67(11), 2701-2710.
65. Di Pierro, G., O'Keeffe, M. B., Poyarkov, A., Lomolino, G., & FitzGerald, R. J. (2014). Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteinase. *Food chemistry*, 156, 305-311.
66. Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2009). Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1387-1397. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1791>
67. Díaz, O., Pereira, C. D., & Cobos, A. (2004). Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 601-610. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.003>
68. Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Čurda, L., & Korhonen, H. J. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food Research and Technology*, 230(6), 865-874.

69. DUAN, C. C., YANG, L. J., LI, A. L., Zhao, R., & HUO, G. C. (2014). *Effects of enzymatic hydrolysis on the allergenicity of whey protein concentrates*.
70. Dullius, A., Goettert, M. I., & de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>
71. Dunn, B. M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical reviews*, 102(12), 4431-4458.
72. Edwards, P. J. B., Jameson, G. B., Palmano, K. P., & Creamer, L. K. (2002). Heat-resistant structural features of bovine β -lactoglobulin A revealed by NMR H/D exchange observations. *International Dairy Journal*, 12(4), 331-344. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00029-8)
73. El Mecherfi, K., Curet, S., Lupi, R., Larre, C., Rouaud, O., Choiset, Y., Rabesona, H., & Haertlé, T. (2018). Combined microwave processing and enzymatic proteolysis of bovine whey proteins: The impact on bovine β -lactoglobulin allergenicity. *Journal of Food Science and Technology*, 56(1), 177-186. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3471-9>
74. El-Salam, M. H. A., El-Shibiny, S., & Salem, A. (2009). Factors Affecting the Functional Properties of Whey Protein Products: A Review. *Food Reviews International*, 25(3), 251-270. <https://doi.org/10.1080/87559120902956224>
75. Embiriekah, S., Zarić, D., Bulatovic, M., Borić, M., & Rakin, M. (2018). Antioxidant activity, functional properties and bioaccessibility of whey protein hydrolysates. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 243-252. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12428>
76. Esmailpour, M., Ehsani, M. R., Aminlari, M., Shekarforoush, S., & Hoseini, E. (2017). Antimicrobial peptides derived from goat's milk whey proteins obtained by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), 65-72.
77. Estévez, N., Fuciños, P., Fuciños, C., Jauregi, P., Tovar, C. A., & Rúa, M. L. (2020). Hydrolysis of whey protein as a useful approach to obtain bioactive peptides and a β -Lg fraction with different biotechnological applications. *Food Hydrocolloids*, 109, 106095. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106095>
78. Etzel, M. R. (2004). Manufacture and Use of Dairy Protein Fractions. *The Journal of Nutrition*, 134(4), 996S-1002S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.996S>

79. Eugenia Lucena, M., Alvarez, S., Menéndez, C., Riera, F. A., & Alvarez, R. (2006). Beta-lactoglobulin removal from whey protein concentrates. *Separation and Purification Technology*, 52(2), 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.05.006>
80. Ezekiel Amri, F. M. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: a review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(2), 99-104.
81. Faccia, M., Picariello, G., Trani, A., Loizzo, P., Gambacorta, G., Lamacchia, C., & Di Luccia, A. (2012). Proteolysis of Cacioricotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology*, 234(3), 527-533.
82. Fadýlođlu, S. (2001). Immobilization and characterization of ficin. *Food/Nahrung*, 45(2), 143-146.
83. FAO (2021). FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/QCL>. Consulter le janvier 2022
- Feng, L., Qiao, Y., Zou, Y., Huang, M., Kang, Z., & Zhou, G. (2014). Effect of Flavourzyme on proteolysis, antioxidant capacity and sensory attributes of Chinese sausage. *Meat Science*, 98(1), 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.04.001>
84. Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Mota, M. V., Tavares, P., Pereira, A., Gonçalves, M. P., Torres, D., Rocha, C., & Teixeira, J. A. (2007). Preparation of ingredients containing an ACE-inhibitory peptide by tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 17(5), 481-487. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.023>
85. Fischer, C., & Kleinschmidt, T. (2015). Synthesis of galactooligosaccharides using sweet and acid whey as a substrate. *International Dairy Journal*, 48, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.003>
86. Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., & McGuffey, M. K. (2002). Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13(5), 151-159.
87. Forkwa, G. E. (2017). *Boissons fermentées de type yogourt à boire enrichies en protéines du lactosérum et en probiotiques*. Thèse de doctorat, Laval, Québec, Canada.
88. Fox, P. F. (1989). The milk protein system. *Developments in dairy chemistry. 4. Functional milk proteins.*, 1-53.
89. Frey, P. A., Whitt, S. A., & Tobin, J. B. (1994). A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science*, 264(5167), 1927-1930.

90. Galazka, V., Ledward, D., Dickinson, e., & Langley, K. (2006). High pressure effects on emulsifying behavior of whey protein concentrate. *Journal of Food Science*, 60, 1341-1343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04587.x>
91. Ganju, S., & Gogate, P. R. (2017). A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. *Journal of Food Engineering*, 215, 84-96. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.021>
92. Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (2003). Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 86, E78-E87. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74041-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74041-7)
93. Ghanimah, M. A. (2018). Functional and technological aspects of whey powder and whey protein products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(2), 454-459. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12436>
94. Glick, D. M., Shalitin, Y., & Hilt, C. R. (1989). Studies on the irreversible step of pepsinogen activation. *Biochemistry*, 28(6), 2626-2630. <https://doi.org/10.1021/bi00432a040>
95. Golkar, A., Milani, J., & Vasiljevic, T. (2018). Altering allergenicity of cow's milk by food processing for applications in infant formula. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(1), 159-172. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1363156>
96. Granato, D., & de Araújo Calado, V. M. (2014). The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. *Mathematical and statistical methods in food science and technology*, 1(1), 1-18.
97. Green, M. L., & Llewellyn, J. M. (1973). The purification and properties of a single chicken pepsinogen fraction and the pepsin derived from it. *Biochemical Journal*, 133(1), 105-115.
98. Green, M. L., Valler, M. J., & Kay, J. (1984). Assessment of the suitability for Cheddar cheesemaking of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of Dairy Research*, 51(2), 331-340. <https://doi.org/10.1017/S0022029900023608>
99. Grzonka, Z., Kasprzykowski, F., & Wicz, W. (2007). Cysteine proteases. In *Industrial enzymes* (p. 181-195). Springer.
100. Guadix, A., Camacho, F., & Guadix, E. M. (2006). Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 398-405. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.022>

101. Guérard, F. (1985). Une utilisation des enzymes proteolytiques extraites des visceres de poissons: La coagulation du lait. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes*, 49(3-4), 199-203.
102. Guillamón, E., Burbano, C., Cuadrado, C., Muzquiz, M., Pedrosa, M. M., Sánchez, M., Cabanillas, B., Crespo, J. F., Rodriguez, J., & Haddad, J. (2008). Effect of an instantaneous controlled pressure drop on in vitro allergenicity to lupins (*Lupinus albus* var Multolupa). *International archives of allergy and immunology*, 145(1), 9-14.
103. Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A., & Kindstedt, P. S. (1995). Susceptibility of β -Lactoglobulin and Sodium Caseinate to Proteolysis by Pepsin and Trypsin. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2336-2344. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76860-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76860-6)
104. Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 254-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>
105. Guyomarc'h, F., Famelart, M.-H., Henry, G., Gulzar, M., Léonil, J., Hamon, P., Bouhallab, S., & Croguennec, T. (2015). Current ways to modify the structure of whey proteins for specific functionalities-a review. *Dairy Science & Technology*, 95(6), 795-814. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0190-5>
106. Guzey, D., & Weiss, J. (2001). High-intensity ultrasonic processing improves emulsifying properties of proteins. *Colloidal and Interfacial Food Science Laboratory, Department of Food Science and Technology, The University of Tennessee*, 2605, 37996-1071.
107. Hambling, S. G., McAlpine, A. S., & Sawyer, L. (1992). β -Lactoglobulin. *Advanced dairy chemistry*, 1, 141-190.
108. Hamoud-Agha, M. M., & Allaf, K. (2019). Instant controlled pressure drop (DIC) Technology in food preservation: fundamental and industrial applications. *Food Preservation and Waste Exploitation*, 1(3), 17 <https://doi.org/10.5772/intechopen.83439>
109. Herceg, Z., Režek, A., Lelas, V., Krešić, G., & Franetović, M. (2007). Effect of carbohydrates on the emulsifying, foaming and freezing properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 279-286. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.055>
110. Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin.

- Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593. <https://doi.org/10.1021/jf048626m>
111. Hu, R., Chen, G., & Li, Y. (2020). Production and characterization of antioxidative hydrolysates and peptides from corn gluten meal using papain, ficin, and bromelain. *Molecules*, 25(18), 4091. <https://doi.org/10.3390/molecules25184091>
112. Huffman, L. M., & Harper, W. J. (1999). Maximizing the value of milk through separation technologies. *Journal of Dairy Science*, 82(10), 2238-2244.
113. Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., & Miyata, T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1), 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.12.002>
114. Isah, S., Oshodi, A. A., & Atasie, V. N. (2017). Physicochemical properties of cross linked acha (*digitaria exilis*) starch with citric acid. *Chemistry International*, 3, 150-157.
115. Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., & Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.10.004>
116. Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., & Krešić, G. (2010). Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.001>
117. Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L., & Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 121, 15-23.
118. Jansens, K. J., Lagrain, B., Rombouts, I., Brijs, K., Smet, M., & Delcour, J. A. (2011). Effect of temperature, time and wheat gluten moisture content on wheat gluten network formation during thermomolding. *Journal of Cereal Science*, 54(3), 434-441.
119. Jeewanthi, R. K. C., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2015). Improved functional characteristics of whey protein hydrolysates in food industry. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(3), 350-359. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.3.350>
120. Ji, D., Udenigwe, C. C., & Agyei, D. (2019). Antioxidant peptides encrypted in flaxseed proteome: An in silico assessment. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 306-314. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.08.002>

121. Jost, R., Maire, J.-C., Maynard, F., & Secretin, M.-C. (1999). Aspects of whey protein usage in infant nutrition, a brief review. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(5-6), 533-542.
122. Jovanović, S., Barać, M., & Maćej, O. (2005). Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljekarstvo*, 55(3), 215-233.
123. Kageyama, T., & Takahashi, K. (1976). Pepsinogens and pepsins from gastric mucosa of japanese monkey Purification and characterization. *The Journal of Biochemistry*, 79(3), 455-468.
124. Kananen, A., Savolainen, J., Mäkinen, J., Perttilä, U., Myllykoski, L., & Pihlanto-Leppälä, A. (2000). Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. *International Dairy Journal*, 10(10), 691-697. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00094-7)
125. Karami, Z., & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 535-547. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
126. Kelly, G. M., O'Mahony, J. A., Kelly, A. L., & O'Callaghan, D. J. (2016). Effect of hydrolyzed whey protein on surface morphology, water sorption, and glass transition temperature of a model infant formula. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 6961-6972. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10447>
127. Kęska, P., Wójciak, K. M., & Stadnik, J. (2019). Bioactive peptides from beef products fermented by acid whey – *in vitro* and *in silico* study. *Scientia Agricola*, 76, 311-320. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2018-0114>
128. Khatkar, A. B., Kaur, A., Khatkar, S. K., & Mehta, N. (2018). Characterization of heat-stable whey protein: Impact of ultrasound on rheological, thermal, structural and morphological properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 49, 333-342. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.08.026>
129. Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2018). 4-Whey proteins. *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (p. 93-126). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00005-X>
130. Kim, S. B., Ki, K. S., Khan, M. A., Lee, W. S., Lee, H. J., Ahn, B. S., & Kim, H. S. (2007). Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4043-4050. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0169>

131. Kleekayai, T., Le Gouic, A. V., Deracinois, B., Cudennec, B., & FitzGerald, R. J. (2020). In vitro characterisation of the antioxidative properties of whey protein hydrolysates generated under pH- and non pH-controlled conditions. *Foods*, 9(5), 582.
132. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, 102(4), 1317-1327.
133. Krešić, G., Lelas, V., Jambrak, A. R., Herceg, Z., & Brnčić, S. R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 87(1), 64-73.
134. Kumar, R., Chauhan, S. K., Shinde, G., Subramanian, V., & Nadasabapathi, S. (2018). Whey Proteins: A potential ingredient for food industry-A review. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 37(4), 283-290.
135. Kurz, F., Hengst, C., & Kulozik, U. (2020). RP-HPLC method for simultaneous quantification of free and total thiol groups in native and heat aggregated whey proteins. *MethodsX*, 7, 101112. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101112>
136. Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975-984. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.038>
137. Lamsal, B. P., Jung, S., & Johnson, L. A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.021>
138. Le Maux, S., Nongonierma, A. B., Barre, C., & FitzGerald, R. J. (2016). Enzymatic generation of whey protein hydrolysates under pH-controlled and non pH-controlled conditions: Impact on physicochemical and bioactive properties. *Food Chemistry*, 199, 246-251.
139. Le Maux, S., Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Peptide composition and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of β -lactoglobulin hydrolysates having similar extents of hydrolysis while generated using different enzyme-to-substrate ratios. *Food Research International*, 99, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.012>
140. Lee, W., Clark, S., & Swanson, B. G. (2006). Functional properties of high hydrostatic pressure-treated whey protein. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30(4), 488-501. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2005.00081.x>

141. Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155-1163. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>
142. Liburdi, K., Emiliani Spinelli, S., Benucci, I., Lombardelli, C., & Esti, M. (2018). A preliminary study of continuous milk coagulation using *Cynara cardunculus* flower extract and calf rennet immobilized on magnetic particles. *Food Chemistry*, 239, 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.093>
143. Lievore, P., Simões, D. R. S., Silva, K. M., Drunkler, N. L., Barana, A. C., Nogueira, A., & Demiate, I. M. (2015). Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2083-2092. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1244-z>
144. Lin, S., Tian, W., Li, H., Cao, J., & Jiang, W. (2012). Improving antioxidant activities of whey protein hydrolysates obtained by thermal preheat treatment of pepsin, trypsin, alcalase and flavourzyme: Improve antioxidant activities of whey protein. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2045-2051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03068.x>
145. Lindsay, M. J., Walker, T. W., Dumesic, J. A., Rankin, S. A., & Huber, G. W. (2018). Production of monosaccharides and whey protein from acid whey waste streams in the dairy industry. *Green Chemistry*, 18(7), 1839-1854. <https://doi.org/10.1039/C5GC03061G>
146. Lozano-Ojalvo, D., Pérez-Rodríguez, L., Pablos-Tanarro, A., López-Fandiño, R., & Molina, E. (2017). Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoallergenic hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.032>
147. Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197-1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>
148. Mahroug, H., Benatallah, L., Takács, K., Bouab, H., Zidoune, M. N., & Allaf, K. (2020). Impact of Instant Controlled Pressure Drop (DIC) Treatment on Chemical, Functional and Immunological Properties of Wheat Gluten. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 45(2), 575-586. <https://doi.org/10.1007/s13369-019-04261-3>

149. Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., & Sarkar, P. (2019). Bioactive peptides from whey proteins. In *Whey Proteins* (p. 519-547). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00015-1>
150. Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., & Athira, S. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3235-3241. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3>
151. Matsumiya, K., Suzuki, Y. A., Hirata, Y., Nambu, Y., & Matsumura, Y. (2017). Protein–surfactant interactions between bovine lactoferrin and sophorolipids under neutral and acidic conditions. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1), 126-132. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0057>
152. Mazen Hamoud-Agha, M., & Allaf, K. (2019). Instant controlled pressure drop (DIC) technology in food preservation: Fundamental and industrial applications. *Food preservation and waste exploitation*, 1(3),17. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83439>
153. Mazorra-Manzano, M. A., Mora-Cortes, W. G., Leandro-Roldan, M. M., González-Velázquez, D. A., Torres-Llenez, M. J., Ramírez-Suarez, J. C., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2020). Production of whey protein hydrolysates with angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity using three new sources of plant proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101724. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101724>
154. Melnikova, E. I., Bogdanova, E. V., & Koshevarova, I. B. (2022). Nutritional evaluation of whey protein hydrolysate: Chemical composition, peptide profile, and osmolarity. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.110721>
155. Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682-5693. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665>
156. Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91(4), 965-980.

157. Mirmoghtadaie, L., Shojaee Aliabadi, S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food Chemistry*, 199, 619-627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.067>
158. Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates : Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 431-476.
159. Moscovici, A. M., Joubran, Y., Briard-Bion, V., Mackie, A., Dupont, D., & Lesmes, U. (2014). The impact of the Maillard reaction on the in vitro proteolytic breakdown of bovine lactoferrin in adults and infants. *Food and Function*, 5(8), 1898-1908. <https://doi.org/10.1039/c4fo00248b>
160. Mounir, S., & Allaf, K. (2017). Response surface methodology (RSM) as relevant way to study and optimize texturing by instant controlled pressure drop DIC in innovative manufacturing of egg white and yolk powders. *Drying Technology*, 36(8), 990-1005. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1367929>
161. Mounir, S., Schuck, P., & Allaf, K. (2010). Structure and attribute modifications of spray-dried skim milk powder treated by DIC (instant controlled pressure drop) technology. *Dairy Science and Technology*, 90(2-3), 301-320. <https://doi.org/10.1051/dst/2010008>
162. Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39(9), 945-963. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.07.002>
163. Mulcahy, E. M. (2017). *Preparation, characterisation and functional applications of whey protein-carbohydrate conjugates as food ingredients* [PhD Thesis]. The National University of Ireland, Cork.
164. Muller, A., Chaufer, B., Merin, U., & Daufin, G. (2003). Prepurification of alpha-lactalbumin with ultrafiltration ceramic membranes from acid casein whey : Study of operating conditions. *Le Lait*, 83(2), 111-129.
165. Nguyen, N. H. A., Streicher, C., & Anema, S. G. (2018). The effect of thiol reagents on the denaturation of the whey protein in milk and whey protein concentrate solutions. *International Dairy Journal*, 85, 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.012>
166. Nishanthi, M., Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2018). Impact of storage conditions on solubility, heat stability and emulsifying properties of selected spray dried whey protein concentrates. *LWT*, 92, 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.068>

167. Norwood, E.-A., Croguennec, T., Le Floch-Fouéré, C., Schuck, P., & Jeantet, R. (2019). Changes in whey protein powders during storage. In *Whey Proteins* (p. 123-154). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00004-7>
168. Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, M. M., & Dadie, A. (2009). Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Journal of Food Technology*, 7(1), 20-29.
169. Nunes, L., & Tavares, G. M. (2019). Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 90, 88-99. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.004>
170. O’Keeffe, M. B., Conesa, C., & FitzGerald, R. J. (2017). Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 1751-1759. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13448>
171. O’Loughlin, I. B., Murray, B. A., Kelly, P. M., Fitzgerald, R. J., & Brodkorb, A. (2012). Enzymatic hydrolysis of heat-induced aggregates of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4895-4904.
172. Osório, H., Silva, C., Ferreira, M., Gullo, I., Máximo, V., Barros, R., Mendonça, F., Oliveira, C., & Carneiro, F. (2021). Proteomics Analysis of Gastric Cancer Patients with Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*, 10(3), 407.
173. Páez, de L. L., Pinzón, G., & Otaiza, V. E. (1995). [Purification and assay of chicken pepsin. *Acta Científica Venezolana*, 46(4), 237-241.
174. Parc, A. L., Dallas, D. D., Duaut, S., Léonil, J., Martin, P., & Barile, D. (2014). Characterization of goat milk lactoferrin N-glycans and comparison with the N-glycomes of human and bovine milk. *Electrophoresis*, 35, 1560-1570. <https://doi.org/10.1002/elps.201300619>
175. Pavan, R., Jain, S., & Kumar, A. (2012). Properties and therapeutic application of bromelain: A review. *Biotechnology Research international*, 2012.
176. Payne, C. T. (2009). Enzymes. In R. Tarté (Éd.), *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications* (p. 173-198). Springer Science and Business Media. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71327-4_8

177. Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716-723.
178. Pearce, R. J. (1983). Thermal separation of [beta]-Lactoglobulin and [alpha]-Lactalbumin in bovine cheddar cheese whey. *Australian Journal of Dairy Technology*, 38(4), 144.
179. Pein, D., Clawin-Rädecker, I., & Lorenzen, P. C. (2018). Peptic treatment of beta-lactoglobulin improves foaming properties substantially. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), e13543. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13543>
180. Pelegrine, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 77-80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>
181. Pelegrine, D. H. G., & Gomes, M. T. M. S. (2012). Analysis of Whey Proteins Solubility at High Temperatures. *International Journal of Food Engineering*, 8(3). <https://doi.org/10.1515/1556-3758.1265>
182. Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1526(2), 131-140.
183. Peñas, E., Préstamo, G., Luisa Baeza, M., Martínez-Molero, M. I., & Gomez, R. (2006). Effects of combined high pressure and enzymatic treatments on the hydrolysis and immunoreactivity of dairy whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(8), 831-839. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.08.009>
184. Peng, X., Xiong, Y. L., & Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, 113(1), 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.068>
185. Pérez-Gago, M. & Krochta, J.M. (2002). Formation and properties of whey proteins films and coatings. *Protein-Based Films and Coatings*, 159-180.
186. Phillips, L., Schulman, W., & Kinsella, J. E. (2006). pH and heat treatment effects on foaming of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 55, 1116-1119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb01612.x>
187. Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., & Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67(1), 53-64. <https://doi.org/10.1017/S0022029999003982>

188. Pihlanto-Leppälä, A., Marnila, P., Hubert, L., Rokka, T., Korhonen, H. J. T., & Karp, M. (1999). The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. *Journal of Applied Microbiology*, 87(4), 540-545.
189. Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., & Pereira, C. D. (2021). Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey. *Foods*, 10(5), 1067.
190. Popescu, V., Molea, A., Moldovan, M., Lopes, P. M., Mazilu Moldovan, A., & Popescu, G. L. (2021). The Influence of enzymatic hydrolysis of whey proteins on the properties of gelatin-whey composite hydrogels. *Materials*, 14(13), 3507. <https://doi.org/10.3390/ma14133507>
191. Power, O., Jakeman, P., & FitzGerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino acids*, 44(3), 797-820.
192. Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., & Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β -lactoglobulin: Effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1248(1), 43-49. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)00225-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00225-6)
193. Qian, F., Zhao, L., Jiang, S. J., & Mu, G. Q. (2013). Research on enzymatic hydrolysis of whey protein. *Applied Mechanics and Materials*, 411-414, 3205-3209. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.411-414.3205>
194. Quant, A. J. B., Albis, A. R., & Perez, J. A. (2019). Effect of heat treatment on physical properties of whey protein beverages (WPB). *Scientific Study and Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 20(2), 209-218.
195. Quintieri, L., Monaci, L., Baruzzi, F., Giuffrida, M. G., de Candia, S., & Caputo, L. (2017). Reduction of whey protein concentrate antigenicity by using a combined enzymatic digestion and ultrafiltration approach. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1910-1916. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2625-5>
196. Rattray, F. P., Walfridsson, M., & Nilsson, D. (2000). Purification and characterization of a diacetyl reductase from *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *International dairy journal*, 10(11), 781-789.
197. Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 110. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2019.00110>

- 198.Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- 199.Reddy, I. M., Kella, N. K., & Kinsella, J. E. (1988). Structural and conformational basis of the resistance of Beta.-lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(4), 737-741.
- 200.Reece, P. (1988). Recovery of proteases from fish waste. *Process biochemistry*.
- 201.Rick, W. (1974). Chymotrypsin. In *Methods of enzymatic analysis* (p. 1006-1012). Elsevier.
- 202.Rincón-Catalán, N. I., Pérez-Fabiel, S., Mejía-González, G., Herrera-López, D., Castro-Chan, R., Cruz-Salomón, A., & Sebastian, P. J. (2022). Power generation from cheese whey treatment by anaerobic digestion and microbial fuel cell. *Waste and Biomass Valorization*, 1-11.
- 203.Rosa, L. O. L. da, Santana, M. C., Avezedo, T. L., Brígida, A. I. S., Godoy, R., Pacheco, S., Mellinger-Silva, C., & Cabral, L. M. C. (2018). A comparison of dual-functional whey hydrolysates by the use of commercial proteases. *Food Science and Technology*, 38, 31-36. <https://doi.org/10.1590/fst.08417>
- 204.Rullier, B., Axelos, M. A. V., Langevin, D., & Novales, B. (2010). β -Lactoglobulin aggregates in foam films: Effect of the concentration and size of the protein aggregates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 343(1), 330-337. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.11.015>
- 205.Rutherford, S. M. (2010). Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review. *Journal of AOAC International*, 93(5), 1515-1522.
- 206.Ryan, M. P., & Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(3), 479-498. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>
- 207.Sakurai, K., Oobatake, M., & Goto, Y. (2001). Salt-dependent monomer–dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3. *Protein Science*, 10(11), 2325-2335. <https://doi.org/10.1110/ps.17001>
- 208.Salami, M., Moosavi-Movahedi, A., Ehsani, M., Yousefi, R., Haertlé, T., Chobert, J., Razavi, S., Heinrich, R., Balalaie, S., Ebadi, A., Pourtak, S., & Niasari-Naslaji, A. (2010). Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and

- bovine whey proteins by limited proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3297-3302. <https://doi.org/10.1021/jf9033283>
- 209.Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379.
- 210.Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., & Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 73, 129-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.001>
- 211.Severin, S., & Xia, W. S. (2006). Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins by Two Different Proteases and Their Effect on the Functional Properties of Resulting Protein Hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 30(1), 77-97. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00048.x>
- 212.Sgarbieri, V. C., Gupte, S. M., Kramer, D. E., & Whitaker, J. R. (1964). Ficus enzymes I. Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices. *Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2170-2177.
- 213.Sharma, R. (2019). Chapter 17—Whey Proteins in Functional Foods. *Whey Proteins* (p. 637-663). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812124-5.00018-7>
- 214.Shen, X., Shao, S., & Guo, M. (2016). Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 381-388. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13292>
- 215.Shin, H. S., Kim, S. B., Kang, S. C., Khan, M. A., Kim, H. S., Shin, H. J., & Chang, C. H. (2007). Production of low antigenic cheese whey protein hydrolysates using mixed proteolytic enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(11), 2055-2060.
- 216.Sidikou, I. D., Remy, B., Hornick, J. L., Losson, B., Duquesnoy, N., Yenikoye, A., & Beckers, J. F. (2005). Le pepsinogène et la prochymosine des bovins : Connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastrointestinales. *Annales Médecine Vétérinaire*, 149, 213-228.
- 217.Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). Microbial proteases in commercial applications. *Journal Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(3), 365-374.

218. Singhanian, R., Patel, A., Saini, R., & Pandey, A. (2017). Industrial enzymes: β -glucosidases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 103-125). Elsevier.
219. Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, *18*(7), 695-704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>
220. Sui, Q., Roginski, H., Williams, R. P. W., Versteeg, C., & Wan, J. (2011). Effect of pulsed electric field and thermal treatment on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *International Dairy Journal*, *21*(4), 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.001>
221. Sutay Kocabaş, D., Lyne, J., & Ustunol, Z. (2022). Hydrolytic enzymes in the dairy industry: Applications, market and future perspectives. *Trends in Food Science and Technology*, *119*, 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.013>
222. Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E.-H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 2143-2196.
223. Tanabe, S., Arai, S., & Watanabe, M. (1996). Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *60*(8), 1269-1272.
224. Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *90*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
225. Tavares, T., del Mar Contreras, M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I., & Malcata, F. X. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, *32*(5), 1013-1019.
226. Tavares, T. G., Amorim, M., Gomes, D., Pintado, M. E., Pereira, C. D., & Malcata, F. X. (2012). Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. *Journal of Food Engineering*, *110*(4), 547-552. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.009>
227. Tolkach, A., & Kulozik, U. (2005). Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation

- techniques. *Journal of Food Engineering*, 67(1), 13-20.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.058>
228. Tsermoula, P., Khakimov, B., Nielsen, J. H., & Engelsen, S. B. (2021). WHEY - The waste-stream that became more valuable than the food product. *Trends in Food Science and Technology*, 118, 230-241. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.025>
229. van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B. A., & Voragen, A. G. J. (2002). Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *International Dairy Journal*, 12(10), 813-820. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00077-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00077-8)
230. Wal, J.-M. (2004). Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 93(5), S2-S11. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61726-7](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61726-7)
231. Wang, N., Maximiuk, L., Fenn, D., Nickerson, M. T., & Hou, A. (2020). Development of a method for determining oil absorption capacity in pulse flours and protein materials. *Cereal Chemistry*, 97(6), 1111-1117. <https://doi.org/10.1002/cche.10339>
232. Wróblewska, B., Karamać, M., Amarowicz, R., Szymkiewicz, A., Troszyńska, A., & Kubicka, E. (2004). Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(8), 839-850.
233. Wu, X., Lu, Y., Xu, H., Lin, D., He, Z., Wu, H., Liu, L., & Wang, Z. (2018). Reducing the allergenic capacity of β -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.158>
234. Xiang, B. Y., Ngadi, M. O., Ochoa-Martinez, L. A., & Simpson, M. V. (2011). Pulsed electric field-induced structural modification of whey protein isolate. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1341-1348.
235. Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6), 756-774. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
236. Zaak, H., Siar, E.-H., Kornecki, J. F., Fernandez-Lopez, L., Pedrero, S. G., Virgen-Ortíz, J. J., & Fernandez-Lafuente, R. (2017). Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads. *Process Biochemistry*, 56, 117-123.

- 237.Zare, H., Moosavi-Movahedi, A. A., Salami, M., Mirzaei, M., Saboury, A. A., & Sheibani, N. (2013a). Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. *Sabz*) latex. *Phytochemistry*, 87, 16-22.
- 238.Zhao, L., Budge, S. M., Ghaly, A. E., Brooks, M. S., & Dave, D. (2011). Extraction, purification and characterization of fish pepsin: A critical review. *Journal of Food Processing Technollogy*, 2(6), 1.
- 239.Zhou, P., Liu, X., & Labuza, T. P. (2008). Moisture-Induced Aggregation of Whey Proteins in a Protein/Buffer Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 2048-2054. <https://doi.org/10.1021/jf073151v>
- 240.Zotta, T., Solieri, L., Iacumin, L., Picozzi, C., & Gullo, M. (2020). Valorization of cheese whey using microbial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(7), 2749-2764. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10408-2>

ANNEXES

Annexe 1. Dosage des protéines par Kjeldahl

Procédure

-Digestion

Nous avons ajouté à 0,200g de poudre de chaque échantillon, le mélange de 1g de catalyseur et 4ml de H₂SO₄ (Concentré). La digestion à 416°C a été effectuée dans le microkjeldahl et terminée lorsque la couleur de l'échantillon est devenu bleu-vert clair (après environ 90 min). Après le refroidissement du ballon (15-20 min) nous avons ajouté 20 ml de H₂O avec précaution à l'échantillon digéré, mélanger et laisser refroidir.

-Distillation

Nous avons allumé l'unité de distillation et mis l'échantillon digéré ; après nous avons ajouté NaOH (10N) (la solution devrait être verte-bleue). Nous avons placé une erlenmeyer avec 25ml d'acide borique (4%) avec l'indicateur le bleu de bromophénolo. Le processus de distillation commencé jusqu'à volume de 150ml d'erlenmeyer. Enfin, nous retirons l'erlenmeyer et nettoyons l'unité de distillation.

-Titration

-Le titrage de l'échantillon avec 0,1N HCL. Une couleur violette indique le point final du degré. Chaque équivalent de HCL utilisé correspond à un équivalent de NH₃ ou à un équivalent de N dans l'échantillon original. Le poids de N en mg est donné par milliéquivalents d'acide X 14 (le poids équivalent de N).

-Calculs

$$\text{protéine (\%)} = \frac{1,4007(V_F - V_B) * N \text{ HCL}}{M} \times K$$

1,4007: un facteur unique qui prend en compte le poids moléculaire de l'azote, la conversion du résultat milli équivalent de V*N et la conversion en % ;

V_F : Volume de titrant pour chaque échantillon (mL) ;

V_B : Volume de titrant pour la blanc (mL) ;

M : Masse de l'échantillon (g) ;

K: coefficient de conversion (6,38 pour lait et leur dérivé, 6,25 pour viande et leur dérive et les végétaux)

Annexe 2. Dosage des protéines par BCA

La méthode BCA (acide bicinchoninique) est une réaction colorimétrique, qui consiste en la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques dans un milieu alcalin. Le BCA chélate les ions Cu^{2+} avec une très forte spécificité pour former un complexe soluble de couleur violette. Après incubation à 37 °c pendant 30 min, l'absorbance est lue à 562 nm. La concentration est déterminée à partir d'une courbe étalon à la BSA.

Réactifs

Réactif Micro BCA A (MA), 240mL

Réactif Micro BCA B (MB), 240mL

Réactif Micro BCA C (MC), 12mL

Ampoules standard de 1mL contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 2,0mg/mL dans une solution de sérum salin à 0,9% et d'azide de sodium à 0,05%.

Préparation de standards d'albumine diluée (BSA)

Utilisez le tableau 1 comme guide pour préparer un ensemble de standards de protéines. Diluer le contenu d'une ampoule de standard d'albumine (BSA) dans plusieurs tubes, en utilisant de préférence un diluant similaire au tampon de l'échantillon.

Tableau 1: Préparation des étalons d'albumine diluée (BSA)

Tube	Volume de Diluent (mL)	Volume et Source de BSA	Concentration final de BSA ($\mu\text{g/mL}$)
A	4,5 mL	0.5mL de Stock	200
B	8 mL	2 mL de dilution de tube A	40
C	4 mL	4 mL de dilution de tube B	20
D	4 mL	4 mL de dilution de tube C	10
E	4 mL	4 mL de dilution de tube D	5
F	4 mL	4 mL de dilution de tube E	2.5
G	4,8 mL	3,2 mL de dilution de tube F	1
H	4 mL	4 mL de dilution de tube G	0,5
I	8 mL	0 mL	0 = Blanc

Préparation du réactif de travail BCA (RT)

Préparer le RT en mélangeant 25 parts de réactif Micro BCA MA et 24 parts de réactif MB avec 1 part de réactif MC (25:24:1, réactif MA:MB:MC). Pour l'exemple ci-dessus, combiner 12,5mL de réactif MA et 12 mL de réactif MB avec 0.5 mL de réactif MC

Procédure en microplaque (plage de travail linéaire de (2-40 $\mu\text{g/mL}$))

1. Pipeter 150 μ L de chaque réplique d'échantillon standard ou inconnu dans un puits de microplaque.
2. Ajouter 150 μ L du RT dans chaque puits et mélanger soigneusement la plaque sur un agitateur de plaque pendant 30s.
3. Mettre la plaque à l'ombre pendant 30 min
4. Mesurer l'absorbance à ou près de 562nm sur un lecteur de plaque.
5. Soustraire la lecture moyenne de l'absorbance à 562nm des répliques de l'étalon vierge de la lecture à 562 nm de toutes les autres répliques individuelles de l'étalon et de l'échantillon inconnu.
6. Préparer une courbe standard en traçant la lecture moyenne de 562nm corrigée du blanc pour chaque standard de BSA en fonction de sa concentration en μ g/mL. Utiliser la courbe standard pour déterminer la concentration en protéines de chaque échantillon inconnu.

Annexe 3. Préparation des solutions de FPLC

Phase mobile

Tampon de phosphate (0,05M pH 7+0 ,15 M NaCl)

Pour 100 mL de 0,05 M de Tampon de phosphate ($pK_a=7,2$):

- pH =7
- La force ionique=0,26 M.
- On dissolvé 6g de NaH_2PO_4 ($M_r=120$) dans un 900 mL d'eau ultra pure
- Ajouter NaCl (8,766) + NaN_3 (Azide) (0,2 g/L);
- Titrer jusqu'à pH 7 à température de laboratoire 25 °C avec une base forte monovalente ou un acide selon les besoins;
- Ajuster le volume jusqu'à 1000 mL avec l'eau ultra-pure;
- Filtrer en utilisant une pompe à vide avec un filtre de 0,22 μm ;
- Placer dans l'ultrasons pour dégazage pendant 15 min ;
- Filtrer l'échantillon avec 0,45 μm avant injection.

Annexe 4. Dosage des protéines par Bradford

Le dosage des protéines du lactosérum est déterminé selon la méthode de Bradford (1976), est l'une des méthodes les plus pratique pour déterminer la concentration de protéines car elle est simple, rapide, peu coûteuse et sensible, dont le principe repose sur l'adsorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (avec les acides aminés basiques (Arg, Lys, His)). Une fois lié aux protéines sa couleur vire du rouge vers le bleu montrant une absorbance maximale à 595 nm. Le haut coefficient d'extinction permet d'avoir un dosage des protéines même à des concentrations inférieures à 20 µg/mL. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

Protocole expérimental

A 20 µL de l'échantillon dilué, en ajoutant 200 µL de réactif de Bradford, le mélange est homogénéisé immédiatement puis Incuber à l'obscurité et à la température ambiante pendant au moins 5 min. Les échantillons ne doivent pas être incubés plus de 1 heure. La densité optique des échantillons est mesurée au lecteur spectrophotomètre des microplaques à 595 nm. La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisé avec une solution mère contenant 1 mg/mL de BSA, une série de dilution est préparée. La concentration en protéines est exprimée en mg de protéines /mL.

Annexe5. Méthode ABTS

Tampon PBS 75 mM (pH 7,4)

- a) Dissoudre 9,00 g de NaH₂PO₄ (Poids moléculaire = 120) dans environ 900 mL d'eau ultra pure.
- b) Titrer à pH 7,44 à la température du laboratoire de 20 °C avec une base forte ou un acide si nécessaire.
- c) Compléter le volume à 1000 mL avec de l'eau ultra pure.

Solution mère d'ABTS

- a) Dissoudre 0,0384 g de sel de diammonium de 2,2'-bis(acide 3éthylbenzothiazoline 6-sulfonique) (ABTS, MW = 548,68) dans 10 mL d'eau ultra pure, 7 mM(S1).
- b) Dissoudre 0,0066 g de persulfate de potassium (K₂O₈S₂, PM= 270,32) dans 10 mL d'eau ultrapure, 2,44 mM(S2).
- c) Mélanger S1 et S2 dans un tube doublé d'une feuille d'aluminium et remuer pendant 16 h. Conserver à 4 °C pendant 1 mois maximum.

Solution de travail de'ABTS⁺

La solution mère d'ABTS est filtrée avec un filtre à une seringue de 0,45 µm et diluée avec de l'eau/méthanol/éthanol jusqu'à une absorbance de 0,700 (±0,02) à 734 nm pour un trajet optique de 1 cm. La solution de travail (ST) du radical est fraîchement préparée.

Solution de Trolox

- a) Peser 0,0125 g de Trolox et le dissoudre dans 1 mL de méthanol.
- b) Compléter avec du H₂O jusqu'à 50 mL (1000 µM, ST). Conserver à 20 °C.

Tableau 1 & R Q F H Q W U D W L R Q G H V V R O X W L R Q V G H O D F R X U E H

Tube	6 7)/	H ₂ 2 /	& R Q F H Q W U D W L R Q	0
1	25	975	25	
2	50	950	50	
3	75	925	75	
4	100	900	100	
5	125	875	125	
6	150	850	150	
7	175	825	175	

ST : Solution de trolox

Procédure

Le test de piégeage de l'ABTS est réalisé dans une microplaque à 96 puits. À 20 µL d'échantillon ou de Trolox ou de solvant, on ajoute 180 µL de solution de travail ABTS-. Le mélange est incubé pendant 5 min à 30 °C, et l'absorbance à 734 nm est mesurée avec un lecteur de plaque Multidetecion (Synergy H1, Vermont, USA).

Résultat du traitement

L'activité de piégeage est exprimée en % de réduction de l'absorbance par rapport au contrôle. La formule appliquée pour calculer le pourcentage de piégeage est la suivante :

$$\text{ABTS (\%)} = (A_{CTL} - A_{ECHL}) * \frac{100}{A_{CTL}}$$

A_{CTL} : Absorbance de contrôle

A_{ECHL} : Absorbance de l'échantillon.

Les équations de régression entre le piégeage net de l'ABTS et la concentration de Trolox sont calculées. Les valeurs sont exprimées en équivalents Trolox (ET) en utilisant la courbe standard calculée pour chaque essai. Les résultats finaux sont exprimés en µmol ET /µmol de composé pur pour les standards phénoliques et en µmol ET/mg ou mL d'échantillon pour les autres.

Annexe 6. Méthode ORAC

Tampon PBS 75 mM (pH 7,4)

- a) Dissoudre 9 g de NaH₂PO₄ (masse moléculaire = 120) dans environ 900 mL d'eau ultra-pure.
- b) Titrer à pH 7,44 à la température du laboratoire de 20 °C avec une base forte monovalente ou un acide si nécessaire.
- c) Compléter le volume à 1000 mL avec de l'eau ultra-pure.

Le tampon aura un pH de 7,40 à 37 °C.

Solution mère de fluorescéine (1166.1 µM)

Peser 0,01097 g de sel di-sodique de fluorescéine (masse moléculaire: 376,27) et le dissoudre dans 25 mL de PBS. Conserver à 4 °C pendant une période maximale de 1 mois.

Solution de travail à la fluorescéine (116,66 nM, FL)

Préparer quotidiennement.

- a) Diluer 100 µL de la solution mère dans 10 mL finaux avec du PBS.
- b) De la solution précédente, retirer 250 µL et compléter avec du PBS jusqu'à 25 mL (116,66 nM).

Solution de Trolox

- a) Peser 0,0125 g de Trolox et le dissoudre dans 1 mL de méthanol.
- b) Compléter avec du PBS jusqu'à 50 mL. Conserver à -20 °C.
- c) Prélever 1 mL de la solution ci-dessus, et compléter avec du PBS jusqu'à 10 mL (solution T0). Préparer quotidiennement.

Tableau 1 : Concentration des solutions de la courbe d'étalonnage.

	T0 volume (µL)	PBS volume (µL)	Concentration (µM)
T8	800	200	80
T7	700	300	70
T6	600	400	60
T5	500	500	50
T4	400	600	40
T3	300	700	30

Annexes

T2	200	800	20
T1	100	900	10

Solution d'AAPH

Peser 0,13018 g d'AAPH et le dissoudre dans 10 ml de PBS.

Procédure

ORAC-FL est réalisé dans une microplaque noire à 96 puits (Nunc, Danemark). La réaction est réalisée dans un tampon phosphate 75 mM (pH 7,4), et le mélange réactionnel final est de 200 μ L. Des solutions d'antioxydant (20 μ L) et de fluorescéine (120 μ L; 70 nM, concentration finale dans le puits) sont placées dans le puits de la microplaque. Un blanc (FL + AAPH) utilisant un tampon phosphate à la place de la solution d'antioxydant et huit solutions de calibration utilisant du Trolox (1-8 μ M, concentration finale dans le puits) comme antioxydant sont également réalisés dans chaque essai. Le mélange est pré-incubé pendant 10 min à 37 °C. La solution d'AAPH (60 μ L; 12 mM, concentration finale dans le puits) est ajoutée rapidement à l'aide d'une pipette multicanaux. La microplaque est immédiatement placée dans le lecteur et la fluorescence est enregistrée à intervalles de 1 min sur une période de 80 min.

Traitement des résultats

Les courbes d'antioxydants (fluorescence en fonction du temps) sont d'abord normalisées par rapport à la courbe du blanc correspondant au même dosage en multipliant les données originales par le facteur $\text{fluorescence}_{\text{blanc},t=0} / \text{fluorescence}_{\text{control},t=0}$. À partir des courbes normalisées, l'aire sous la courbe de décroissance de la fluorescence (ASC) est calculée selon la méthode trapézoïdale :

$$ANC = \sum_{i=1}^{i=n-1} \left(\frac{f_i + f_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i)$$

où f_i est la fluorescence à la lecture i et t_i est le temps (minutes) à la lecture i .

Les valeurs de l'ANC finale sont calculées en soustrayant l'ANC du blanc de tous les résultats. Les équations de régression entre l'ANC nette et la concentration en antioxydant sont calculées.

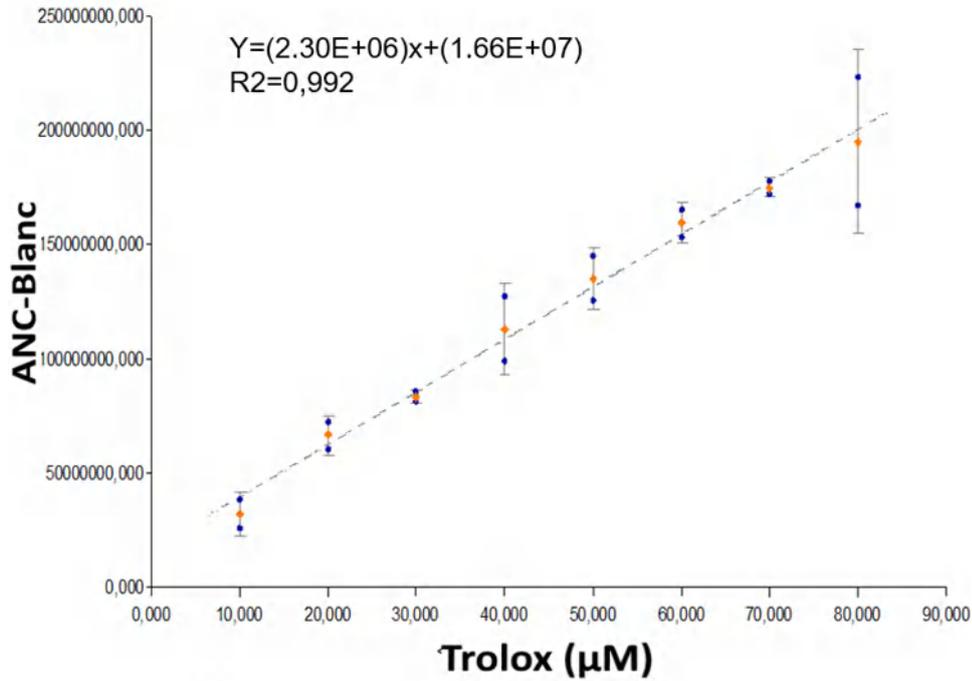


Figure 1: Courbe étalonnage de Trolox pour la méthode ORAC. ANC: Aire nette sous la courbe

Les valeurs ORAC-FL sont exprimées en équivalents Trolox en utilisant la courbe standard calculée pour chaque essai (figure 1). Le résultat est exprimé en µM d'équivalent Trolox. Le résultat final peut être exprimé en µmol d'équivalent Trolox/µmol de composé pur pour les standards phénoliques et en µmol d'équivalent Trolox/mg d'échantillon pour les autres.

**PRODUCTION
SCIENTIFIQUE**

Publications

1. **Kheroufi, A.**, Brassesco, M. E., Campos, D. A., Boughellout, H., & Pintado, M. E. (2022). Functional properties of peptides obtained from whey proteins by ficin extract hydrolysis. *Food Bioscience*, 101707. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101707>.
2. **Kheroufi, A.**, María E. Brassesco, Débora A. Campos, Abdelghani Mozai, Halima Boughellouta and Manuela E. Pintado. Whey protein-derived peptides: the impact of chicken pepsin hydrolysis upon whey proteins concentrate on their biological and technological properties. *International Dairy Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105442>

Communications

1. **KHEROUFI Afaf**, MOZAI A., ZIDOUNE M.N et BOUGHELLOUT H. (2019). Caractérisation de retentât de dialyse de lactosérum. 1^{ère} journée nationale sur « Cancer, Environnement et Alimentation », 4 Février, université M'Hamed Bougara, Boumerdès-Poster
2. **KHEROUFI Afaf**, MOZAI A., HACHEMI N.H., BOUGHELLOUT H. et ZIDOUNE M.N (2018), « Etude des propriétés techno-fonctionnelles des protéines de lactosérum en fonction de pH ». *Séminaire international des sciences alimentaires SISA, 15 et 16 octobre, institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (I.N.T.A.A), Université Frères Mentouri Constantine I*. Poster
3. H. Boughellout, **A. Kheroufi**, A. Mozai, F. Adoui, K. Allaf & M. N. Zidoune (2018). Impact of DIC treatment (instant controlled pressure drop) on the techno-functional milk proteins properties. 32nd EFFoST international Conference 6-8 November, Nantes, France. Poster
4. MOZAI A, **KHEROUFI Afaf**, ZIDOUNE M.N. et BOUGHELLOUT H. (2019). Caractérisation physicochimique de lactosérum NUMIDUA, Constantine. 1^{ère} journée nationale sur « Cancer, Environnement et Alimentation », 4 Février, université M'Hamed Bougara, Boumerdès. Poster
- 5- MOZAI A, **KHEROUFI Afaf**, LOUER Wahida, ZIDOUNE M.N et BOUGHELLOUT H. (2022). Effet de la pression de l'air sur la température de sortie et des propriétés physique du lactosérum séchée par pulvérisation. International congress of Energies and Engineering of industrial processes CEGPI22, Algiers, Algeria 23-25 May 2022. Orale

الملخص

مصل الحليب هو منتج ثانوي لصناعة الألبان غني بالمواد العضوية، وخاصة اللاكتوز والبروتينات ذات القيمة الغذائية والوظيفية العالية جداً. يعتبر مصّل الحليب هو الملوّث الأول في صناعة الألبان. تبحث مصانع معالجة الحليب عن طرق مبتكرة لتحويل هذه النفايات السائلة الملوثة إلى منتجات ذات قيمة مضافة عالية. هدفت دراستنا إلى تحسين القيمة المضافة لبروتين مصّل الحليب كمكون وظيفي إما عن طريق التحلل الإنزيمي أو عن طريق العلاج الفيزيائي.

في هذا السياق تم تخصيص الجزء الأول من هذا العمل لدراسة تأثير التحلل الإنزيمي بواسطة البروتياز من أصل نباتي (فيسين) وحيواني (بييسين الدجاج) على الخصائص البيولوجية والتكنولوجية لبروتينات مصّل الحليب.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن درجة التحلل الإنزيمي لبروتينات مصّل الحليب بواسطة الفيسين أعلى بكثير من تلك الموجودة في البييسين. أظهرت نتائج التحلل الإنزيمي بواسطة FPLC و SDS-PAGE أن الفيسين قدم قوة تحلل بروتينية مثيرة جداً عن طريق التحلل الكامل للبروتين الرئيسي ومسبب الحساسية الرئيسي للحليب، بيتالكتوغلوبولين، وهو بروتين مقاوم جداً لجميع أنواع البروتياز المعروفة.

أظهر تحديد الببتيدات للجزء الذي يقل وزنه الجزيئي عن 3 كيلو دالتون بواسطة LC MS / MS أن الفيسين يعمل بشكل أكثر تحديداً على روابط الببتيد L الفا لكتوالبمين أكثر من تلك الموجودة في بيتالكتوغلوبولين، وأن بييسين الدجاج يعمل بطريقة محددة بدقة على الطرف N للروابط الببتيدية L الفا لكتوالبمين أكثر من تلك الموجودة في بيتالكتوغلوبولين.

تم أيضاً تعديل الخصائص الوظيفية للببتيدات الناتجة عن التحلل الإنزيمي، وتم تحسين قابلية الذوبان على نطاق الأس الهيدروجيني بأكمله مقارنة ببروتينات مصّل الحليب مع تحسن ملحوظ للببتيدات الناتجة في الفيسين. أظهرت الببتيدات الناتجة عن التحلل الإنزيمي بواسطة انزيم بييسين الدجاج خصائص استحلاب و رغوة محسنة على نطاق الأس الهيدروجيني بأكمله، بينما لوحظ انخفاض في هذه الخصائص في تحلل الفيسين.

التحلل الإنزيمي لبروتين مصّل الحليب عزز بشكل ملحوظ الخصائص المضادة للأكسدة والخافضة للضغط. أظهرت الببتيدات التي تقل عن 3 كيلو دالتون أفضل الأنشطة. أشار التنبؤ بالحساسية إلى أن التحلل الإنزيمي قلل بشكل كبير من حساسية بروتينات مصّل الحليب.

تم تخصيص الجزء الثاني من هذا العمل لدراسة تأثير تقنية "التحرير اللحظي للضغط" (Détente Instantanée) من خلال تطبيقين (قاعدة جافة ورطبة) على البنية والخصائص التكنولوجية لبروتينات مصّل الحليب. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مساحيق بروتين مصّل الحليب المعالجة بـ DIC على أساس جاف ذات صفات جودة أعلى مقارنة بتلك التي تم الحصول عليها على أساس رطب. أظهرت البروتينات المعالجة ثباتاً أفضل للرغوة، وتحسناً من قدرة امتصاص الماء والزيت، وقللت من قابلية الذوبان، وقوة الرغوة والاستحلاب.

الكلمات المفتاحية: بروتين مصّل الحليب؛ التحلل الإنزيمي؛ DIC ، الخصائص البيولوجية ، الخصائص التقنية الوظيفية ، بنية.

Abstract

Whey is a by-product of the dairy industry rich in organic matter, especially lactose and proteins with very high nutritional and functional value. This whey is the main pollutant of the dairy industry. The milk processing industry is looking for innovative ways to convert this pollutant effluent into high value added products. Our study aimed to improve the added value of whey proteins as a functional ingredient either by enzymatic hydrolysis or by physical treatment.

The first part of this work is devoted to the study of enzymatic hydrolysis effect by proteases of plant (ficin) and animal (chicken pepsin) origin on the biological and technological properties of whey proteins.

The results obtained showed that the degree of hydrolysis (DH) of whey proteins by ficin is significantly higher than that of pepsin. The characterization of the hydrolysates by FPLC and SDS-PAGE showed that ficin exhibited a very interesting proteolytic power by completely hydrolyzing the major protein and main allergen of milk, β -Lg, a protein which is very resistant to all types of proteases already known.

Identification of the peptides in the fraction with a molecular weight less than 3 kDa by LC Ms/Ms showed that ficin acts more specifically on the peptide bonds of α -La than on those of β -Lg, and that chicken pepsin acts in a narrowly specific manner on the N-terminus of the peptide bonds of β -Lg and α -La.

The functional properties of the hydrolysates were also modified, solubility was improved over the whole pH range compared to whey proteins with a clear improvement for the ficin hydrolysates. The chicken pepsin hydrolysates showed an improvement in emulsifying and foaming properties over the whole pH range, while a decrease in these properties was noted for the ficin hydrolysates.

Enzymatic hydrolysis significantly improved the antioxidant and antihypertensive properties of whey proteins. Fractions below 3 kDa showed the best activities. Allergenicity prediction indicated that hydrolysis significantly reduced the allergenicity of β -Lg and α -La.

The second part of this work was devoted to the study of the effect of the Instant Controlled Release (DIC) treatment by two applications (dry and wet basis) on the proteins structure and technological properties. The results obtained showed that the whey protein powders textured by DIC under dry application had higher quality attributes than those obtained by wet DIC. The treated proteins exhibited better foam stability, water and oil absorption capacity and decreased solubility, foaming and emulsifying power.

Keywords: Whey proteins, Hydrolysis, DIC, Biological properties, Techno-functional properties; Structure.