Année : 2010

UNIVERSITE DE LILLE I
Ecole Doctorale : Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée par

Mathieu VANHOUTE

Etude de l'extraction sélective par des procédés innovants de peptides issus de la protéolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine

Préparée au Laboratoire des Procédés Biologiques : Génie Enzymatique et Microbien
IUT A – Département Génie Biologique

Soutenance prévue le 2 septembre 2010 devant le jury composé de :

M. BAZINET L.	Professeur (Université de Laval, Canada)	Examinateur
M. DHULSTER P.	Professeur (Université de Lille I)	Directeur de Thèse
M. FROIDEVAUX R.	Habilité à Diriger des Recherches (Université de Lille I)	Examinateur
M. GUILLOCHON D.	Professeur (Université de Lille I)	Directeur de Thèse
M. LECOUTURIER D.	Maître de Conférences (Université de Lille I)	Examinateur
M. MARC I.	Directeur de Recherche C.N.R.S. (Université de Nancy)	Président du jury
M. RENAULT J.-H.	Professeur (Université de Reims)	Rapporteur
M. SANNIER F.	Professeur (Université de La Rochelle)	Rapporteur

Année : 2010

UNIVERSITE DE LILLE I
Ecole Doctorale : Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée par

Mathieu VANHOUTE

Etude de l'extraction sélective par des procédés innovants de peptides issus de la protéolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine

Préparée au Laboratoire des Procédés Biologiques : Génie Enzymatique et Microbien
IUT A – Département Génie Biologique

Soutenance prévue le 2 septembre 2010 devant le jury composé de :

M. BAZINET L.	Professeur (Université de Laval, Canada)	Examinateur
M. DHULSTER P.	Professeur (Université de Lille I)	Directeur de Thèse
M. FROIDEVAUX R.	Habilité à Diriger des Recherches (Université de Lille I)	Examinateur
M. GUILLOCHON D.	Professeur (Université de Lille I)	Directeur de Thèse
M. LECOUTURIER D.	Maître de Conférences (Université de Lille I)	Examinateur
M. MARC I.	Directeur de Recherche C.N.R.S. (Université de Nancy)	Président du jury
M. RENAULT J.-H.	Professeur (Université de Reims)	Rapporteur
M. SANNIER F.	Professeur (Université de La Rochelle)	Rapporteur

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers Didier GUILLOCHON et Pascal DHULSTER, ce dernier prenant la relève du premier en tant que Directeur du laboratoire ProBioGEM, pour m'avoir accordé leur confiance en acceptant de codiriger cette thèse et de suivre avec intérêt ces travaux, pour leur gentillesse et leur bonne humeur,

Je remercie vivement les Professeurs Frédéric SANNIER et Jean-Hugues RENAULT pour avoir examiné mon mémoire, et pour les intéressantes remarques qui en ont découlées,

Je remercie sincèrement le Professeur Laurent BAZINET pour m'avoir encadré lors de mon travail au Québec, pour son accent plein de bonne humeur et pour avoir accepté de traverser l'Atlantique pour être examinateur,

Je remercie très chaleureusement les Docteurs Rénato FROIDEVAUX et Didier LECOUTURIER pour leur encadrement durant toutes ces années, leur compétence, leur grande disponibilité et leurs nombreux conseils,

Je remercie enfin le Directeur de Recherche C.N.R.S. Ivan MARC pour avoir présidé avec brio ce jury, avec compétence et humour,

Je souhaite également remercier les personnes qui ont collaborées à ces recherches, je pense tout particulièrement au Dr. Loubna FIRDAOUS pour son aide dans les travaux liés à l'EDUF tant dans les manipulations qu'à me faire découvrir la belle province. Aux Drs. Muriel BIGAND et Christel PIERLOT pour leur expertise dans les plans d'expériences et pour m'avoir suivi dans le monde de la mousse. Au Dr. François KRIER pour son introduction à la microbiologie. A Adeline PAGE pour m'avoir encadré en spectrométrie de masse,

Je remercie également tous les étudiants que j'ai encadrés en stage et ont profités de cette expérience, tout particulièrement Ismaël BAASSOU, Odile HULOUX et Pierre-Edouart BODET pour leur maîtrise de la colonne de mousse, Julie VROMANDT pour ses nombreuses analyses de tension de surfaces et Aurélien VANVLASSENBROECK et Bogdan ENACHE pour leur important travail,

Un grand merci à tous les membres du laboratoire ProBioGEM, et tout particulièrement au Dr. Rozenn RAVALLEC, au Pr. Dominique VERCAIGNE, au Dr. Frédéric DUMONT, à Laurent BONNEAU et à l'Ingénieur de Recherche Max BECHET pour leur bonne humeur, leur aide pratique et leurs précieux conseils, à notre secrétaire Cathy OUBLION pour son énorme travail et sa gentillesse, et à la fine équipe des docteurs en devenir (ou devenus) : Padawan, Lucette, Estelle, François, Omar, Arthur, Romain… ainsi qu'à nos voisins de bureaux qui supportent cette ambiance studieuse sponsorisée par les

Experts en danse du renne de noël. Aux collègues de l'INAF qui m'auront fait découvrir d'une fort belle manière le pays du caribou : Monica, Alain, Sandrine, Romain, Marie-Noëlle, Philippe, Christian, Maryline, Val, Jérémie, Marianne et ma loutre Cyril,

J'exprime ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont accompagnées à travers ces années de monitorat et d'ATER, en premier lieu pour l'Ingénieur d'Etude Bertrand FERTIN pour ses conseils en recherche, en enseignement et pour son inépuisable science, aux Drs. Anne FERTIN, Krasimir DIMITROV, François KRIER, Gabriel BILLON, Loubna FIRDAOUS et Rénato FROIDEVAUX, ainsi qu'au Pr. Pascal DHULSTER pour les centaines d'heures passées à la halle pilote à enseigner l'art du procédé,

Je remercie sincèrement le Dr. David MARSEAULT, le Pr. Jean-Marie AUBRY et encore une fois le Dr. Christel PIERLOT grâce à qui j'ai pu traduire ma motivation dans la recherche par la poursuite de mes études d'ingénieur à travers un Master puis un Doctorat,

Mes plus chaleureux remerciements vont finalement à mes amis qui m'ont soutenus durant ces longues années, dans les bons comme dans les mauvais moments, et à qui je permets de cocher la case « Docteur ». A ma chérie, qui a eu un aperçu de ce qui l'attend, qui m'a encouragé même à 10000 km de Lille, et que je soutiendrai aussi bien qu'elle l'a fait. Enfin merci à ma famille qui m'a toujours soutenu, quelque soit l'endroit.

Sommaire

ABREVIATIONS **8**

AVANT-PROPOS **9**

CHAPITRE I : INTRODUCTION **11**

1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 12
1.1. Rappels sur les peptides bioactifs issus de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine *12*
1.1.1. Rappels sur l'hémoglobine bovine 12
1.1.2. Les peptides à activités biologiques issus de l'hydrolyse enzymatique 13
1.2. Les procédés d'extraction sélective de peptides *26*
1.2.1. Les séparations membranaires 26
1.2.2. Les séparations membranaires couplées à l'électrodialyse 30
1.2.3. Les extractions sélectives en systèmes biphasiques 31
1.2.3.1. Les extractions sélectives en systèmes biphasiques eau-solvants organiques 31
1.2.3.2. L'extraction assistée par un agent formateur de paires d'ions en systèmes biphasiques eau-solvants organiques 32
1.2.3.3. L'extraction en systèmes biphasiques eau-solvants organiques supportés par une membrane 37
1.2.3.4. La séparation par moussage 39
2. OBJECTIFS DE TRAVAIL 42

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES **45**

1. PREPARATION DES HYDROLYSATS PEPTIDIQUES 46
1.1. Dosage de l'hémoglobine *46*
1.2. Dénaturation par l'urée *46*
1.3. Dosage de l'activité de la pepsine *47*
1.4. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine *47*
1.5. Détermination du degré d'hydrolyse *48*
1.6. Protocoles de décoloration des hydrolysats peptidiques *48*
1.6.1. Décoloration par précipitation au pH 48
1.6.2. Décoloration par membrane d'ultrafiltration 48
2. METHODES D'ANALYSE 48
2.1. Analyse des peptides par C.L.H.P. de phase inverse (P.I.) *48*
2.2. Couplage en spectrométrie de masse E.S.I. *49*
2.3. Mesures de tension interfaciale liquide-gaz *51*
2.4. Quantification des hémorphines et de l'hème *51*
2.5. Détermination des enrichissements et rendements d'extraction *51*

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION **53**

A. EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE DE PEPTIDES ASSISTEE PAR PAIRES D'IONS **54**

1. MATERIELS ET METHODES SPECIFIQUES 55
1.1. Extraction liquide/liquide d'hémorphines *55*
1.1.1. Sans agent formateur de paires d'ions 55
1.1.2. Assistée par la formation de paires d'ions 55
1.2. Extraction liquide-liquide assistée par paires d'ions associée à un contacteur à membrane *55*
1.2.1. Protocole de filtration de l'hydrolysat 55
1.2.2. Protocole d'extraction 56
1.2.3. Protocole de nettoyage 57
1.3. Coefficient de partage *57*
2. EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ASSISTEE PAR PAIRES D'IONS 58
2.1. Etudes préliminaires *58*

2.1.1. Choix du solvant d'extraction 58
2.1.2. Choix et comportement en milieu aqueux de l'agent surfactant 59
2.1.3. Extraction en l'absence d'alkyls sulfonates 63
2.1.4. Etude de l'association de l'agent surfactant avec les hydrolysats 66
2.2. Influence de la polarité du solvant d'extraction 69
2.3. Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'agent formateur de paires d'ions 72
2.4. Influence de la longueur de chaîne carbonée de l'agent formateur de paires d'ions et du pH de la phase aqueuse sur l'extraction des hémorphines 74
3. EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ASSISTEE PAR PAIRES D'IONS ASSOCIEE A UN CONTACTEUR A MEMBRANE 81
3.1. Choix des conditions opératoires 81
3.2. Expériences témoins 84
3.3. Extraction biphasique via un contacteur à membrane 87
CONCLUSION 90

B. EXTRACTION DE PEPTIDES PAR MOUSSAGE-DRAINAGE 91

1. MATERIELS ET METHODES SPECIFIQUES 92
1.1. Montage et protocole d'extraction par moussage-drainage 92
1.2. Tests antimicrobiens 92
1.3. Plans d'expériences 93
1.3.1. Matrice de criblage 93
1.3.2. Matrice composite 93
2. MISE EN ŒUVRE DU PROCEDE DE MOUSSAGE-DRAINAGE 95
2.1. Influence de la concentration sur la tension interfaciale gaz/liquide 96
2.2. Choix de la concentration de l'hydrolysat initial 99
2.3. Analyses en C.L.H.P.-P.I. 99
2.4. Choix du pH de l'hydrolysat initial 100
2.5. Fractionnement des hydrolysats par moussage-drainage 102
2.5.1. Formation de mousse et volume de drainage 102
2.5.2. Tests antimicrobiens 106
2.5.3. Détermination du pourcentage massique de la fraction peptidique collectée et de la sélectivité de séparation 107
3. ETUDE DES PARAMETRES INFLUENTS PAR DES PLANS D'EXPERIENCES 108
3.1. Mise en place de plans d'expériences pour un criblage des paramètres 108
3.1.1. Choix du domaine expérimental 108
3.2.2. Matrice de criblage 110
3.2. Matrice composite d'optimisation 112
CONCLUSION 118

C. EXTRACTION DE PEPTIDES PAR ELECTRODIALYSE ASSOCIEE A DES MEMBRANES D'ULTRAFILTRATION 119

1. MATERIELS ET METHODES SPECIFIQUES 120
1.1. Configuration des cellules d'électrodialyse 120
1.1.1. Cellule d'extraction 120
1.1.2. Cellule de désorption 121
1.2. Protocole expérimental 123
1.2.1. Protocole d'extraction 123
1.2.2. Protocole de désorption 123
1.3. Conductivité 124
1.4. Détermination de la densité limite de courant 124
1.5. Dosage total en protéines 124
1.6. Mesure de l'épaisseur des membranes 124
1.7. Potentiel d'écoulement 124

2. PARAMETRES D'ELECTRODIALYSE 126
2.1. Conductivité *126*
2.2. Résistance apparente du système *128*
3. MIGRATION PEPTIDIQUE 129
3.1. Migration peptidique totale *129*
3.2. Profils C.L.H.P.-P.I. *130*
3.3. Résultats E.S.I.-S.M. *132*
4. EVALUATION DE L'ENCRASSEMENT 135
4.1. Evaluation de l'épaisseur des membranes *135*
4.2. Potentiels d'écoulement après extraction *135*
4.3. Potentiel d'écoulement après désorption *138*
4.4. La migration peptidique au cours de la désorption *139*
CONCLUSION 140

CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES 141

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 145

Abréviations

Produits

BSA	Sérum albumine bovine
DCM	Dichlorométhane
HCl	Acide chlorhydrique
KCl	Chlorure de potassium
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
SDS	Sodium dodécyl-sulfate
TCA	Trichloroacétate de sodium
TFA	Acide trifluoroacétique

Matériels

A.E.M.	Membrane d'échange anionique
C.E.M.	Membrane d'échange cationique
D.S.A.	Dimensionally stable anode
ED	Electrodialyse
EDUF	Electrodialyse associée à des membranes d'ultrafiltration
MP	Multipurpose
PES	Polyethersulfone
PS	Polysulfone
UF	Ultrafiltration

Méthodes

ANOVA	Analyse de la variance
BCA	Bicinchoninic acide
C.L.H.P.-P.I.	Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse
D.H.	Degré d'hydrolyse
E/S	Rapport enzyme sur substrat
ER	Ratio d'enrichissement
E.S.I./S.M.	Spectrométrie de masse ionisation Electrospray-Ionspray
R	Rendement d'extraction
R.M.N.	Résonnance magnétique nucléaire
U.A.E.	Unité d'activité enzymatique

Autres

C.M.C.	Concentration micellaire critique
C*X*	longueur de chaîne carbonée, de *X* carbones
LVVh-7 et VVh-7	Peptides hémorphines LVVYPWTQRF et VVYPWTQRF
S.I.F.CO.	Syndicat des industries françaises des coproduits animaux

Avant-propos

L'hydrolyse enzymatique est pratiquée depuis longtemps en industrie agroalimentaire pour améliorer des propriétés fonctionnelles des protéines comme la solubilité, le pouvoir moussant ou gélifiant. L'hydrolyse de protéines prit de l'ampleur avec la préparation d'hydrolysats peptidiques à destination des aliments et des boissons. Des peptides ou fractions peptidiques à activité biologique sont régulièrement isolés et caractérisés, et leurs applications dans l'industrie pharmaceutique et l'alimentation fonctionnelle se multiplient. Ainsi des peptides sont isolés par exemple à partir d'hydrolysats de caséines (Schlimme et Meisel, 1995, Lapointe *et coll.*, 2006), de protéines de soja (Gunther, 1979), de gluten (Zioudrou *et coll.*, 1979). Ces séquences peptidiques peuvent correspondre à de nombreuses activités telles qu'immunostimulantes (Werner *et coll.*, 1986), anti-thrombotiques (Bouhallab et Touzé, 1995), antimicrobiennes (Bellamy *et coll.*, 1992), opioïdes (Fiat et Jolles, 1989), hypertensives (Poulin *et coll.*, 2006). Des applications se retrouvent dans la formulation d'aliments infantiles hypoallergéniques (Cordle *et coll.*, 1991 et 1994 ; Kleinmann *et coll.*, 1991), et la nutrition thérapeutique (Cordano et Cook, 1989).

L'hydrolyse enzymatique offre des possibilités de valorisations intéressantes des nombreux coproduits de l'industrie alimentaire. En 2009 par exemple, plus de 2,99 millions de tonnes de sous-produits d'origine animale (S.I.F.CO.) sont sortis des abattoirs pour être traités ou détruits. Pour des raisons économiques et environnementales, il est nécessaire de trouver de nouveaux moyens de valorisation de ces produits d'origine naturelle. Le cruor issu des abattoirs est une source particulièrement abondante et homogène en protéines car il contient plus de 90 % d'hémoglobine. De plus sa structure est bien définie et peut nous servir de modèle pour notre étude : elle contient de nombreuses séquences peptidiques à activités biologiques. L'intérêt des hydrolysats pepsiques de l'hémoglobine bovine fut montré lors d'études au sein du laboratoire par Piot *et coll.* (1988) qui mit en œuvre une hydrolyse à l'échelle pilote, et différentes activités biologiques furent mises en évidence lors de l'isolement, par exemple, de peptides aux propriétés opioïdes (Piot *et coll.*, 1992) ou antibactériennes (Nedjar-Arroume *et coll.*, 2006) qui présentent les particularités d'être hydrophobes ou amphiphiles cationiques respectivement.

Le développement de procédés pour isoler des peptides purs ou des fractions peptidiques actives est cependant difficile car ces peptides sont au sein de mélanges très complexes, les hydrolysats contenant des centaines de peptides aux tailles et propriétés relativement similaires. Les méthodes classiques de chromatographie haute performance en phase inverse incluant des préfractionnements par des filtrations sur gel sont lourdes et coûteuses tandis que les techniques de filtrations membranaires présentent une trop faible sélectivité. Il convient donc de développer de nouveaux procédés, incluant des facteurs supplémentaires de sélectivité, afin de pouvoir isoler plus facilement des peptides d'intérêt.

L'objectif des recherches présentées dans ce mémoire est d'orienter l'extraction sélective de peptides présents dans des hydrolysats issus de la réaction pepsique de

l'hémoglobine bovine, vers l'obtention de fractions peptidiques actives par différents procédés, en fonction des propriétés physico-chimiques des peptides ciblés. Le développement de nouvelles méthodes et procédés est donc de mise pour pouvoir fractionner de manière contrôlée ces hydrolysats, tout en conservant une sélectivité et un rendement intéressant. L'application de procédés innovants d'extraction à nos hydrolysats peptidiques connus doit également nous permettre d'appréhender les différents phénomènes d'interactions pouvant alors intervenir entre les peptides et leur environnement, tant liquide (solvants…) que solide (membranes…), les paramètres physico-chimiques sur lesquels nous pouvons travailler étant nombreux.

Le chapitre introductif a pour objectif dans un premier temps, de décrire l'étendue actuelle du savoir sur les différents domaines abordés au cours de cette étude, à commencer par les connaissances sur les peptides actifs issus de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine, puis sur les techniques de filtration membranaires, associées ou non à un système d'extraction biphasique, pour enfin traiter des connaissances sur les techniques récemment développées qui s'appliquent à nos travaux : l'extraction assistée par paires d'ions via un contact liquide-liquide entre la solution aqueuse initiale et un solvant organique, le développement de procédés moussants à base de protéines ou peptides et enfin les techniques d'électrodialyse associées à des membranes d'ultrafiltration. Dans un second temps les différents procédés d'extraction sélective étudiés seront ensuite abordés et discutés en fonction de leur capacité à fractionner les hydrolysats, et en analysant les nombreux phénomènes d'interactions entre les différents paramètres.

Chapitre I
Introduction

1. Synthèse bibliographique

1.1. Rappels sur les peptides bioactifs issus de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine

1.1.1. Rappels sur l'hémoglobine bovine

La protéine utilisée au cours de notre recherche était l'hémoglobine bovine, protéine globulaire d'une masse moléculaire de 64500 Daltons, constituée d'une partie protéique, la globine, et d'hème. La globine est un tétramère formé par l'association de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux protomères α et deux protomères β. Chaque protomère adopte une configuration spatiale lui donnant une forme globulaire et ménageant une « poche » superficielle dans laquelle se loge l'hème. Une molécule d'hémoglobine peut ainsi fixer quatre molécules d'oxygène. La chaîne α est constituée de 141 acides aminés (Sasakawa, 1961) et la chaîne β de 145 acides aminés (Shroeder *et coll.*, 1967). La figure 1 illustre les séquences en acides aminés des deux chaînes polypeptidiques α et β.

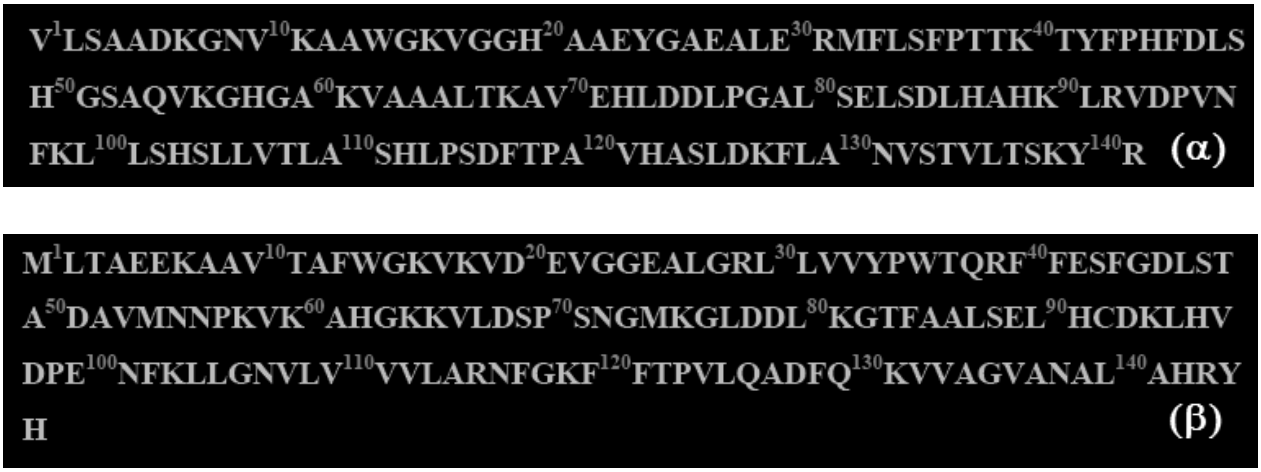


Figure 1. Séquence en acides aminés des chaînes α et β de l'hémoglobine bovine.

L'hème est constitué d'une protoporphyrine ayant en son centre un atome de fer. La protoporphyrine est formée de quatre cycles pyrroliques unis par l'intermédiaire de ponts méthènés et substitués par des groupes méthyle, propionate et vinyle dont la disposition est caractéristique du type IX, comme présenté dans la figure 2.

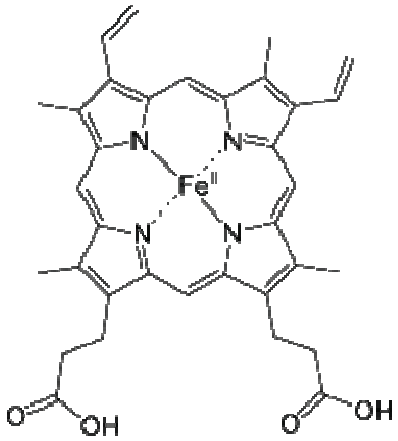


Figure 2. Structure de l'hème.

L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine conduit à la production d'hydrolysats peptidiques. En conditions dénaturantes, un mécanisme d'hydrolyse de type « zipper » intervient : de nombreux peptides à activités biologiques apparaissent transitoirement lors de ces réactions d'hydrolyse. En fonction de la cinétique de l'hydrolyse, la population peptidique dans le milieu change donc, jusqu'à obtenir un hydrolysat peptidique constitué uniquement de peptides finaux qui s'accumulent dans le milieu réactionnel. Les peptides dont l'intérêt a déjà été mis en évidence, ceux qui présentent une ou plusieurs activités biologiques, sont présentés dans la partie suivante.

1.1.2. Les peptides à activités biologiques issus de l'hydrolyse enzymatique

Différentes équipes (Schally *et coll*., 1978 ; Ivanov et *coll*., 1992) ont mené des travaux sur l'isolement de peptides actifs à partir d'extraits d'organes de porcs ou de bovins (hypothalamus, cerveau…). Leurs investigations se situaient dans le cadre de la recherche d'un lien entre ces peptides et une fonction de l'organe, dans le but de produire un test pour évaluer la fonction de l'organe, après fractionnement des extraits contenant ces peptides actifs. Cette démarche leur a permis d'isoler et d'identifier de nombreux peptides à activités biologiques (analgésique, opioïde, antimicrobienne…).

Les séquences de certains peptides actifs ont été retrouvées dans les chaînes de l'hémoglobine bovine et c'est Brantl *et coll.* (1986) qui ont isolés pour la première fois des peptides à activités biologiques à partir de l'hydrolyse enzymatique *in vitro* de l'hémoglobine bovine. D'autres équipes ont ensuite isolé des peptides actifs à partir de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine (Piot *et coll.*, 1992 ; Ivanov *et coll.*, 1997 ; Zhao *et coll*., 1998 ; Vercaigne-Marko *et coll*., 2000 ; Nedjar-Arroume *et coll.*, 2008).

Aujourd'hui, à partir de l'hémoglobine bovine, plus de 150 fragments ont été isolés et les activités biologiques de plus de 40 d'entre eux ont été mises en évidence (Karelin *et coll*., 1995, Fogaça *et coll*., 1999). Les études systématiques sur la reconnaissance de fragments actifs de l'hémoglobine sont résumées dans les tableaux suivants. Ces tableaux décrivent : la

séquence du peptide actif et la source à l'origine de son premier isolement, la chaîne où cette séquence est retrouvée dans l'hémoglobine, le mode d'hydrolyse utilisé pour son isolement si le peptide a déjà été isolé à partir de l'hémoglobine bovine. Dans ces tableaux, les séquences mise en évidence à ce jour ont été regroupées par grandes familles d'activités biologiques.

Famille des kyotorphines (tableau 1)

L'appellation « kyotorphines » correspond à leur action sur la libération d'un peptide opioïde, la Met-Encéphaline.

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
YR (kyotorphine)	Cerveau bovin	α(140-141)	-	- Analgésique	Takagi *et coll.* (1979)
TSK	Glande pituitaire bovine	α(137-139)	-	- Antigonadotropique	Orts *et coll*. (1978)
TSKY (Néokyotorphine (1-4))	Cerveau d'écureuil sibérien (type *Citellus undulatus*) en hibernation[a]	α(137-140)	Pepsine[b]	- Régule le potentiel dépendant Ca^{2+}/K^{+} au sein des fibres cardiaques (chez la grenouille)[a] - cytotoxique[a]	[a]Blishchenko *et coll.* (1996) [b]Zhao et Piot (1998)
TSKYR (Néokyotorphine)	Cerveau bovin[a]	α(137-141)	-	- Analgésique[a] - Induit l'éveil de l'état d'hibernation[b] - Régule le potentiel dépendant Ca^{2+}/K^{+} au sein des fibres cardiaques (chez la grenouille)[b]	[a]Takagi *et coll.* (1982) [b]Vaskovsky *et coll*. (1990)

Tableau 1. Famille des kyotorphines

Peptides potentialisateur de la bradykinine (tableau 2)

Ces peptides permettent à la quinine un développement maximal de son efficacité, en se fixant spécifiquement à des récepteurs de la quinine stimulant sa production.

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
LANVST	Hémoglobine bovine	α(129-134)	Pepsine	- Potentialise l'action de la quinine (test réalisé sur l'iléon de cobaye)	Piot *et coll.* (1992)

Tableau 2. Peptides potentialisateur de la bradykinine.

Peptide hypolipidémiant (tableau 3)

Ce peptide est appelé ainsi car il diminue de manière conséquente le taux de lipides au niveau hépatique et de l'appareil digestif.

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
VVYP	Hémoglobine bovine[a]	β(32-35)	Protéase acide[a]	- Inhibe l'adsorption des graisses au niveau de l'appareil digestif[b] - Engendre l'activité de la lipase hépatique (EC 3.1.1.3) sur les triglycérides chez les souris[a]	[a]Kagawa *et coll.* (1996) [b]Kagawa *et coll.* (1998)

Tableau 3. Peptide hypolipidémiant.

Peptides hématopoïétiques (tableau 4)

Ces peptides ont un rôle dans l'hématopoïèse, c'est-à-dire la formation des globules rouges du sang, qui a lieu principalement dans la moelle rouge des os. La majeure partie des peptides hématopoïétiques est issue d'une hydrolyse chimique de la chaîne α de l'hémoglobine.

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
VLSAADKG VLSAADKGNVKAA VLSAADKGNVKAAWK SAADKGNV KGVGGHAAEYGAEA VGGHAAEYGAEAL VGGHAAEYGAEA AEYGAEAL GAEALER EALE MLTAEEKAAVT MLTAEEKAA MLTAEEKA GKVKVDEVDEVGGEALGRL EVGGEALGRL ARNFGKFF	Moelle rouge des os	α(1–8) α(1–13) α(1–16) α(3–10) α(16–28) α(17–29) α(17–28) α(22–29) α(25–31) α(27–30) β(2–12) β(2–11) β(2–10) β(16–31) β(22–31) β(115–122)	-	- Restauration de la fonction hématopoïétique de souris soumises à des radiations ou traitées au 5-fluoro-uracile	Ivanov *et coll*. (1992)
LPGALSE KLHVDPE	Hémoglobine bovine[a]	α(76–82) β(94–100)	Protéase V8 de *Staphylococcus aureus*[a]	- Restauration de la fonction hématopoïétique de souris soumises à des radiations ou traitées au 5-fluoro-uracile[a]	[a]Vercaigne-Marko *et coll*. (2000) [b]Ivanov *et coll*. (1997)

Tableau 4. Peptides hématopoïétiques.

Peptides antimicrobiens (tableau 5)

Ces peptides ont la propriété de détruire ou d'inhiber la croissance des cellules bactériennes et des champignons.

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
VLSAADKGNVKAAWKGVGGHAAEYGAEALERM VLSAADKGNVKAAWKGVGGHAAEYGAEAL VLSAADKGNVKAAWKGVGGHAAEYGAEA VLSAADKGNVKAAWKGVGGHAAEYGAE VLSAADKGNVKAAWKGVGGHAAE FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTK AVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTK AVEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKA VEHLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVNF FPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVE HLDDLPGALSELSDLHAHKLRVDPVN PTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEH LDDLPGGALSELSDLHAHKLRVDPVNF FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTK AVEHLDDLPGGALSEL	Hémoglobine bovine	α(1-32)[c] α(1-29)[c] α(1-28)[c] α(1-27)[c] α(1-23)[a] α(33-98)[c] α(33-97)[c] α(34-98)[c] α(36-97)[c] α(37-98)[c] α(33-83)[c]	Pepsine	- Antimicrobien (bactéries *Micrococcus. luteus A270, Salmonella enteritidis, Listeria innocua, Eschericha coli*)	[a]Froidevaux *et coll*. (2001) [b]Nedjar-Arroume *et coll*. (2006) [c]Nedjar-Arroume *et coll.* (2008)

Tableau 5. Peptides antimicrobiens.

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAALTK AVEHLDDLPGGALSEL FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAAL LSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAKVAAAL FLSFPTTKTYFPHF FLSFPTTKTYFPH LSFPTTKTYFPHF FPTTKTYFPH PTTKTYFPHF VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSKYR VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL VTLASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVS STVLTSKYR TSKYR ARNFGKFFTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH FTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH QADFQKVVAGVANALAHRYH LAHRYH MLTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL MLTAEEKAAVTAF	Hémoglobine bovine	α(34-83)[c] α(33-66)[c] α(34-66)[c] α(33-46)[c] α(33-45)[c] α(34-46)[c] α(36-45)[c] α(37-46)[c] α(107-141)[b] α(107-136)[c] α(107-133)[c] α(133-141)[b] α(137-141)[b] β(114-145)[c] β(121-145)[c] β(126-145)[b] β(140-145)[c] β(1-30)[c] β(1-13)[c]	Pepsine	- Antimicrobien (bactéries *Micrococcus. luteus A270, Salmonella enteritidis, Listeria innocua, Escherichia coli*)	[a]Froidevaux *et coll*. (2001) [b]Nedjar-Arroume *et coll*. (2006) [c]Nedjar-Arroume *et coll.* (2008)

Tableau 5. Peptides antimicrobiens (suite).

Séquence	Première mise en évidence	Localisation dans l'hémoglobine	Enzyme	Activité(s)	Références
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGAK	Intestin du tique *Boophilus microplus*	α(33-61)	-	- Antimicrobien (bactéries Gram positive *M. luteus, S. epidermidis ; champignons C. albicans, A. nidulans, S. cerevisiae*)	Fogaça *et coll.* (1999)

Tableau 5. Peptides antimicrobiens (suite et fin).

Peptides coronaro-constricteurs (tableau 6)

Ces peptides peuvent provoquer l'oblitération des artères coronaires du muscle cardiaque. Aucun de ces trois peptides n'a été isolé à partir d'une hydrolyse, enzymatique ou chimique, de l'hémoglobine bovine *in vitro*.

Séquence	Première mise en évidence	Localisation dans l'hémoglobine	Enzyme	Activité(s)	Références
VVYPW	Hypothalamus bovin	β(32-36)	-	- Coronaro-constricteur	Barkhudaryan *et coll.* (1992)
VLSAADKGNVKAAWKGVGGHA VAAGVANALAHRYH	Hypothalamus bovin	α(1-21) β(133-145)	-	- Coronaro-constricteur	Barkhudaryan *et coll.* (1993)

Tableau 6. Peptides coronaro-constricteurs.

Peptide stimulateur de la croissance bactérienne (tableau 7)

Ce peptide doit son appellation à son activité : la stimulation de la croissance des bactéries.

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
STADA	Hémoglobine bovine	β(48-52)	Pepsine	- stimule la croissance des bactéries Gram-négatives	Zhao *et coll*. (1996)

Tableau 7. Peptide stimulateur de la croissance bactérienne.

Famille des hémorphines (tableau 8)

Les hémorphines sont issues de l'hémoglobine bovine et présentent une activité opiacée. Ils proviennent tous, par clivages successifs, du segment 31-40 de la chaîne β de l'hémoglobine bovine.

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
LVVYPWTQRF (LVV-hémorphine-7)	Hypothalamus porcin[a]	β(31-40)	Pepsine[b]	- fixation sur un récepteur opiacé spécifique[c] - Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye[b] - Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II[d] - Coronaro-constricteur[e]	[a]Chang *et coll.* (1980) [c]Glämsta *et coll.* (1991) [b]Piot *et coll.* (1992) [e]Barkhudaryan *et coll.* (1993) [d]Zhao *et coll.* (1994)
VVYPWTQRF (VV-hémorphine-7)	Hypothalamus porcin[a]	β(32-40)	Pepsine[b]	- fixation sur un récepteur opiacé spécifique[c] - Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye[b] - Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II[d]	[a]Chang *et coll.* (1980) [c]Glämsta *et coll.* (1991) [b]Piot *et coll.* (1992) [d]Zhao *et coll.* (1994)
LVVYPWTQR (LVV-hémorphine-6)	Glande pituitaire humaine[a]	β(31–39)	-	- fixation sur un récepteur opiacé spécifique[a] - Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye[a] - Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II[b]	[a]Glämsta *et coll.* (1991) [b]Lantz *et coll.* (1991)

Tableau 8. Famille des hémorphines.

Séquence	Première mise en évidence	Localisation dans l'hémoglobine	Enzyme	Activité(s)	Références
VVYPWTQR (VV-hémorphine-6)	Hypothalamus bovin[a]	β(32–39)	-	- fixation sur un récepteur opiacé spécifique[b] - Coronaro-constricteur[c]	[c]Barkhudaryan *et coll.* (1993) [a]Galoyan (1997) [b]Nyberg *et coll.* (1997)
YPWTQR (hémorphine-6)	Glande pituitaire humaine[a]	β(34–39)	-	- fixation sur un récepteur opiacé spécifique[b] - Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye[a] - Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II[c]	[a]Glämsta *et coll.* (1991) [c]Lantz *et coll.* (1991) [b]Nyberg *et coll.* (1997)
LVVYPWTQ (LVV-hémorphine-5)	Cerveau bovin[a]	β (31–38)	Pepsine[b]	- Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye[b] - Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II[b]	[a]Karelin *et coll.* (1994) [b]Zhao et Piot (1997)
VVYPWTQ (VV-hémorphine-5)	Hypothalamus bovin[a]	β(32–38)	Pepsine[b]	- fixation sur un récepteur opiacé spécifique[b] - Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye[b] - Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II[b] - cytotoxique[c] - Coronaro-constricteur[d]	[d]Barkhudaryan *et coll.* (1993) [a]Karelin *et coll.* (1994) [c]Blishchenko *et coll.* (1996) [b]Zhao et Piot (1997)

Tableau 8. Famille des hémorphines (suite).

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
YPWTQ (hémorphine-5)	Hémoglobine bovine[a]	β(34–38)	Pepsine[a] Cathepsine[a]	- Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye[a] - Analgésique (effet naloxone)[b]	[a]Brantl *et coll*. (1985) [b]Davis *et coll*. (1989)
LVVYPWT (LVV-hémorphine-4)	Hypothalamus bovin[a]	β(31–37)	Protéases[a]	- Inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II[b] - Coronaro-constricteur[a] - Induit convulsions[c] - Inhibition des enzymes responsables de la dégradation des encéphalines[c]	[a]Barkhudaryan *et coll.* (1992) [c]Nishimura et Hazato (1993) [b]Nyberg *et coll*. (1997)
VVYPWT (VV-hémorphine-4)	Moelle osseuse de porcin[a]	β(32–37)	-	- Immuno-modulateur[a] - Coronaro-constricteur[b]	[a]Fonina *et coll*. (1991) [b]Barkhudaryan *et coll.* (1992)
YPWT (hémorphine-4)	Hémoglobine bovine[a]	β(34–37)	Pepsine[a] Cathepsine[b]	- Inhibition des contractions électriques de l'iléon de cobaye[a] - Analgésique (effet naloxone)[b] - fixation sur un récepteur opiacé spécifique[c]	[a]Brantl *et coll.* (1985) [b]Davis *et coll*. (1989) [c]Barkhudaryan *et coll.* (1993)

Tableau 8. Famille des hémorphines (suite et fin).

Autres activités (tableau 9)

Séquence	**Première mise en évidence**	**Localisation dans l'hémoglobine**	**Enzyme**	**Activité(s)**	**Références**
FLSFPTTKTYFPHF	Hypothalamus porcin	α(33–46) (1)	-	- Libération de la corticotropine	Schally *et coll*. (1978)
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQV? FLSFPTTKTYFPHFDLSH? FLSFPTTK?	Cervelet humain	α(33–55?) (1) α(33–50?) (1) α(33–40?) (1)	-	- Marqueur de la maladie d'Alzheimer	Slemmon *et coll*. (1994)

Tableau 9. Autres activités.

« ? » désigne la non connaissance du ou des résidus d'acides aminés en position C-terminale du peptide actif.

(1) ces peptides comportent une partie de la séquence du peptide antimicrobien α(33-61) isolé dans l'intestin du tique *B. microplus*, mais leurs activités antimicrobiennes n'ont pas encore été reconnues.

1.2. Les procédés d'extraction sélective de peptides

Les hydrolysats enzymatiques de protéines sont souvent associés à des mélanges complexes de peptides difficiles à résoudre. Dans le domaine analytique, ce sont surtout les progrès réalisés en matière de chromatographie qui ont été déterminants pour l'étude de tels mélanges.

Jusqu'à la fin des années soixante, les mélanges peptidiques complexes, produits par hydrolyse enzymatique de protéines, étaient séparés par des techniques telles que la chromatographie d'échange d'ions (Shroeder et Robberson, 1965 ; Hill et Delaney, 1967), la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier ainsi que par électrophorèse (Bennet, 1967). Mais la faible résolution et le faible rendement de récupération des produits séparés (Böhlen et Kleman, 1981) ont souvent été des inconvénients majeurs.

A la fin des années quatre-vingt, l'association de la chromatographie d'exclusion stérique à basse pression et de la C.L.H.P. en phase inverse a permis à Piot *et coll.* (1988, 1989a) de purifier des peptides à partir d'un hydrolysat d'hémoglobine bovine. Ces techniques chromatographiques sont alors apparues essentielles pour le fractionnement d'un mélange peptidique aussi complexe dans le but d'isoler des peptides purs et la recherche de peptides d'intérêt. Piot *et coll.* (1989b) ont ensuite substitué la chromatographie d'exclusion stérique à haute pression à la chromatographie de basse pression, permettant un gain de temps pour l'isolement des peptides ainsi qu'une meilleure résolution.

Le développement de ces techniques permet d'établir des stratégies de séparation sélective de peptides actifs reposant sur l'exploitation des propriétés physico-chimiques de ces peptides présents dans la solution initiale, telles que leur affinité avec le support hydrophobe en C.L.H.P.-P.I., leur taille moléculaire… D'autres procédés se sont développés en basant leur sélectivité de séparation sur ces propriétés, comme les extractions à l'aide de membranes d'ultrafiltration qui peuvent séparer des populations peptidiques de tailles moléculaires différentes.

1.2.1. Les séparations membranaires

Les applications directes de la filtration par une membrane physique se développent aujourd'hui énormément dans de nombreux domaines technologiques, dans l'agroalimentaire, le médical et le traitement de l'eau notamment, où les différents types de filtration, de la filtration grossière à l'osmose inverse, en passant par la micro-, l'ultra- et la nanofiltration interviennent. Parmi toutes ces techniques de filtration, nous traiterons ici plus particulièrement des travaux liés à l'ultrafiltration des peptides, la suite de notre étude s'y rapportant spécifiquement.

L'ultrafiltration est une technique de filtration en phase liquide qui permet de concentrer ou d'extraire des espèces dissoutes ou en suspension sous l'effet d'un gradient de pression à travers une membrane poreuse qui joue le rôle d'un tamis moléculaire. La gamme

des tailles de molécules pouvant être séparées par des membranes d'ultrafiltration s'étend de 1 à 100 nm. Il existe différents types de membranes d'ultrafiltration : des membranes organiques (acétate de cellulose, polyamide, polysulfone…), inorganiques (céramique, carbone, verre, métal) ou composites (organiques + inorganiques). La structure des membranes peut aussi être homogène ou asymétrique et leur mise en œuvre peut être sous forme plane, spiralée, tubulaire ou de fibres creuses (Maurel, 1993 ; Marshall *et coll*., 1993). Les applications d'extraction de peptides ou de fractions peptidiques sont nombreuses car les origines des substrats protéiques sont multiples.

Premier exemple d'application d'une préparation sélective en continu de peptides actifs au cours de l'hydrolyse enzymatique d'une protéine agroalimentaire, les travaux de Bouhallab *et coll.* (1992) se sont appuyés sur les différences de taille moléculaire des peptides générés au cours de l'hydrolyse du caséinomacropeptide de la caséine K par la trypsine dans le but de préparer en continu des peptides présentant une activité antithrombotique dans un réacteur ouvert couplé à une membrane d'ultrafiltration. La réaction enzymatique, réalisée à pH 7, conduisait à la formation d'un peptide de 6000 Da et de quatre peptides antithrombotiques dont la taille moléculaire était comprise entre 500 et 780 Da. La membrane d'UF utilisée possédait un seuil de coupure de 3000 Da et permettait alors une séparation fondée sur la différence de taille moléculaire des peptides. Des exemples d'applications sont présentés dans le tableau 10, détaillant la source protéique et l'enzyme utilisée, les membranes employées et les spécificités de la fraction isolée.

Membrane d'ultrafiltration	Seuil de coupure (kDa)	Origine de l'hydrolysat	Caractéristique(s) de la fraction isolée	Référence(s)
M5 Carbosep (carbone-zirconium)	10	β-caséine hydrolysée par la chymosine	- β-CN (193-209) : immuno-modulateur	Bouhallab *et coll.* (1995)
PES (ESP04)	4	Prolastin ® ou MariPep C ® (hydrolysats d'élastine ou de cabillaud)	- séparation de fractions peptidiques à la limite des poids moléculaire de 600-750 Da	Bourseau *et coll.* (2009)
Cellulose régénérée	2,5 à 10	Protéines du lactoserum hydrolysées par la chymosine	- perméat sans protéines	Butylina *et coll.* (2006)
PES	4	Portéines du muscle de colin (*Pollachius virens*) hydrolysées par Alcalase 2,4 L ®	- antioxydante - hypertensive	Chabeaud *et coll.* (2009)
[a]Nombreuses combinaisons parmi : - PES, cellulose régénérée, ZrO_2 - tubulaire, spiralé, fibres creuses, plan [b]M5 Carbosep (carbone-zirconium)	10	Concentré de protéines de luzerne hydrolysé par la [a,b]Delvolase ® ou la [b]pepsine	- filtrat partiellement décoloré, avec une amertume moindre[a]	[a]D'Alvise *et coll.* (2000) [b]Prevot-D'Alvise *et coll.* (2004)
PES	5	Protéines de graines de sésame hydrolysées par la papaïne	- concentré d'hydrolysat	Das *et coll.* (2009)

Tableau 10. Exemples d'applications de techniques d'ultrafiltration pour l'extraction de peptides.

A.D.N. immobilisé sur cellulose	5	-	- séparation chirale des L- et D-phénylalanine	Higuchi *et coll.* (2003)
Cellulose régénérée[a] PES[a,b]	10	Hémoglobine bovine hydrolysée par la pepsine	- sans hème	[b]Lebrun *et coll.* (1998) [a]Dhulster *et coll*. (2002)
SPUF-10 (mousse de polyuréthane)	10	Concentré de protéines de soja hydrolysés par Flavourzyme ®	- antioxydante	Moure *et coll.* (2006)
PS	2-3	Séricine hydrolysée par la trypsine	- séricine isolée des oligopeptides d'un poids moléculaire de 1500-1900 Da	Myung *et coll.* (2008)
PS, fibres creuses	1 et 30	Caséine hydrolysée par la trypsine ou la chymotrypsine	- deux fractions isolées de poids moléculaire moyen différent	Pouliot *et coll.* (1993)
PS (PU608) PES (ESP04)	8 4	Hydrolysat de filet de merlan bleu	- fraction d'un poids moléculaire de 1000-3500 Da (activité non précisée)	Vandanjon *et coll.* (2009)
UFP-5-C ®	20 à 100	Gluten de blé hydrolysé par Protamex™	- émulsifiante	Wang *et coll.* (2006)
PES (Vivaspin® 4)	10	Sérum et plasma humain	- peptides d'un poids moléculaire inférieur à 10 kDa extraits des protéines	Zheng *et coll.* (2006)

Tableau 10. Exemples d'applications de techniques d'ultrafiltration pour l'extraction de peptides (suite et fin).

La séparation de peptides issus de mélanges complexes est réalisable si l'hydrolysat peptidique présente des populations de tailles moléculaires bien distinctes (Chabeaud *et coll*., 2009). Des étapes successives d'ultrafiltration, avec des membranes de seuil de coupure de plus en plus fin permettent de procéder à des séparations simultanées de plusieurs populations d'intérêt (You-Jin *et coll.*, 1999). Mais la sélectivité de la membrane intervient également par sa nature : la charge de celle-ci face à celles des peptides (Pouliot *et coll.*, 1993), les phénomènes de polarisation liés à la concentration (Das *et coll*., 2009) peuvent être des sources de sélectivité entraînant des ralentissements dans le transfert des peptides ou même de l'encrassement des membranes (Lebrun *et coll*., 1998).

Les extractions sélectives de peptides actifs d'intérêt à partir de mélanges ne sont cependant pas toujours aisées à mettre en œuvre, car les mélanges sont souvent complexes et présentent de nombreuses fractions peptidiques de même taille moléculaire. Les membranes d'ultrafiltration présentent alors une trop faible sélectivité tandis que les méthodes chromatographiques incluant différentes étapes de préfractionnement telles que la filtration sur gel ou la C.L.H.P. sont laborieuses et coûteuses (Bazinet et Firdaous, 2009). D'autres stratégies sont alors à envisager, comme l'utilisation d'autres propriétés physico-chimiques pour extraire des peptides d'intérêt, telles que l'hydrophobie, la charge du peptide considéré, ou encore la combinaison de différentes méthodes en couplant les procédés.

1.2.2. Les séparations membranaires couplées à l'électrodialyse

Bargeman *et coll.* (2000) ouvrèrent une nouvelle stratégie de recherche en cherchant à associer un procédé d'électrodialyse à un procédé d'ultrafiltration. Ils isolèrent de la lysine et de la leucine à partir de solutions modèles dans un premier temps, puis d'un hydrolysat de caséine, par l'association d'un champ électrique à une membrane de filtration. Une pression transmembranaire d'une valeur de 0,5 bar permettait un meilleur rendement d'extraction qu'à une pression transmembranaire plus forte (2 bars) pour une vitesse de transport presque identique. L'accroissement de la différence de potentiel de 20 à 40 V permit de doubler la vitesse de migration de la lysine. Des essais de ce procédé sur un hydrolysat de lactoferrine permirent d'isoler une fraction peptidique aux propriétés antibactériennes. Ils poursuivirent leurs études (2002) en appliquant le même procédé sur des hydrolysats de caséine α_{S2}. Le peptide antimicrobien *f*(183-207) fut isolé. Mais l'application d'une membrane en polysulfone (20 kDa) réduit nettement la vitesse de transfert de celui-ci dans le compartiment de récupération.

Lapointe *et coll.* (2005,2006) travaillèrent sur un procédé similaire pour extraire des peptides cationiques d'un hydrolysat de β-lactoglobuline. Le peptide β(142-148), qui présente des propriétés hypertensives, fut isolé. Différents paramètres tels que le pH, la pression transmembranaire et la vitesse de passage de la solution d'alimentation dans le module d'alimentation furent étudiés. Les meilleurs résultats d'extraction sélective mirent en évidence le caractère prépondérant de la différence de potentiel sur les autres gradients de force impliqués. L'application d'un gradient de pression menait cependant à une accumulation des molécules sur la membrane, ce qui en modifiait la sélectivité.

Le caractère dominant de la différence de potentiel mis en évidence, Bazinet *et coll.* (2005) développèrent alors un procédé d'électrodialyse associé à des membranes d'ultrafiltration, les molécules soumises à un gradient de charges pour seule force motrice, sans gradient de pression. Ce système d'extraction simultanée des peptides anioniques et cationiques présenté pour la première fois fut alors appliqué aux travaux de Poulin *et coll.* (2006). Ils isolèrent de manière simultanée deux fractions peptidiques, issues d'un hydrolysat de β-lactoglobuline, indépendamment des conditions de pH (5, 7 ou 9) appliquées aux solutions. Le peptide β(142-148), également isolé dans les travaux précédents de Lapointe *et coll.* (2006), fut extrait dans la fraction cationique : il est passé d'une concentration relative de 3,8 % dans l'hydrolysat à une concentration relative de 38 % dans la solution de récupération, pour un pH de 9 et une différence de potentiel de 5 V.

La combinaison innovante de procédés dits classiques permet d'obtenir des résultats intéressants. De nouvelles combinaisons de procédés sont toujours développées, comme dans les travaux de Balchen *et coll.* (2008) par exemple où un contacteur à membrane vient supporter une interface organique constituée d'octan-1-ol et des peptides sont extraits d'une phase aqueuse donneuse vers une phase réceptrice grâce à un gradient électrique, mettant en évidence les influences de la charge des peptides et de la polarité du solvant utilisé.

1.2.3. Les extractions sélectives en systèmes biphasiques

1.2.3.1. Les extractions sélectives en systèmes biphasiques eau-solvants organiques

L'interface entre deux solvants non miscibles peut constituer une surface de transfert en extraction directe liquide-liquide. Ces extractions d'un soluté reposent sur un principe d'affinité entre une première phase liquide et une seconde, jusqu'à arriver à un équilibre par un phénomène de partage.

Des études furent menées sur l'extraction des peptides actifs grâce à leurs propriétés hydrophobes, en les solubilisant dans des solvants organiques non-miscibles à l'eau. Aubes-Dufau *et coll.* (1995) ont extrait un peptide amer issu de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine dans une fraction recueillie dans du butan-2-ol. Ce peptide, correspondant au fragment 32-40 de la chaîne β de l'hémoglobine bovine, fut ensuite isolé par filtration sur gel et C.L.H.P.-P.I.. Aubes-Dufau et Combes (1997) ont ensuite testé différentes protéases (subtilisine, aspergillopepsine, papaïne) pour produire des peptides amers à partir de l'hémoglobine bovine. L'extraction biphasique par le butan-2-ol a permis d'isoler une fraction peptidique issue de l'hydrolyse par l'aspergillopepsine et une autre fraction issue de l'hydrolyse par la subtilisine. Par les mêmes méthodes que précédemment, le peptide amer β(32-39) fut mis en évidence dans la première fraction pendant que l'autre fraction contenait le peptide amer β(32-36).

Zhao et Piot (1998) ont testé différentes classes de solvants organiques non miscibles à l'eau (alcools aliphatiques, cétone, éther, ester et hydrocarbures) pour l'extraction de deux hémorphines issues de la chaîne β de l'hémoglobine bovine : LVVh-7 (fragment 31-40) et VVh-7 (fragment 32-40). Ces deux peptides hydrophobes ont été isolés à partir d'un hydrolysat obtenu par hydrolyse pepsique à pH 2 dans un réacteur enzymatique à membranes minérales. Les alcools aliphatiques, notamment le butan-1-ol et le butan-2-ol ont montré la meilleure sélectivité vis-à-vis de l'extraction biphasique de ces deux peptides hydrophobes.

Cette méthode d'extraction liquide-liquide possède plusieurs avantages : sa mise en œuvre est aisée, peu coûteuse et les différentes phases sont aisément récupérables pour analyses. Cependant les vitesses d'agitation sont faibles de manière à garder une interface stable, sans émulsion, ce qui réduit les vitesses de transferts. Cette méthode d'extraction est donc utile pour tester des configurations relativement simples, mais on lui préférera d'autres procédés tels qu'avec des membranes physiques, ces dernières pouvant supporter de manière plus robuste l'interface sans créer de micro-émulsion, pour augmenter le potentiel de séparation.

Ces travaux mettent toutefois en évidence l'importance des conditions d'extraction : le choix du solvant, du pH, etc. permettent de modifier l'affinité des peptides pour l'une ou l'autre phase. Une stratégie basée sur l'introduction d'agents formateurs de paires d'ions dans le système peut permettre une modification de l'affinité des associations formées, plus hydrophobes, en vue de leur extraction dans un solvant organique.

1.2.3.2. L'extraction assistée par un agent formateur de paires d'ions en systèmes biphasiques eau-solvants organiques

1.2.3.2.1. Notions de paires d'ions

La première théorie sur les interactions ion-ion et ion-solvant fut développée par Arrhenius en 1887. Il émit l'hypothèse que les électrolytes étaient complètement dissociés sous forme ionique quand la solution était infiniment diluée. Il posa la corrélation de la diminution de la conductivité à mesure de l'augmentation de la concentration en électrolyte, présumant de l'association des ions en molécules électriquement neutres. Certaines de ses hypothèses sont encore valables aujourd'hui, mais comme elles étaient limitées aux acides et bases faibles dans l'eau, elles ne permettaient pas d'expliquer totalement le comportement d'électrolytes forts tels que les sels et les acides et bases fortes, où les forces d'attraction inter-ions créent des déviations par rapport au comportement idéal qu'il énonça.

Debye et Hückel (1923) ont résolu ce problème en s'appuyant sur les propriétés thermodynamiques des solvants. Ils posèrent l'hypothèse que les électrolytes forts étaient complètement dissociés sous forme ionique en milieu aqueux et que les déviations observées, exprimées en termes de coefficient d'activité et de force ionique, étaient dues aux effets électrostatiques de l'ion chargé opposé. Cependant cette théorie n'expliquait pas la faible

conductance des électrolytes forts en milieux non-aqueux, et ne s'étendait pas à tous les solvants.

Bjerrum (1927) pris alors en compte les interactions ioniques à courte distance. Il introduisit le concept de paires d'ions et mit en évidence l'influence de la constante diélectrique du solvant, de la température et de la taille des ions. Ces travaux furent appuyés par les recherches menées par Kraus (1956) qui étudia point par point les différents paramètres intervenant dans les théories de Bjerrum (suivi du processus d'association via les constantes de dissociation électrique, comparaison de milieux possédant différentes constantes diélectriques…).

Définition et nature des paires d'ions

Les paires d'ions peuvent être définies comme des espèces neutres formées généralement par attraction électrostatique entre des ions de charges opposées, qui sont souvent suffisamment lipophile pour se solubiliser dans des solvants non-aqueux (Irwin *et coll.*, 1969 ; Florence et Attwood, 1988).

La notation générale A^+,B^- est utilisée pour décrire un composé sous la forme d'une paire d'ions qui existe en tant qu'espèce stable, thermodynamiquement distincte, et non pas en tant que composé de transition ou en une association d'échanges constants (Szwarc, 1970 ; Bult, 1983).

Il est clair cependant qu'en ces termes n'importe quelle espèce soluble, sous certaines conditions, peut être qualifiée de paire d'ions avec un ion de charge opposée présent dans le milieu. Les peptides présentant de multiples sites ionisables, en fonction de leur structure primaire et du pH de la solution, sont capables d'interagir avec des contre-ions appropriés. La formation d'une paire d'ions peptidique résulte de l'imbrication des charges impliquées et de l'altération des propriétés physiques, comme par exemple la lipophilie (Akamatsu *et coll.*, 1989 ; Adjei *et coll.*, 1993 ; Léon *et coll.,* 2004).

Les formes des paires d'ions

Les travaux de Sadek et Fuoss (1954) et ceux de Winstein *et coll.* (1954), confirmés plus tard par Roberts et Szwarc (1965), ont montré que les paires d'ions pouvaient exister sous 2 formes : une paire d'ions intime ou une paire d'ions lâche séparée par du solvant, ceci en fonction de la nature des ions impliqués dans la paire. Les ions libres en solution, entourés de solvant, sont entourés d'une couche de solvatation générée par la polarisation due aux charges de l'ion (cette couche de solvatation étant plus grande que le rayon de l'ion nu). Les ions et contre-ions en solution peuvent donc librement s'approcher jusqu'à ce que ces couches de solvatation entrent en contact du partenaire, ce qui entraine la formation d'un type de paire d'ions ou de l'autre.

Higuchi *et coll.* (1967) ont classé la formation des paires d'ions en trois catégories (figure 3) en fonction du degré d'accessibilité de leur charge.

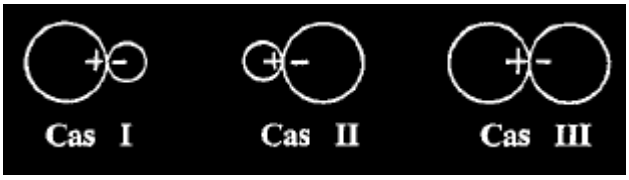


Figure 3. Différentes formes de paires d'ions d'après la théorie de Higuchi et coll. (1967).

Dans le premier cas, on pose l'hypothèse d'un cation de grande taille et lipophile hormis un pôle positivement chargé. On lui associe un anion plus petit, présentant une forte densité de charge. Ce type de système peut être efficacement solubilisé par des molécules lipophiles ayant une surface exposée chargée positivement, comme des molécules polaires avec des protons acides tels que le chloroforme, des phénols et des alcools. Puisque plusieurs molécules du solvant auraient leur pôle chargé entourant l'anion, l'apparence présentée au reste de « l'environnement solvant » par la paire d'ion ainsi solubilisée serait celui d'un ensemble relativement apolaire.

Dans le deuxième cas la situation est inversée, la paire d'ions présentant une charge cationique largement exposée. Des solvants contenant des espèces possédant des sites nucléophiles pourraient alors être particulièrement efficaces pour solubiliser ce type de paire d'ions, comme par exemple des éthers, des cétones et des amides.

Le troisième cas est celui d'une paire d'ions avec des charges profondément imbriquées l'une dans l'autre. N'ayant aucune surface exposée non-équilibrée électriquement, on peut s'attendre à une extraction favorisée par des solvants apolaires.

La nature de l'ion est alors directement impliquée dans la possible formation de paire d'ions. Loupy et Haudrechy (1996) distinguent les ions durs des ions mous. Par définition, un ion dur est petit, à forte densité de charge, peu polarisable et possède des orbitales hautes occupées basses en énergie. Par opposition, un ion mou est volumineux, à faible densité de charge, polarisable et a des orbitales hautes occupées hautes en énergie. Pour les halogénures par exemple, l'échelle de dureté croissante est la suivante : I^- (mou) < Br^- < Cl^- < F^- (dur). Pearson *et coll.* (1965, 1967) ont mis en évidence un phénomène d'association préférentielle, les ions de même nature favorisant leur combinaison. Ainsi les ions durs s'associent plus facilement avec des ions durs (favorisant les interactions coulombiennes), et réciproquement pour les ions mous (favorisant les interactions orbitalaires).

La polarisation, et donc la délocalisation possible des charges, joue un rôle majeur dans le résultat final de la paire d'ions. Cette polarisation est liée à la nature de la molécule ionisée (hydrophobie, charge, polarité, solubilité), du contre-ion (taille moléculaire, distance de séparation…), du solvant (constante diélectrique, polarité). Ces concepts de solvatation des différentes formes de paires d'ions, spécifiques à leur environnement, furent ensuite confirmés par des études en spectroscopies infrarouge et R.M.N. (Szwarc, 1970).

Tous ces paramètres mènent donc à une grande variété possible de paires d'ions, allant de la plus intime à une paire d'ions lâche. Les acides et bases durs et mous sont identifiés de façon empirique par la variation de la stabilité des complexes qu'ils forment. D'après la théorie de Pearson (1967) appliquée aux composés organiques, les groupements caractéristiques des peptides, R-COOH et R-NH_2 notamment, sont classés dans la catégorie des ions durs.

1.2.3.2.2. Extraction assistée par paires d'ions

La question de la formation des paires d'ions peut se poser en milieu aqueux, car selon la théorie de Bjerrum, les solvants permettant la formation des paires d'ions doivent avoir une faible constante diélectrique. Les précisions apportées par la suite à ses théories ont montré que la formation de paires d'ions en milieux aqueux ou en milieu fortement structuré est possible quand les ions impliqués sont relativement hydrophobes. La paire d'ions est alors mise en relation plus par un effet de « répulsion » par le solvant que par des interactions électrostatiques (Lee et Kim, 1987 ; Florence et Attwood, 1988). Le terme de paire d'ions « water structure enforced » fut employé par Diamond (1963) pour expliquer l'existence de paires d'ions en milieu aqueux. La paire d'ions est alors due à un mélange d'interactions électrostatiques et hydrophobes, visant à minimiser la perturbation structurale et maximiser les interactions eau-eau, les contributions de l'ion et du contre-ion à chacun des phénomènes dépendant de la structure de chacun. La formation de paires d'ions en milieu aqueux est donc possible mais subit beaucoup de contraintes, ce qui au final n'en conduisent l'existence qu'à de très faibles concentrations, car au-dessus d'un certain seuil, des agrégats colloïdaux se forment (Freiser (1969 et 1972) ; Lee et Kim (1987)).

La phase aqueuse est ensuite mise en contact avec un solvant organique en vue d'une extraction. Les ions et paires d'ions formés ont alors de multiples possibilités d'interactions avec leur environnement comme le montre la figure 4 (Bult, 1983) : les ions A^+ et B^- peuvent interagir indépendamment avec les ions H^+ et OH^- du milieu aqueux et avec *n* molécules X du solvant organique. Un équilibre se crée en leurs présences, seuls ou associés sous différentes formes, entre les phases aqueuse et organique en fonction de leurs affinités respectives.

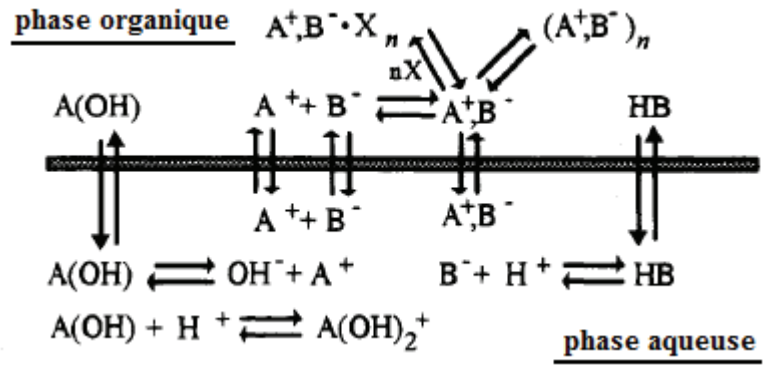


Figure 4. Représentation schématique des réactions parallèles impliquées dans une extraction assistée par paires d'ions dans un système biphasique (Bult, 1983).

L'extraction peut être régulée par le contrôle de la nature et de la concentration du contre-ion et par la nature du solvant organique. Différentes stratégies peuvent donc être étudiées pour exploiter les propriétés des intervenants.

Le solvant est un choix à part entière pour influencer le degré d'extraction. Les solvants chlorés (chloroforme, dichlorométhane) sont très utilisés car ils possèdent une faible constante diélectrique, leur capacité à extraire des anions en tant qu'acide est réduite et ils ont peu d'incidence sur la dissociation ou la polymérisation des paires d'ions. Cependant, quand une faible extraction est observée, due à une trop forte hydrophilie du complexe formé par la paire d'ions, il est recommandé d'introduire des solvants plus polaires, tels que des alcools (Modin et Schröder-Nielsen, 1971). Des exceptions existent, comme le montrent les travaux de Ivashkiv (1975), où l'extraction de peptide dans le chloroforme est possible grâce à des conditions très particulières. Ici, un octapeptide cyclique fut extrait grâce à des paires d'ions et son exceptionnelle faible solubilité dans l'eau.

Des extractions des acides aminés Trp et Trp-Leu dans différents solvants (chloroforme à propylène carbonate), pour différents contre-ions (sulfate, nitrate et chlorure) à pH 1 montrent qu'une augmentation de la constante diélectrique du solvant augmente le degré d'extraction. De manière générale, l'extraction augmente avec l'augmentation de l'hydrophobie du contre-ion (nitrate > chlorure > sulfate) (Murthy et Zografi, 1970 ; Carbon *et coll.*, 1978).

La nature du contre-ion, sa concentration dans la phase aqueuse jouent également un rôle prépondérant dans l'extraction de peptides assistée par paires d'ions. Drapala *et coll.* (2001) sont parvenus à extraire des di- et tri-peptides sous leur forme anionique à la seule force motrice assurée par un gradient de concentration du contre-ion entre une phase aqueuse donneuse et une phase aqueuse réceptrice, elles-mêmes séparées par un solvant.

Akamatsu *et coll.* (1989) montrèrent que l'utilisation d'ions inorganiques en solution permettait une meilleure extraction de di- et tri-peptides dans la phase organique constituée

d'octan-1-ol. D'après ces travaux, la réciproque dit que pour un même contre-ion, l'acide aminé sera plus extrait s'il est entouré d'acides aminés hydrophobes (Trp > Phe > Leu > Ala). On pourrait alors prédire un degré d'extraction en combinant ces données, via la table établie par Zaslavsky *et coll*. (1982) qui échelonne les chaînes adjacentes d'acides aminés selon leur hydrophobie.

Adjei *et coll.* (1993) ont mené une étude du coefficient de partage du leuprolide acétate, un nonapeptide avec de multiples sites ionisables, dans des systèmes eau/octan-1-ol pour différents pH et différents contre-ions. Les résultats montrent une augmentation de l'extraction avec l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée de l'agent formateur de paire d'ions, des alkyl sulfonates ayant entre 6 et 10 carbones.

Des études d'extraction assistée par paires d'ions, où un agent formateur de paires d'ions est ajouté à la phase aqueuse se sont développées, mais dans des systèmes triphasiques (pertraction), où, après que le complexe agent surfactant-protéine (ou -peptide) fut extrait dans le solvant organique, il était dissocié dans une seconde phase aqueuse de récupération. La première étape de ce procédé, l'extraction dans le solvant organique, nous intéresse directement car elle correspond au même procédé d'extraction que nous souhaitons étudier.

Bromberg et Klibanov (1994) étudièrent le comportement en extraction de plusieurs protéines (lysozyme, BSA…) pour différents agents de transport (alkyls sulfonates, SDS…) et différentes phases organiques (dichlorométhane, nitrobenzène…) dans un système à tube en U. Les concentrations supérieures à la concentration micellaire critique des différents agents entraînaient des taux d'extraction plus faibles qu'avec des concentrations en-dessous de la C.M.C.. Cette étude a permis aux auteurs de conclure au rôle majeur des agents formateurs de paires d'ions libres en solution plutôt que sous forme d'agrégats micellaires.

Ce système d'extraction liquide-liquide assistée par paires d'ions peut encore évoluer : l'ajout d'une membrane d'ultrafiltration par exemple permettrait de stabiliser l'interface en plus d'apporter ses avantages propres tels qu'une sélectivité supplémentaire (seuil de coupure, nature du matériau membranaire…) ou une plus grande surface d'échange.

1.2.3.3. L'extraction en systèmes biphasiques eau-solvants organiques supportés par une membrane

Le couplage d'un système membranaire avec un système d'extraction biphasique est illustré par la figure 5. Il permet à une des deux phases liquides, présentant une plus grande affinité avec le matériau de la membrane, d'être supportée et de fixer l'interface d'échange au niveau des pores.

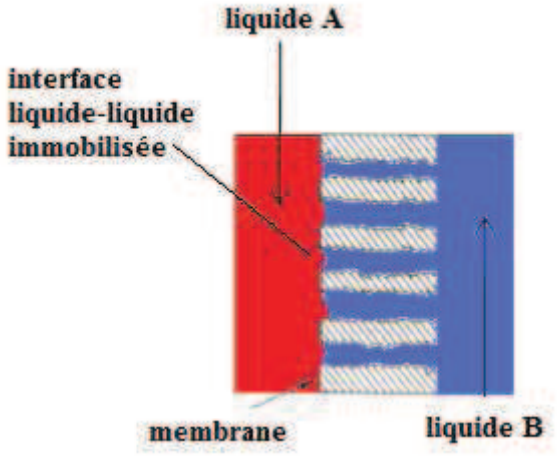


Figure 5. Représentation schématique du comportement des deux phases liquides à l'interface d'un contacteur à membrane (inspiré de Karoor et Sirkar, 1993).

Les travaux de Pierre *et coll.* (2002) illustrent bien le procédé mis en jeu ici : l'extraction liquide-liquide de composés aromatiques soufrés fut étudiée d'une phase aqueuse vers des solvants organiques (de l'hexane ou du miglyol®, un mélange de triglycérides), l'interface étant supportée par un contacteur à membrane en polypropylène. La comparaison des deux solvants mit en avant qu'une plus faible viscosité de celui-ci favorisait le transfert, le régime d'écoulement dans les pores de la membrane étant le facteur limitant de l'échange.

Léon *et coll.* (2004) ont voulu étudier, à travers un système de membrane liquide supportée où de l'octan-1-ol servait de phase organique, l'influence des propriétés physico-chimiques de leur système sur l'extraction. Des solutions modèles comprenant des tri-peptides servaient de solutions d'extraction, auxquelles un agent formateur de paires d'ions, l'heptane-sulfonate, était ajouté. L'hydrophobie du peptide jouait un rôle majeur dans son extraction, ainsi que la présence de sites chargés positivement, favorisant la formation de paires d'ions avec l'agent.

Ces membranes supportées sont avantageuses pour plusieurs raisons : la sélectivité est modulable en fonction des différents paramètres physico-chimiques à choisir (pH, composition des phases aqueuses et organique, nature du matériau…), les vitesses de transport de liquide dans les membranes peuvent être relativement importantes, l'échelle de travail peut être importante… Cependant des limites existent, l'instabilité de l'interface membranaire arrivant en premier lieu. Des pertes dues à des variations de débits ou à la solubilité du solvant dans la phase aqueuse par exemple peuvent amener des fuites d'une phase dans l'autre (Drapala et Wieczorek, 2002).

Voici donc à travers ces exemples d'extraction sélective grâce à des membranes et/ou des solvants, des procédés membranaires qui associent des critères de sélection liés aux propriétés des interfaces chimiques et physiques. De nombreuses variantes sont envisageables tant les paramètres (matériel, conditions opératoires…) sont nombreux. Cependant, à notre connaissance, aucune étude faisant appel aux paires d'ions en phase aqueuse n'a été réalisée

sur l'extraction de peptides actifs issus d'un mélange complexe à partir d'hydrolysats enzymatiques de protéines vers une phase organique.

1.2.3.4. La séparation par moussage

Les études sur les protéines mettant en avant leurs propriétés tensioactives et leur intérêt sont nombreuses (Damodaran, 1997) : formulation de glaces, alimentation infantile et fonctionnelle… De nombreuses études traitent des propriétés, du pouvoir moussant des protéines et plus récemment, des peptides. Mais très peu de travaux abordent un procédé d'extraction de peptides en tant que tel.

Les propriétés moussantes

Les travaux sur les protéines couvrent un large champ de possibilités d'études, les paramètres physico-chimiques, du montage, etc. étant nombreux. Ibanoglu et Karatas (2001) ont étudié le comportement de la mousse de protéines de lait pour différentes valeurs de pH comprises entre 5 et 7. Les protéines, concentrées à 1 % (p/v) dans une solution de tampon phosphate (50 mM), présentaient une meilleure capacité moussante et une mousse plus stable aux pH proches de 7. Ils notèrent également l'apparition d'agrégats autour du point isoélectrique de la molécule vers le pH 5, ce qui réduisait ses propriétés moussantes.

Glaser *et coll.* (2007) ont étudié les propriétés moussantes de plusieurs ratios d'un mélange BSA:protamine aux pH 3, 5 et 7. La protamine seule ne présentait pas de propriétés moussantes par elle-même, mais le mélange avec le BSA donnait de meilleurs résultats qu'avec ce dernier seul. A travers des analyses de potentiel zeta, de turbidité, de viscosité et de taille de bulles, ils mirent en évidence que l'association BSA-protamine par des interactions électrostatiques modifiait la charge globale du complexe : l'ensemble, moins chargé, se stabilisait à l'interface et ralentissait le drainage.

Les études portant sur les peptides se sont plus récemment développées : Larré *et coll.* (2006) ont comparé les propriétés moussantes de plusieurs hydrolysats de graines de colza pour différents pH. Les hydrolysats issus d'une hydrolyse chimique basique et d'une hydrolyse pepsique présentaient des populations peptidiques différentes (taille des peptides variant de 26 à 4 kDa en fonction du degré d'hydrolyse, entre 2 et 12 %), mais leurs propriétés moussantes étaient optimales dès un degré d'hydrolyse de 3 % dans les deux cas. Aux différentes valeurs de pH testées (3, 7 et 8,5), la mousse formée était stable dans le temps mais présentait un drainage plus lent au pH acide. Rodriguez-Patino *et coll.* (2007) ont étudié également les propriétés moussantes des hydrolysats de différents degrés d'hydrolyse (5,6, 23,5 et 45,3 %), mais issus de tournesol, en fonction de leur concentration. L'augmentation de la concentration en hydrolysat entrainait une augmentation de la capacité à mousser et permettait d'avoir une mousse plus stable.

Les études portant sur les propriétés moussantes restent encore peu nombreuses sur des solutions peptidiques mais présentent des potentialités intéressantes pour des études de

systèmes d'extraction sélective grâce à la relation entre leurs propriétés tensioactives et leur conditionnement physico-chimique.

L'extraction par moussage

Grâce aux propriétés tensioactives des protéines et des peptides, les procédés d'extraction sélective basée sur un principe de moussage se posent maintenant comme une alternative intéressante face à des méthodes de dialyse, de « salting-out » ou d'ultrafiltration.

Les montages d'extraction par moussage se présentent généralement sur le modèle présenté par la figure 6 (Darton *et coll*., 2004), et dans le cas d'un procédé continu, une alimentation en solution initiale est ajoutée à la colonne de moussage.

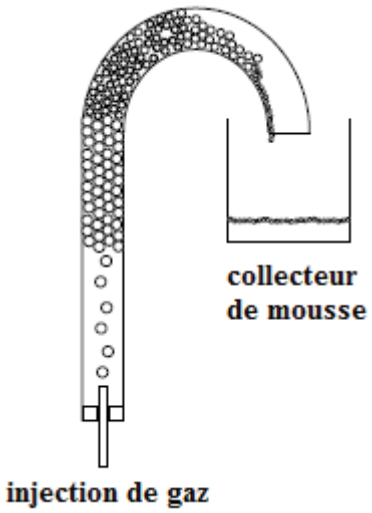


Figure 6. Exemple schématique d'un montage d'extraction par moussage (Darton et coll., 2004).

Gerken *et coll.* (2006) ont mis en œuvre un procédé d'extraction continu de mousse pour extraire la laccase C d'un mélange complexe de fermentat. L'étude de la position de l'alimentation en solution initiale, le débit d'air et la concentration en agent surfactant ont mis en évidence les avantages d'un tel procédé comme la bonne sélectivité (enrichissement multiplié par 11 dans la solution finale) et le bon rendement d'extraction (supérieur à 70 %) du produit tout en conservant ses propriétés fonctionnelles.

Des technologies innovantes se développent dans ce domaine : Darton *et coll*. (2004) ont étudié un procédé d'extraction par moussage multi-étagé via différents paramètres tels que la hauteur d'entrée de la solution d'alimentation, son débit, pour permettre l'extraction de solutés acides grâce à des agents surfactants cationiques. Ils annoncent des applications possibles dans le traitement de l'eau ou l'extraction de protéines. Mais les études d'extractions, appliquées justement au fractionnement des protéines ou des peptides, restent rares.

Conclusion

Les procédés d'extraction à base d'agents formateurs de paires d'ions en milieu biphasique, de mousses, de membranes, d'électrodialyse ainsi que leurs combinaisons suscitent un intérêt croissant. L'innovation joue un rôle majeur dans la découverte de nouveaux moyens de séparation et purification des molécules actives, pour extraire de manière toujours plus sélective, à moindre cout, tout en conservant les propriétés fonctionnelles de ces molécules. C'est dans ce contexte que nous proposons de développer notre étude sur différents procédés innovants, qui peuvent intervenir de manières variées sur les paramètres physico-chimiques des peptides en vue d'extractions spécifiques.

2. Objectifs de travail

Notre objectif ici est de réussir à extraire sélectivement et de manière efficace des peptides actifs ou des fractions contenant de tels peptides grâce à des procédés couplés. Pour cela nous travaillerons avec des hydrolysats d'hémoglobine bovine qui sont particulièrement bien caractérisés. En travaillant sur les paramètres physico-chimiques impliqués spécifiquement dans chaque système, nous avons étudié les phénomènes d'interactions menant à une extraction sélective des peptides ciblés. Les différents procédés étudiés sont les suivants : un système d'extraction biphasique eau/solvants organiques assistée par un agent formateur de paires d'ions ensuite associé à un contacteur à membrane, un système de fractionnement par moussage-drainage et un système associant l'électrodialyse à des membranes d'ultrafiltration (figure 7).

Tout d'abord, l'étude porta donc sur un procédé d'extraction biphasique eau/solvants organiques assistée par un agent formateur de paires d'ions. Ce système base son principe d'extraction sur plusieurs paramètres physico-chimiques : l'affinité des peptides, ou le coefficient de partage entre un solvant organique et une phase aqueuse et l'hydrophobie de ceux-ci, pouvant être renforcée par la formation de paires d'ions (masquage des charges diminuant l'hydrophilie de l'association et ajout d'une partie hydrophobe). Ici, l'extraction des peptides opioïdes hydrophobes que sont les hémorphines LVVh-7 et VVh-7 nous servit de traceurs.

Plusieurs paramètres furent préalablement étudiés : le choix du solvant d'extraction, de l'agent formateur de paires d'ions et du pH initial de la phase aqueuse. Une fois le système de départ maîtrisé, l'extraction assistée par l'agent formateur de paires d'ions fut alors étudiée suivant différents paramètres : l'influence de la polarité des solvants choisis fut étudiée ainsi que celle des variations du pH de la phase aqueuse, le tout en fonction de la longueur de la chaîne carbonée de l'agent choisi. Cette étude en microréacteur (les volumes totaux étaient inférieurs à 1 mL) servit de base au travail suivant, où l'échelle du système d'extraction fut augmentée via l'ajout d'un module membranaire d'ultrafiltration qui servit d'interface entre les deux phases liquides. L'étude en extraction à contre-courant fut menée sur des membranes en polyethersulfone (PES) et polysulfone (PS) d'un même seuil de coupure de 10 kDa à partir d'un hydrolysat partiellement décoloré.

Dans un deuxième temps, un système de fractionnement par moussage-drainage fut développé au sein du laboratoire. La séparation envisagée dans ce procédé se fonde sur les différences de propriétés tensioactives des peptides en fonction de leur nature (taille moléculaire, séquence en acides aminés induisant une certaine hydrophobie…) et de leur conditionnement (peptides chargés différemment en fonction du pH par exemple), afin de travailler sur leur capacité à être et rester adsorbés à l'interface eau/air.

Les choix de conditions initiales de concentration en hydrolysat, de pH et des propriétés tensioactives du système furent étudiés avant de passer à l'étude de sa mise en œuvre. La fraction collectée fut caractérisée par des essais microbiologiques révélant une

fraction peptidique aux propriétés antimicrobiennes. Les paramètres physico-chimiques intervenant lors de ce procédé sont très nombreux, et l'utilisation de plans d'expériences permit de mettre en évidence quels sont ceux qui sont les plus influents.

Finalement, un système associant l'électrodialyse à des membranes d'ultrafiltration fut étudié. Se basant sur une différence de potentiel comme seule force motrice de migration, la charge des peptides fut le premier critère de sélectivité. La présence de membranes d'ultrafiltration introduisit un second critère pour la migration des peptides : la taille moléculaire, par son seuil de coupure, et ses possibilités d'interactions lors de la migration.

L'extraction de peptides issus d'hydrolysats bruts et décolorés fut suivie par conductimétrie. Les solutions issues des compartiments de récupération furent analysées par BCA, C.L.H.P.-P.I. et spectrométrie de masse, pour estimer le transfert des peptides quantitativement et qualitativement. Un protocole de désorption fut ensuite appliqué aux membranes d'ultrafiltration, dont l'intégrité fut évaluée par la mesure du colmatage grâce au relevé des potentiels d'écoulement comparativement à ceux relevés avant désorption.

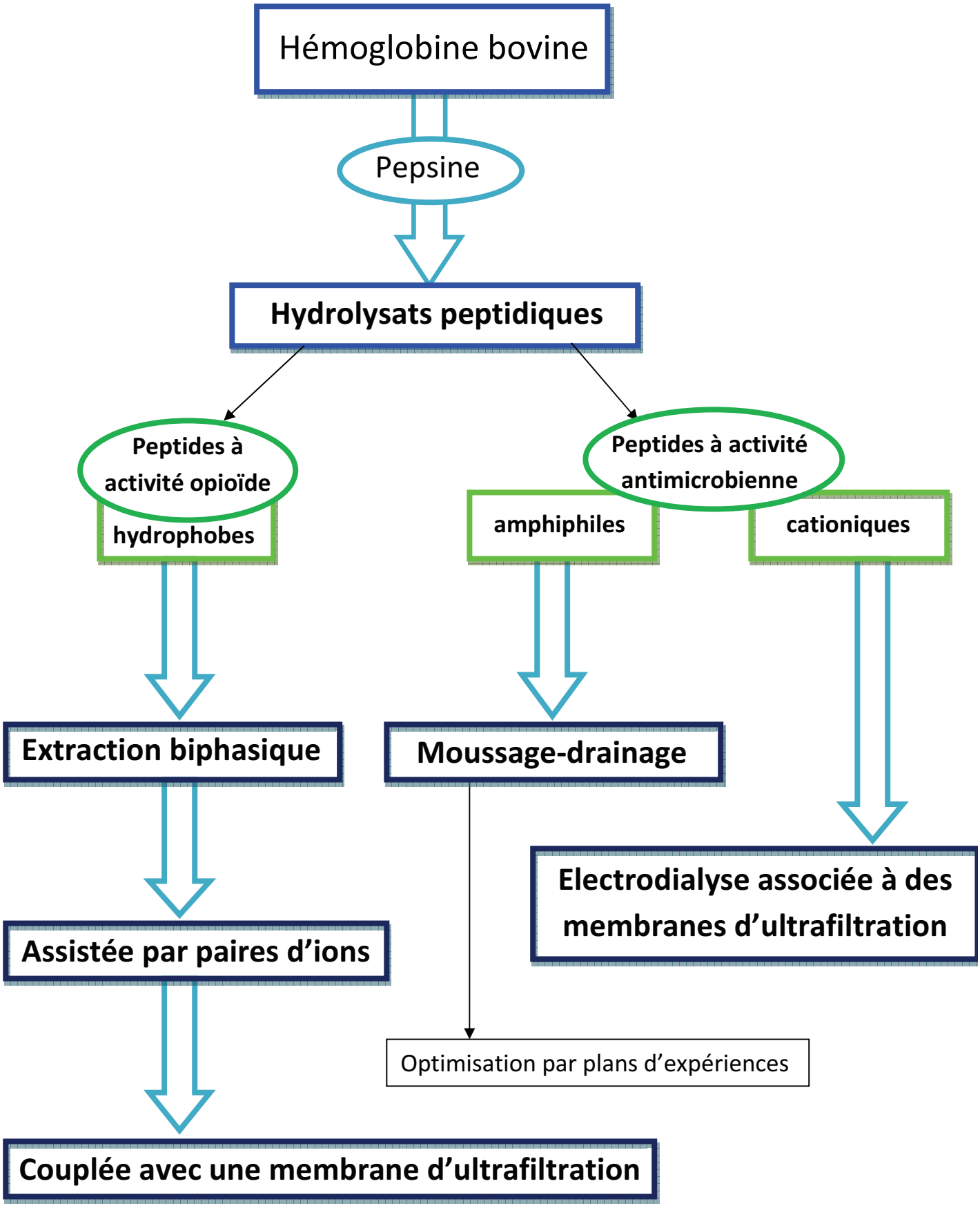


Figure 7. Synoptique de l'étude réalisée sur les procédés d'extraction sélective des peptides opioïdes et antimicrobiens issus de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine.

Chapitre II
Matériels et méthodes

Ce chapitre de Matériels et Méthodes se présente comme suit : les techniques et protocoles communs à tous les procédés innovants étudiés sont regroupés dans ce chapitre II. Dans le chapitre III de Résultats et Discussions, chacune des trois parties, consacrée à un procédé couplé, débutera par une section de Matériels et Méthodes spécifiques à ce procédé.

1. Préparation des hydrolysats peptidiques

1.1. Dosage de l'hémoglobine

10 g d'hémoglobine (cruor de bœuf en poudre spray, lot B 05.38.02, VEPRO 95 BHS PS PE) en poudre sont dissous dans de l'eau distillée. Cette solution concentrée est ensuite centrifugée pendant 20 minutes à 4000 tours/min afin d'éliminer la fraction insoluble. La concentration exacte du surnageant est alors déterminée par la méthode décrite par Crosby *et coll.* (1954). Les solutions d'hémoglobine utilisées ensuite pour les hydrolyses ont été réalisées par dilution de cette solution mère concentrée.

Principe

En présence de cyanures et de ferricyanures (réactif de DRABKIN), l'hémoglobine se transforme en cyanométhémoglobine stable qui présente un maximum d'absorption visible à 546 nm.

Mode opératoire

- 50 µl de la solution d'hémoglobine à doser sont ajoutés à 12,5 ml de réactif de DRABKIN (phosphate monopotassique 1 mM, cyanure de potassium 0,75 mM et ferricyanure de potassium 0,6 mM en solution aqueuse).
- Après 10 minutes de réaction à température ambiante, l'absorbance (A) de l'échantillon est lue à 546 nm contre le réactif de DRABKIN.

Sachant qu'une solution standard d'hémoglobine à 14,7 % (p/v) donne une A de 0,4 par cette méthode, la concentration en hémoglobine Y de la solution à doser est obtenue en % (p/v) par la relation suivante (équation 1) :

$$Y = \frac{14,7 \times A}{0,4} \text{ g/100 ml} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

1.2. Dénaturation par l'urée

Solution d'hémoglobine à 2 % dénaturée par l'urée à pH 2

A partir de la solution d'hémoglobine de concentration Y, prendre un volume V contenant 5 g d'hémoglobine et l'ajouter à une solution de 80 g d'urée dans (80 – V) ml d'eau. Après incubation à 37 °C pendant une heure, 50 ml de tampon HCl / KCl à 0,25 M pH

2 sont ajoutés. Le pH est ajusté à 2 avec une solution d'acide chlorhydrique concentrée et le volume de la solution est ajusté à 250 ml avec de l'eau.

1.3. Dosage de l'activité de la pepsine

Solutions

Le dosage de l'activité enzymatique de la pepsine s'effectue par un dosage photospectrométrique à 280 nm. Une solution mère de pepsine est préparée en mélangeant 56 mg de pepsine de porc (E.C. 3.4.23.1; 3450 U.A.E./mg de solide) dans 20 ml de tampon acide acétique / acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5. Pour doser son activité enzymatique, une dilution de la solution mère de pepsine est effectuée au 200ème dans de l'eau distillée.

Protocole de dosage

Une solution d'hémoglobine à 2 % (p/v) dénaturée à l'urée (pH 2) et une solution diluée de pepsine sont équilibrées à 37 °C. Les essais sont réalisés en ajoutant 5 mL d'hémoglobine à 1 ml de pepsine diluée. Après agitation, ce mélange est mis à incuber 10 min exactement à 37 °C. La réaction est arrêtée par ajout de 10 ml de TCA 5%. Un échantillon témoin est réalisé : 10 ml de TCA 5% sont ajoutés à 1 ml de pepsine diluée, puis 5 ml d'hémoglobine, avant la mise en incubation.

L'ensemble est ensuite laissé 30 minutes à température ambiante. Les solutions sont centrifugées à 4000 trs/min pendant 15 minutes, puis le surnageant est filtré sur un filtre en acétate de cellulose de 0,22 µm. l'absorbance des solutions est lue à 280 nm avec le témoin comme référence.

Une unité d'activité enzymatique (U.A.) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à provoquer une augmentation ΔA d'absorbance à 280 nm de 0,001/min avec un trajet optique de 1 cm. La solution de pepsine concentrée contient donc (équation 2) :

$$\frac{\Delta 280nm}{10} \bullet 1000 \bullet 200 \text{ U.A./mL}$$

$$\text{soit } \text{U.A./mL} \bullet \frac{\text{volume de la solution}}{\text{masse pesée}} = \text{U.A./ mg de pepsine} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

1.4. Hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine

L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine est effectuée à 23 °C et maintenue à pH constant par ajout de HCl 1 M. La solution d'hémoglobine (2 %, p/v) est incubée avec la pepsine porcine (E/S = 2,5 %, p/p) pendant 2,5 minutes, 10 heures ou 120 heures. La réaction de la pepsine est stoppée par l'augmentation du pH à 10 par ajout de soude 5 M, ce qui a pour effet de dénaturer la pepsine.

1.5. Détermination du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (D.H.) est défini par le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre total de liaisons. Le degré d'hydrolyse est déterminé par la méthode au sulfonate trinitrobenzène (Adler-Nissen, 1978). Des hydrolyses d'une durée de 2,5 minutes, 10 et 120 heures par la pepsine correspondent à des D.H. de 3, 15 et 23% respectivement.

1.6. Protocoles de décoloration des hydrolysats peptidiques

1.6.1. Décoloration par précipitation au pH

Le principe est de décolorer (retirer l'hème) les hydrolysats peptidiques en amenant la solution au pHi des peptides supportant l'hème en solution afin de précipiter ces associations hème-peptides. Une gamme étalon est réalisée à différents pH pour déterminer le minimum d'absorption à λ = 394 nm. Le pH optimal (~5) est ensuite appliqué à l'hydrolysat de D.H. 3% à décolorer en ajoutant lentement du HCl 0,1 M. La solution est enfin centrifugée 10 min à 4000 trs/min afin d'en récupérer le surnageant.

1.6.2. Décoloration par membrane d'ultrafiltration

Les hydrolysats peptidiques d'hémoglobine bovine sont filtrés sur une membrane d'ultrafiltration en polyethersulfone (PES) d'un seuil de coupure 10 kDa (GE Healthcare, France) selon la méthode décrite dans Dhulster *et coll.* (2002). Les complexes hème-peptides présents en solution et d'une taille moléculaire relativement élevée, sont retenus par l'interface membranaire d'un seuil de coupure adapté.

2. Méthodes d'analyse

2.1. Analyse des peptides par C.L.H.P. de phase inverse (P.I.)

L'appareillage de C.L.H.P. analytique est constitué d'une pompe Waters^{TM} 600 (Waters, Saint-quentin, France), d'un détecteur à barette de diodes Waters 996 et d'un injecteur automatique Waters 717. La séparation des peptides est réalisée en phase inverse sur colonne Vydac C4 (0,46 × 25 cm) (Hesperia, CA, Etats-unis). La phase mobile est constituée d'un éluant A, composé d'eau et de TFA dans des proportions 100/0,1 (v/v), et d'un éluant B, composé d'acétonitrile, d'eau et de TFA dans des proportions 60/40/0,1 (v/v/v). La séparation est réalisée avec un gradient d'élution linéaire de 0 à 67% d'éluant B sur les 30 premières minutes, puis de 67 à 87% les 35 minutes suivantes. Les peptides sont détectés à 215 nm.

2.2. Couplage en spectrométrie de masse E.S.I.

L'analyse des peptides par E.S.I./S.M. a été effectuée avec un spectromètre de masse de type Electrospray-triple quadripôle Quattro II (Micromass, Altrincham, Royaume-Uni) avec ionisation positive. La procédure expérimentale d'analyse des hydrolysats peptidiques par couplage C.L.H.P.-SM a été réalisée selon Froidevaux *et coll.* (2009).

Les hydrolysats correspondant aux D.H. de 3, 15 et 23 % furent analysés par C.L.H.P.-P.I. couplée à l'E.S.I.-S.M.. La répartition en taille moléculaire de leur population peptidique est présentée par la figure 8.

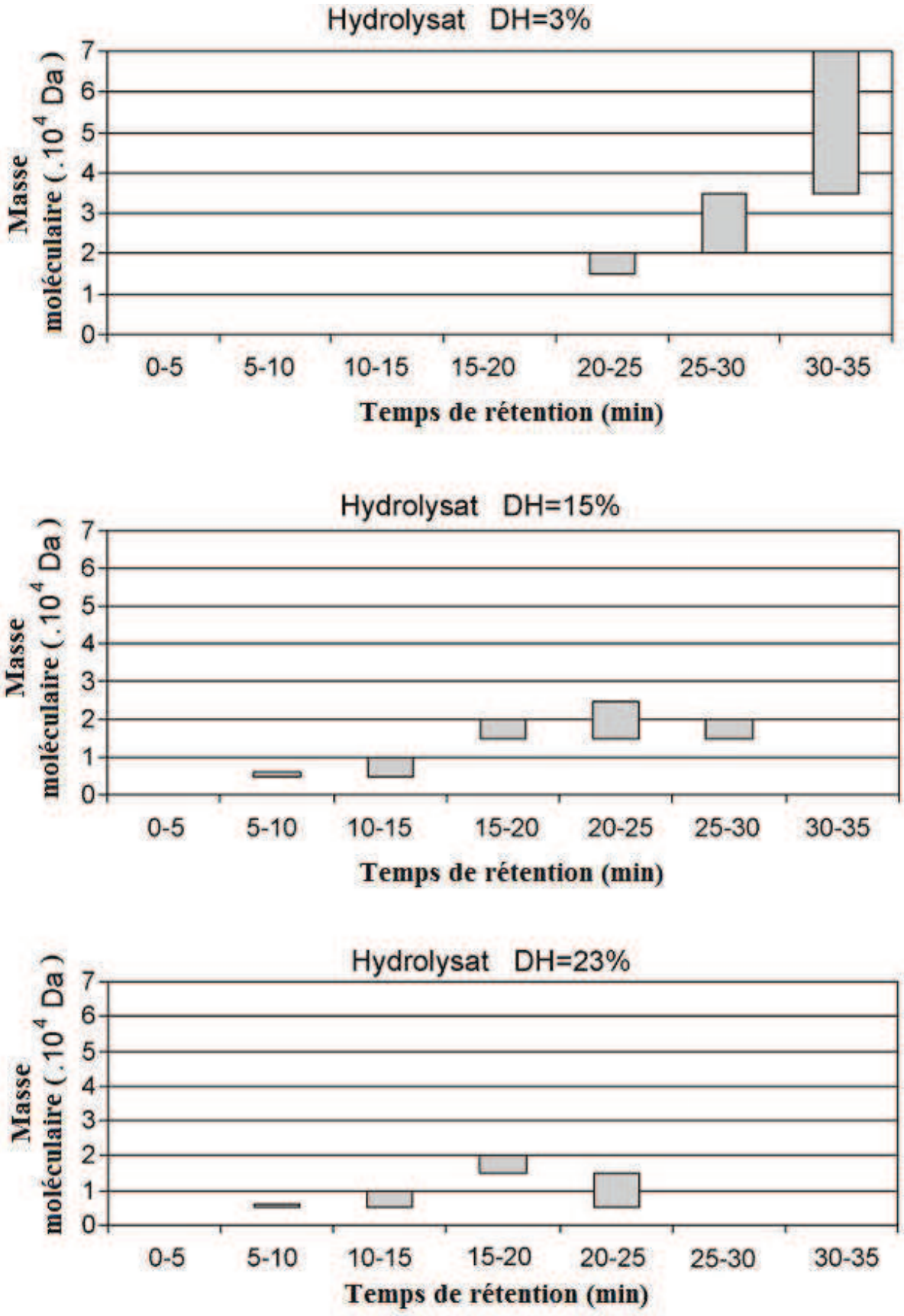


Figure 8. Profil de distribution des tailles moléculaires des hydrolysats peptidiques de D.H. 3, 15 et 23 % en fonction de leur temps de rétention en C.L.H.P.- PI.

2.3. Mesures de tension interfaciale liquide-gaz

L'hémoglobine et les hydrolysats, à des concentrations variables en fonction de l'expérience, ont été dilués dans une solution de tampon phosphate 100 mM à pH = 7,0 et les mesures de tension à l'interface liquide-gaz ont été mesurés par tensiométrie à goutte pendante avec l'appareil Kruss DSA-10 (Hambourg, Allemagne), après stabilisation (35 à 45 min) ou par la méthode de Du Noüy (anneau).

2.4. Quantification des hémorphines et de l'hème

L'identification et la quantification des hémorphines et de l'hème dans les phases organiques ont été effectuées par comparaison des courbes standards de spectre UV avec le logiciel Millenium® (société Waters), comme décrit précédemment par Froidevaux *et coll.* (2008).

2.5. Détermination des enrichissements et rendements d'extraction

Le ratio d'enrichissement (ER) et le rendement d'extraction (R) des peptides étaient les réponses utilisées pour analyser les expériences.

L'ER en hémorphine était calculé en utilisant l'équation 3 :

$$ER = \frac{(\text{pourcentage d'hémorphine dans la phase organique})_{final}}{(\text{pourcentage d'hémorphine dans la phase aqueuse})_{initial}} \quad \text{(Eq. 3)}$$

où le terme « (pourcentage d'hémorphine dans la phase organique)$_{final}$ » correspond au rapport entre l'aire de la fraction extraite contenant l'hémorphine et l'aire totale de toutes les fractions peptidiques extraites, et le terme « (pourcentage d'hémorphine dans la phase aqueuse)$_{initial}$ » correspond au rapport entre l'aire de la fraction contenant l'hémorphine dans l'hydrolysat initial et l'aire totale de toutes les fractions peptidiques dans cet hydrolysat. Les aires des fractions ont été obtenues grâce au logiciel Millenium®. Le rendement d'extraction en hémorphine (%) a été calculé en utilisant l'équation (4):

$$R = \frac{[(C_{h)\ final}]_O}{[(C_{h)\ initial}]_A} \bullet \frac{V_O}{V_A} \bullet 100 \quad \text{(Eq. 4)}$$

où $[(C_{h)\ final}]_O$ était la concentration en hémorphine dans la phase organique à la fin de l'extraction assistée par paire d'ions, $[(C_{h)\ initial}]_A$ était la concentration en hémorphine dans la phase aqueuse avant l'extraction et V_O et V_A étaient respectivement les volumes de phase

organique et aqueuse (dans nos expériences les volumes sont égaux). Les concentrations étaient déterminées à partir d'étalon préalablement réalisés.

Le facteur d'enrichissement était une évaluation de la sélectivité du système d'extraction car il définit le degré de purification de l'hémorphine extraite dans la phase organique.

Chapitre III
Résultats et discussion

A. Extraction liquide-liquide de peptides assistée par paires d'ions

La mise en œuvre de ce système repose sur le principe de partage de solutés entre différentes phases en fonction de leur affinité. Ainsi la mise en contact de deux phases liquides non-miscibles permet aux peptides présents dans la phase aqueuse initiale, l'hydrolysat, un transfert vers la phase organique jusqu'à ce qu'un équilibre se mette en place.

Notre but, dans cette première section, était d'extraire sélectivement des peptides ou fraction peptidiques en milieu acide en exploitant différentes propriétés physico-chimiques liées à ce système. Travailler sur l'hydrophobie des peptides permettrait de modifier leur affinité pour le solvant organique. Ainsi l'ajout d'un agent formateur de paires d'ions anionique en solution aurait un double effet : masquer les charges des peptides cationiques, ce qui diminuerait l'hydrophilie de l'association, et ajouter une partie hydrophobe, ce qui en augmenterait l'hydrophobie. Le choix de plusieurs conditions de travail, notamment l'intérêt d'une extraction en milieu acide, découlent d'un objectif à plus long terme, où ce procédé serait amené à extraire de manière continue les peptides ou fraction peptidiques d'intérêt (la pepsine est plus active aux pH acides).

Les peptides opioïdes hydrophobes comme la LVV-hémorphine-7 (de séquence en acides aminés : LVVYPWTQRF) et la VV-hémorphine-7 (de séquence : VVYPWTQRF) peuvent être extraits par des solvants organiques (Zhao et Piot, 1998, Froidevaux *et coll*., 2001). Ils nous serviront de référence aux cours des expériences pour en évaluer l'efficacité en termes de rendement d'extraction et d'enrichissement.

Dans un premier temps, une étude préliminaire des conditions opératoires fut menée pour déterminer le choix des solvants organiques : l'octan-1-ol et le dichlorométhane (DCM). Les agents alkyl-sulfonates furent analysés par mesures de tensions interfaciales seuls en milieu aqueux, puis avec les hydrolysats de D.H. 3 et 15 %, aux pH 3 et 7. Des extractions témoins en milieu biphasique furent menées en octan-1-ol sans agent formateur de paires d'ions.

Ensuite l'extraction liquide-liquide assistée par paires d'ions dans le milieu biphasique fut mise en œuvre. L'influence du solvant fut étudiée en fonction de la polarité, l'octan-1-ol étant plus polaire que le DCM, pour différents ratio de mélange de ces deux solvants. L'ajout d'alkyl sulfonates, avec différentes longueurs de chaînes carbonées, à deux systèmes octan-1-ol/DCM permit d'étudier l'impact de l'agent sur l'extraction. L'étude de l'influence du pH, variant de 3 à 10, toujours pour plusieurs longueurs de chaînes carbonées, mit en évidence le compromis sélectivité/rendement obtenu lors des extractions en fonction des conditions.

Enfin l'ajout d'une membrane d'ultrafiltration au système biphasique, supportant l'interface, permit une montée en échelle. Des expériences témoins furent menées pour déterminer l'impact de la membrane seule sur un hydrolysat partiellement décoloré. Deux types de membrane furent étudiés en extraction, l'une en polysulfone et l'autre en polyethersulfone, d'un seuil de coupure identique de 10 kDa.

1. Matériels et méthodes spécifiques

1.1. Extraction liquide/liquide d'hémorphines

1.1.1. Sans agent formateur de paires d'ions

L'extraction de peptides a été réalisée dans un système biphasique liquide-liquide, avec des phases aqueuses et organiques à volumes égaux (400µL). La phase aqueuse contient les hydrolysats de D.H. 3 ou 15% (1%, p/v) en présence d'une solution de phosphate de sodium à 50 mM de manière à maintenir une force ionique constante pendant l'extraction. Le pH fut ajusté entre 3 et 10 grâce à des solutions de HCl ou NaOH 2 M. Aux pH inférieurs à 2, l'hème présent dans l'hydrolysat précipite immédiatement entraînant ainsi une perte de peptides en solution. La phase organique est composée d'octan-1-ol. L'extraction a été réalisée à température ambiante pendant 12 heures (des études préliminaires ont montré qu'il n'y avait aucune différence entre 6 et 24 heures) sur une SB3 Rotator (Stuart®, Nemours, France) à 17 tours/minute. Après extraction, l'échantillon a été centrifugé à 5000 tr/min pendant 10 minutes, et la phase organique a été collectée et analysée directement par C.L.H.P.-P.I.. Pour toutes les expériences, les rendements d'extraction et les ratios d'enrichissement en LVVh-7 et VVh-7 ont été déterminés pour les hydrolysats de D.H. respectifs 3% et 15%. Toutes les expériences ont été effectuées en triplicata.

1.1.2. Assistée par la formation de paires d'ions

L'extraction de peptides assistée par paires d'ions a été réalisée dans des conditions identiques, en ajoutant à la phase aqueuse un alkyl-sulfonate de sodium avec une longueur de chaîne carbonée variant de 4 à 8 carbones (50 mM). Les alkyl-sulfonates avec une longueur de chaîne carbonée supérieure à 8 carbones ne furent pas retenus en raison de leur solubilité plus faible en solution aqueuse. Les solvants organiques utilisés furent le dichlorométhane et l'octan-1-ol dans des proportions allant de 0 à 100 % en fonctions des expériences. Pour toutes les expériences, les rendements d'extraction et les ratios d'enrichissement en LVVh-7 et VVh-7 furent déterminés pour les hydrolysats de D.H. respectifs 3% et 15%.

1.2. Extraction liquide-liquide assistée par paires d'ions associée à un contacteur à membrane

1.2.1. Protocole de filtration de l'hydrolysat

L'hydrolysat est filtré sur un contacteur à membrane de type fibres creuses en PES d'un seuil de coupure 10 kDa (UFP-10-C4X2MA, 1400 cm², GE Healthcare, Etats-Unis) sans gradient de pression transmembranaire appliqué autre que celui imposé par le débit d'une pompe Filtron (Pall, Etats-Unis) fixé à 1,2 $L.min^{-1}$. La filtration est arrêtée lorsqu'il ne reste plus qu'un cinquième du volume initial dans le rétentat.

1.2.2. Protocole d'extraction

Dans cette partie expérimentale, seul l'octan-1-ol a été étudié en tant que solvant organique d'extraction, les membranes en PS et PES ayant une mauvaise tolérance aux solvants chlorés.

Le conditionnement de la membrane pour le protocole d'extraction fut effectué comme suit : de l'eau distillée fut mise en recirculation à l'intérieur de fibres creuses et de l'octan-1-ol fut mis en recirculation coté coque, à de faibles débits, sans pression transmembranaire appliquée, pendant 1 h pour que la membrane soit imprégnée des solutions.

L'ensemble est ensuite vidangé et remplacé par 300 mL d'une solution d'hydrolysat (1 %, p/v) coté fibres creuses, contenant ou non un agent formateur de paires d'ions (50 mM) en fonction des expériences, et un volume égal de solvant organique est introduit côté coque. Chacune des solutions est mise en recirculation, à contre-courant, grâce à des pompes Filtron et Millipore Corporation (XX 81 4V2 30, MA, Etats-Unis) à un débit de 1,2 $L.min^{-1}$. Un gradient de pression transmembranaire est alors maintenu constant à une valeur de $\Delta P = 0.2$ bar coté phase organique à l'aide de vannes placées en sortie du module membranaire comme présenté dans la figure 9.

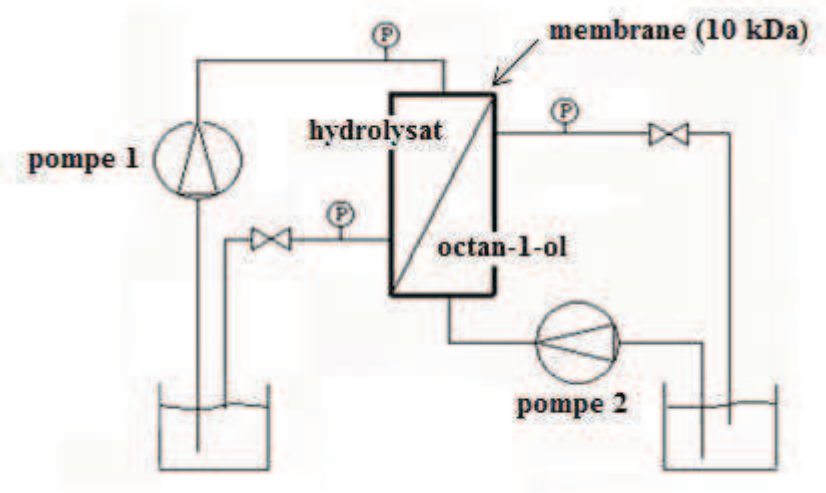


Figure 9. Schéma du montage d'extraction à contre-courant dans un contacteur à membrane.

Les membranes utilisées dans nos différentes expériences sont la membrane en PES décrite au **1.2.1.**, une membrane de type contacteur à fibres creuses en PS (Romicon CTG 1″ HF 1.0-43-PM10, 900 cm^2, Koch, Etats-Unis). La structure chimique de ces matériau est présentée dans la figure 10.

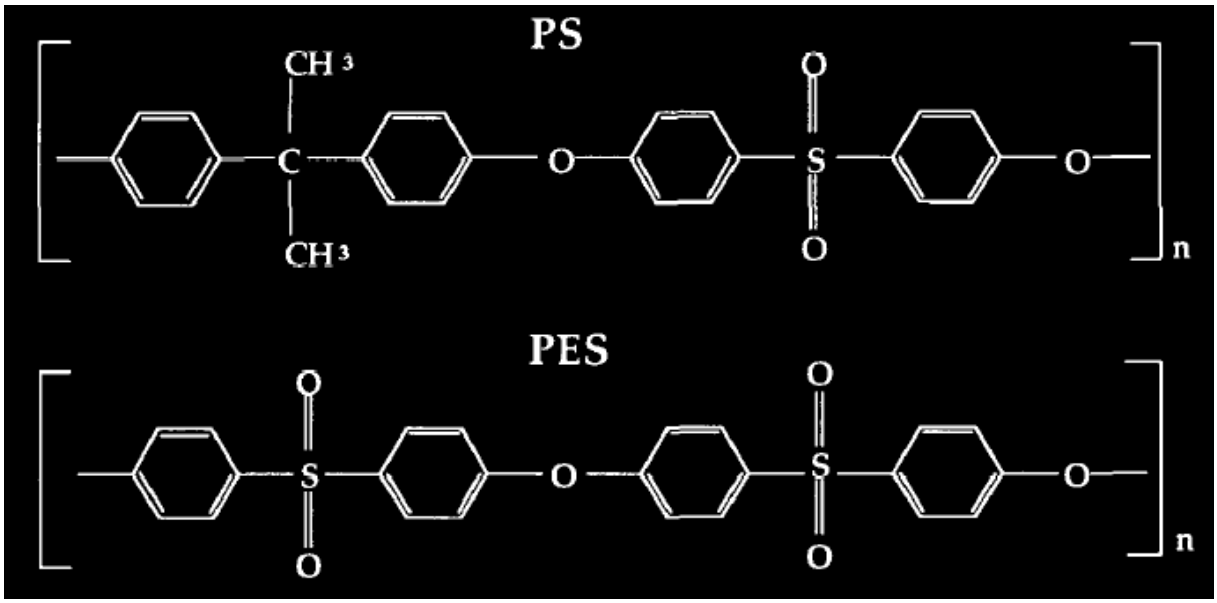


Figure 10. Structure chimique du polysulfone (PS) et du polyethersulfone (PES) (Gourley et coll., 1994).

1.2.3. Protocole de nettoyage

Après chaque expérience, la membrane fut nettoyée d'après le protocole suivant : recirculation d'une solution de soude 0,1 M (pH 10), puis d'une solution d'hypochlorite de sodium 200 ppm (pH 10) avant de rincer à l'eau distillée.

Le débit en eau fut ensuite mesuré pour s'assurer de l'intégrité et du bon nettoyage de la membrane.

1.3. Coefficient de partage

Le coefficient de partage est le rapport à l'équilibre des concentrations du composé, le(s) peptide(s) ciblé(s), entre les deux phases liquides non miscibles entre-elles (Wilkinson et Mc Naught, 1997).

2. Extraction liquide-liquide assistée par paires d'ions

2.1. Etudes préliminaires

2.1.1. Choix du solvant d'extraction

Le choix du solvant d'extraction est une étape importante dans la mise en œuvre de ce procédé d'extraction car il va déterminer l'affinité, le partage initial de nos peptides entre la phase aqueuse et la phase organique. Il faut donc faire un choix judicieux qui autorise une extraction tout en introduisant un premier critère de sélectivité.

Plusieurs solvants organiques sont capables d'extraire des peptides bioactifs comme le montrent par exemple les travaux de Léon *et coll.* (2004) ou Bromberg et Klibanov (1994) (cités précédemment dans la partie **I.1.3.1.2.**). Dans le cas de l'hémoglobine bovine, les études menées par Froidevaux *et coll*. (2002) par exemple ont montré qu'un mélange de butan-2-ol/octan-1-ol était un solvant capable d'extraire les peptides opioïdes LVVh-7 et VVh-7. Le butan-2-ol est efficace pour l'extraction des deux hémorphines, à partir des deux hydrolysats d'hémoglobine bovine dénaturée par l'urée aux D.H. 3 et 11 %. Mais si l'hydrolysat est stable en présence de butan-2-ol, il présente un inconvénient dans la mesure où la phase aqueuse est partiellement miscible dans ce solvant (environ 5,5 %, v/v).

La suite de nos travaux a été effectuée en opérations de type batch, que ce soit pour l'hydrolyse de l'hémoglobine ou pour l'extraction sur notre procédé. Nous avons cependant cherché à travailler dans des conditions qui permettraient la mise en œuvre d'un procédé continu. C'est dans ce cadre que la non-miscibilité des deux phases était d'autant plus importante, car des problèmes de perte d'activité de la pepsine en phase aqueuse a déjà été mise en évidence en présence d'alcool aliphatique (Tang, 1965 ; Antonov, 1977).

Les alcools aliphatiques à 5, 6 ou 7 carbones sont solubles dans l'eau, même dans une faible proportion. Ils ne peuvent donc convenir car ils pourraient perturber l'activité de la pepsine en solution. Notre intérêt s'est porté sur l'octan-1-ol. Ce solvant organique n'est pas miscible à l'eau et est souvent utilisé comme modèle pour la détermination des coefficients de partage des molécules par rapport à un environnement aqueux (Leo *et coll.*, 1971). De plus, des études préliminaires ont montré que la présence d'octan-1-ol durant l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, en milieu agité sans émulsion, ne gênait pas le mécanisme d'hydrolyse. Au contraire, la dénaturation de la protéine à l'interface eau/octan-1-ol (Cassatt et Steinhardt, 1971) met en avant le mécanisme d'action de type « zipper », qui favorise l'apparition de peptides intermédiaires de l'hydrolyse, tels que les peptides opioïdes LVVh-7 et VVh-7.

Le choix d'un solvant non miscible à la phase aqueuse tel que l'octan-1-ol, est donc retenu. Il peut être cependant judicieux de le comparer à d'autres solvants de nature et aux propriétés différentes. Zhao et Piot (1998) par exemple ont mené l'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 par des alcools aliphatiques de moins en moins polaires, à partir d'un hydrolysat

peptidique final décoloré obtenu par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine à pH 2. Ils ont ainsi montré que le taux d'extraction de la LVVh-7 et de la VVh-7 diminuait lorsque la polarité de l'alcool aliphatique utilisé augmentait. Leur résultat est donc en accord avec l'absence des deux hémorphines dans notre phase octan-1-ol observée lors des extractions témoins (voir ensuite la figure 14 commentée dans la partie **III.A.2.1.3.**). La polarité étant un critère pertinent dans le choix du solvant d'extraction, nous avons poursuivis dans cette approche.

Par ailleurs des contraintes supplémentaires apparaissent par l'addition d'agents formateurs de paires d'ions dans la phase aqueuse. Leur présence est en effet nécessaire, comme le montrera la suite de ce travail, pour pouvoir extraire nos peptides cibles dans les conditions acides de notre système, mais entraine des interactions supplémentaires avec les peptides, le solvant, l'interface aqueuse/solvant organique... L'affinité de cet agent pour les interfaces, son pouvoir surfactant, nous ont conforté dans le choix un solvant non miscible à l'eau pour s'affranchir de problème de solubilisation de celui-ci dans l'eau (et inversement). En plus de cela, des problèmes liés à la tolérance aux solvants des matériaux constituant le montage peuvent survenir, avec en premier lieu la membrane d'ultrafiltration. Un tel choix de système stable et maîtrisable laisse encore un large éventail de possibilités en termes de choix de solvants d'extraction.

Finalement, l'octan-1-ol et le dichlorométhane furent retenu car ils sont non miscibles à l'eau mais le sont entre eux (intéressant pour la création de mélanges de solvants pour en moduler les propriétés), et ils ont des propriétés physico-chimiques sensiblement différentes comme le montre le tableau 11. La polarité, E_T^N selon l'échelle de Reichardt (1994) est un critère que nous retiendrons pour la suite de notre étude. Ces deux solvants ont déjà prouvé leur capacité à transférer, et donc extraire des peptides. Enfin, les valeurs de référence concernant les coefficients de partage sont mesurées dans l'octan-1-ol, ce qui nous permettrait de les estimer le cas échéant (Esbjörner *et coll.,* 2007).

Solvant	**Type**	**μ (D)**	**Solubilité/eau$^{20°C}$**	**$T_{eb.}$ (°C)**	**ε (20°C)**	**E_T^N**	**ρ (g/cm^3)**
octan-1-ol	protique	1,76	0,54 g/L (0,004 M)	195	10,3	0,537	0,825
DCM	aprotique	1,14	1,3 g/L (0,015 M)	39,6	8,93	0,309	1,3

Tableau 11. Caractéristiques de l'octan-1-ol et du dichlorométhane.

2.1.2. Choix et comportement en milieu aqueux de l'agent surfactant

Bien que le nombre de candidats possibles pour assister l'extraction par paires d'ions était vaste, les alkyl-sulfonates furent choisis car ils ont déjà prouvé leur capacité à transporter, grâce à la formation de paires d'ions, des substances cationiques (Adjei *et coll*., 1993 ; Ho *et coll.*, 2003, Léon *et coll*., 2004). Les molécules extraites (morphine, amphétamine, practolol), dont les valeurs de log P (coefficient de partage eau/octan-1-ol)

étaient inférieures à 1, furent extraits grâce aux complexes formés avec les agents formateurs de paires d'ions de types alkyls-sulfonates. Le pH des solutions aqueuses variait de 3 à 10.

Le comportement en milieu aqueux de ces agents alkyls sulfonates fut étudié par des mesures de tensions superficielles afin d'en déterminer la concentration micellaire critique et l'impact d'un milieu acide sur cette dernière.

Les mesures de tensions superficielles ont permis de tracer l'évolution de la tension superficielle entre la phase aqueuse et l'air en fonction de la concentration en tensio-actifs présents dans la solution (figure 11). Les premières mesures ont été effectuées à pH 7 dans une solution tampon phosphate 50 mM. Les tracés correspondent aux mesures de tensions superficielles des hexane- (C6), heptane- (C7) et octane- (C8) sulfonate de sodium, par la méthode de l'anneau.

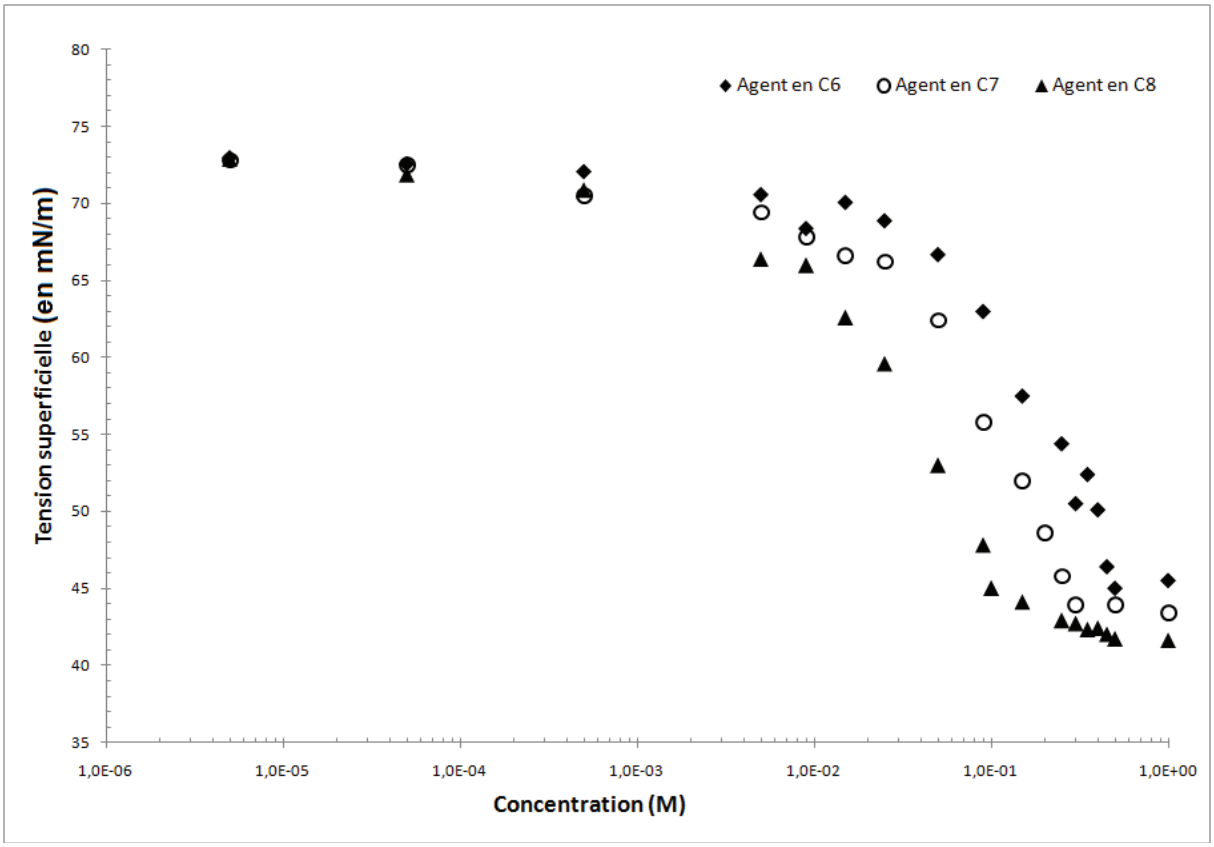


Figure 11. Mesures des tensions superficielles des hexane, heptane et octane-sulfonates à pH 7 en fonction de leur concentration.

Les valeurs de tensions superficielles de la solution phosphate seule correspondent aux valeurs de l'eau (72,8 mN/m). Ces tracés permettent de déterminer les valeurs de la concentration micellaire critique (C.M.C.) pour chacun des agents étudiés. Les valeurs de C.M.C. sont de 0,5 M, 0,3 M et 0,143 M pour les hexane-, heptane- et octane-sulfonates respectivement. Ces valeurs sont proches de celles observées par Annunziata *et coll.* (1999) qui étaient de 0,540 M, 0,302 et 0,130 M pour l'hexane, l'heptane et l'octane sulfonate de

sodium respectivement. La longueur de la chaîne carbonée joue un rôle direct dans la valeur de la C.M.C. : plus elle est élevée, plus la C.M.C. est faible.

Pour former des paires d'ions entre les peptides et l'agent surfactant et que le milieu ne soit pas perturbé pas la formation de micelles d'agent tensioactif, nous avons alors choisi une concentration de 50 mM en alkyls sulfonates, inférieure à la C.M.C. quelque soit l'agent employé.

Les mêmes analyses de tensions superficielles en milieu aqueux furent ensuite effectuées pour observer le comportement de ces mêmes propriétés en milieu acide. Les alkyl-sulfonates étant chargés négativement en milieu aqueux, la formation de paires d'ions serait favorisée avec l'ionisation des groupements chargés positivement sur les peptides, en milieu acide donc, où les groupements amines des peptides sont chargés.

Afin de confirmer les courbes de tensions superficielles obtenues à pH 7 et pour voir si le pH avait une influence sur les valeurs de la C.M.C., des mesures ont donc été effectuées à pH 3 avec les agents surfactants à 6 (figure 12 (a)) et 8 carbones (figure 12 (b)), l'agent à 7 carbones ayant un comportement intermédiaire aux deux pré-cités ne fut pas étudié.

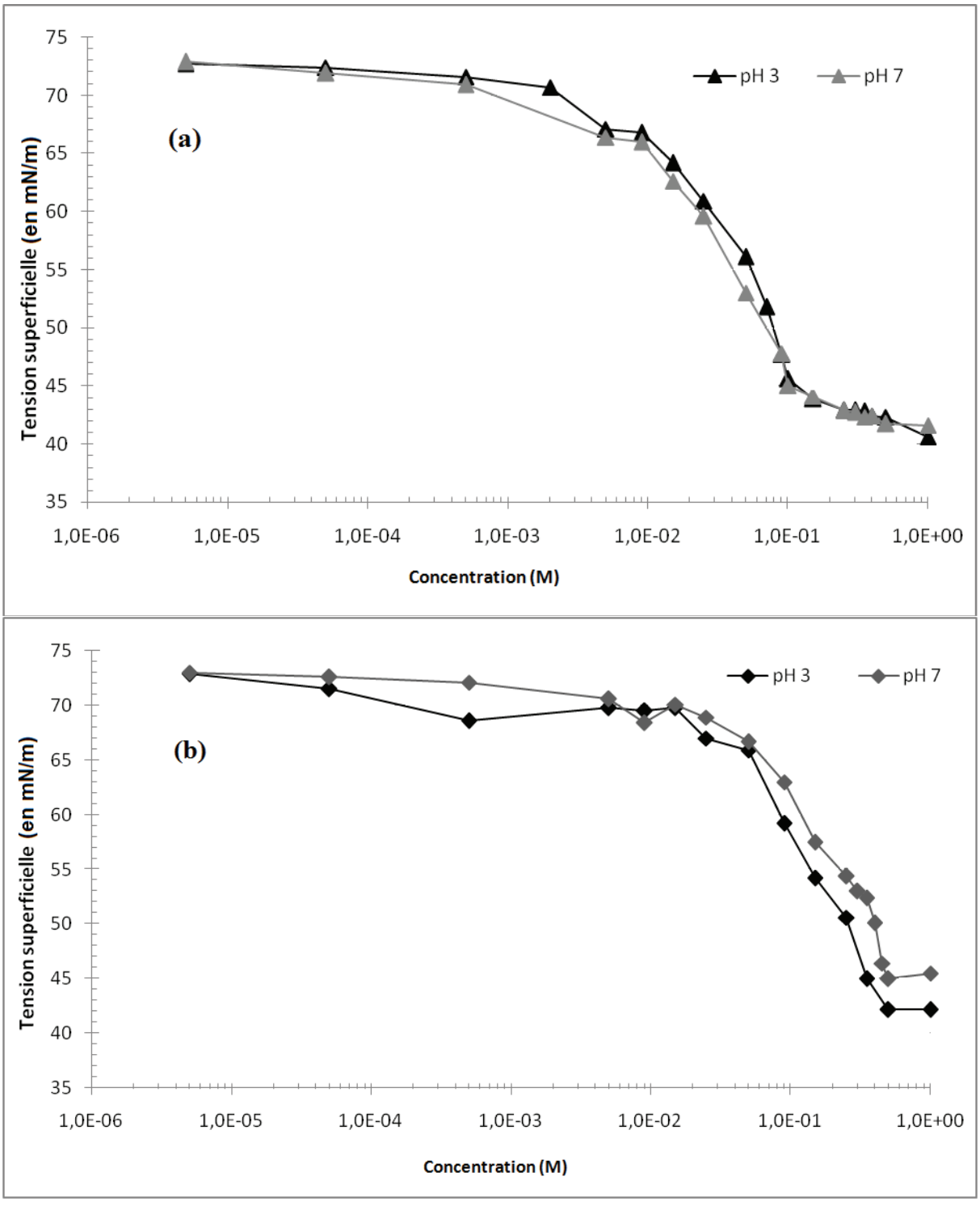


Figure 12. Mesures des tensions superficielles de (a) l'hexane et (b) octane-sulfonate aux pH 3 et 7 en fonction de leur concentration.

Les courbes obtenues pour les hexane et octane sulfonates aux pH 3 et 7 sont très similaires. Certains points mesurés à pH 3 sont sensiblement inférieurs, notamment pour l'agent en C6, mais ces décalages n'influencent pas la valeur de la C.M.C.. On peut alors extrapoler au comportement de l'agent en C7 dont la C.M.C. ne sera logiquement pas influencée par une baisse du pH à 3.

Les valeurs identiques de tensions superficielles obtenues au pH 3 et 7 peuvent s'expliquer par le fait que les acides alkyl-sulfonates sont des sels qui se dissocient totalement en solution (Herrmann, 1966). Le pH n'influe donc pas sur les tensioactifs seuls en solution dans la détermination de la C.M.C..

2.1.3. Extraction en l'absence d'alkyls sulfonates

L'expérience fut menée pour vérifier si des peptides pouvaient être extraits à l'interface liquide-liquide sans l'aide d'agent surfactant. Les hydrolysats testés étaient un hydrolysat de D.H. 3 % pour suivre la LVVh-7 et un hydrolysat de D.H. 15 % pour suivre la VVh-7, car ces deux peptides opioïdes sont prédominants dans ces hydrolysats (Lignot *et coll.*, 1999). La figure 13 montre les profils chromatographiques des hydrolysats D.H. 3 % et 15 %. La molécule d'hème est détectée au temps de rétention de 38,4 min. La LVVh-7 dans l'hydrolysat D.H. 3 % est détectée à un temps de rétention de 28,9 min et la VVh-7 dans l'hydrolysat D.H. 15 % à 27,8 min. Ces peptides contiennent dans leur séquence un acide aminé basique arginine et ont une hydrophobie d'environ 1700 cal/mol d'après l'échelle de Bigelow (1967), ce qui est une valeur relativement élevée comparé à l'hydrophobie moyenne d'environ 1000 cal/mol des autres peptides produits au cours de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. Nous observons également que ces deux peptides opioïdes sont présents dans des mélanges particulièrement complexes qui contiennent plus d'une centaine de peptides de séquences différentes (Froidevaux *et coll.*, 2000).

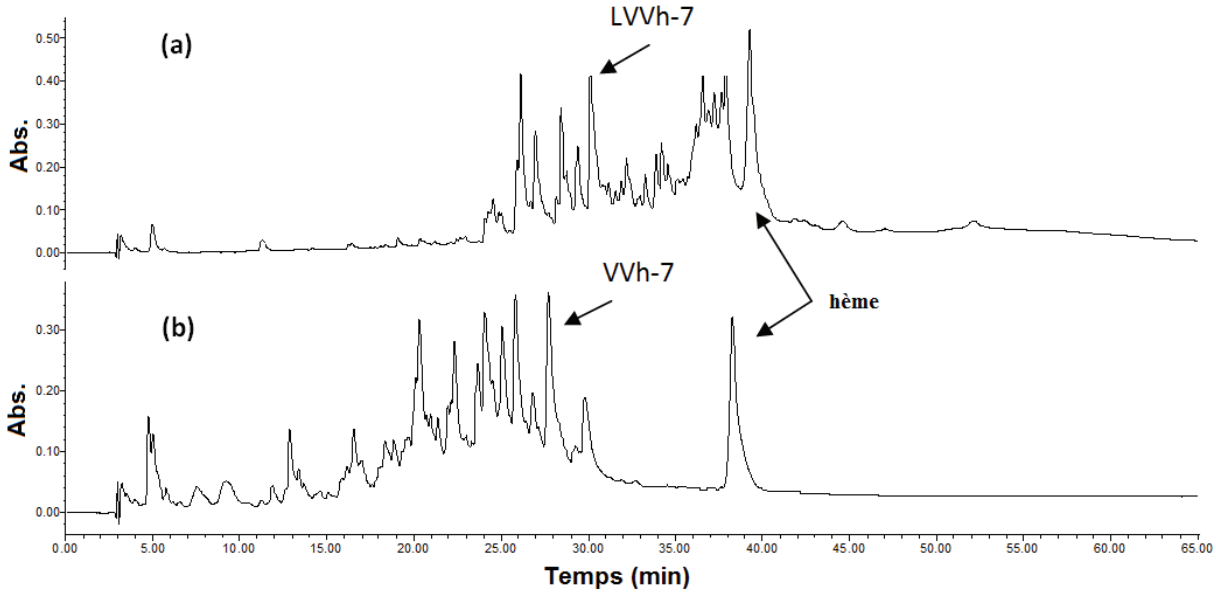


Figure 13. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. des hydrolysats peptidiques de D.H. (a) 3 % et (b) 15 %.

La figure 14 présente les profils chromatographiques des phases organiques après l'extraction en l'absence d'alkyl-sulfonates aux pH 3, 4, 5, 7 et 10 pour les hydrolysats de D.H. 3 % et 15 %. L'hème est extrait dans la phase octan-1-ol et est détecté à un temps de rétention de 37 min. Sa concentration décroit au fur et à mesure que le pH de la phase aqueuse augmente. La structure de l'hème contient deux groupements acides carboxyliques qui ne sont

pas ionisés aux pH acides, ce qui induit une hausse de l'hydrophobie de l'hème. Ainsi moins d'hème est extrait aux pH basiques, étant donnée l'ionisation des groupements carboxyliques.

Les profils chromatographiques des hydrolysats après extraction ne présentent pas de différence majeure avec le profil initial et ne sont donc pas présentés.

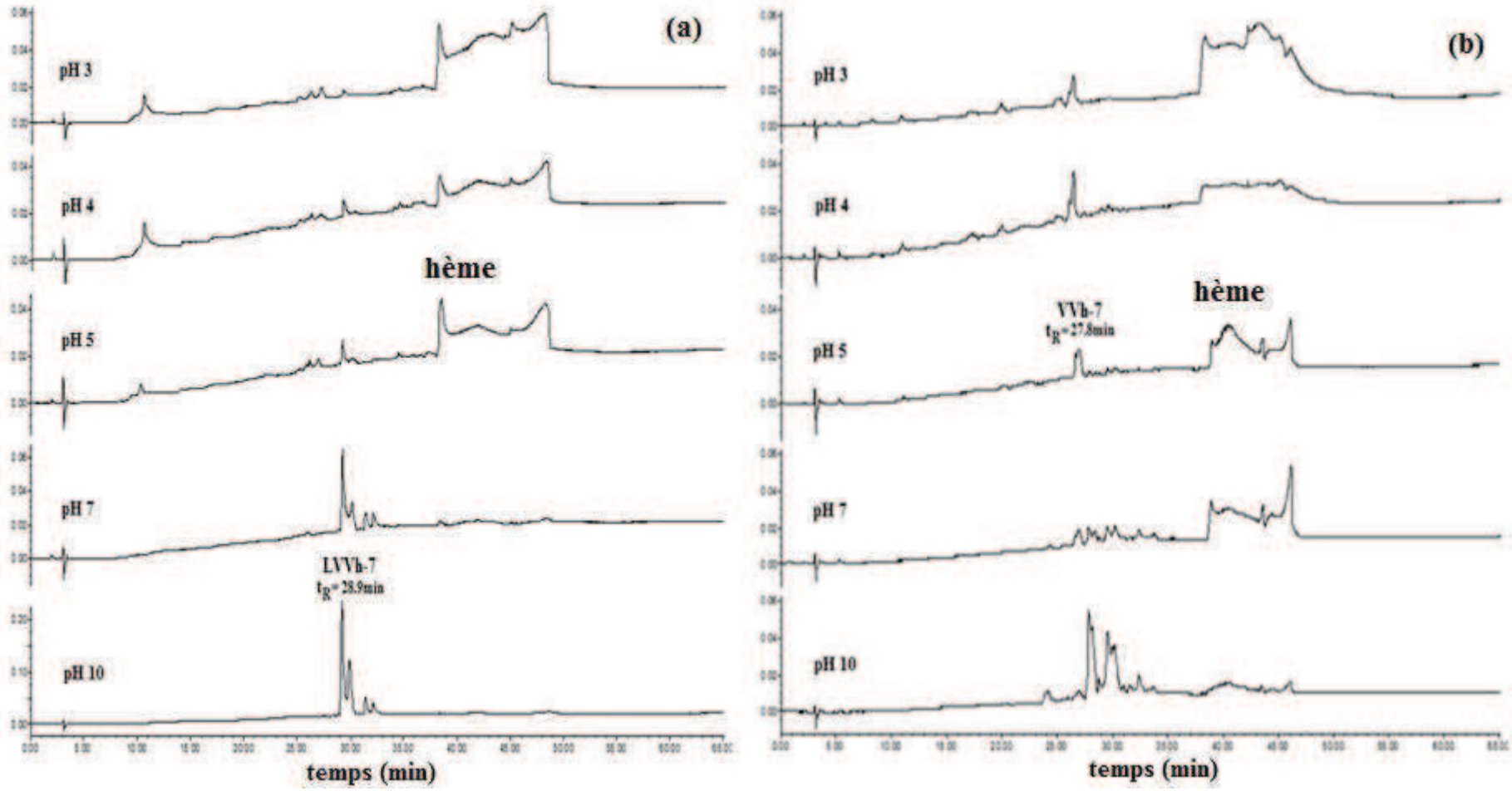


Figure 14. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. des phases organiques en octan-1-ol après extraction sans agent alkyl sulfonate, aux pH 3, 4, 5, 7 et 10 pour les hydrolysats de D.H. (a) 3 % et (b) 15 %.

Peu de peptides furent extraits aux pH acides, quelque soit l'hydrolysat, tandis que le nombre de peptides extraits augmentait lorsque la valeur de pH était supérieure à 7. La précipitation en solution aqueuse d'hème et de peptides à leur point isoélectrique autour du pH 5 ne fut pas gênante car lors de l'extraction en phase organique, ces précipités se resolubilisaient en très grande partie ; les résultats observés ne semblaient pas présenter d'incohérence par rapport aux autres valeurs de pH étudiées. Parmi les peptides extraits, la LVVh-7 (temps de rétention de 28,9 min) et la VVh-7 (temps de rétention de 27,8 min) étaient détectées dans les phases organiques respectivement après extraction des hydrolysats de D.H. 3 % et 15 %. L'augmentation de la quantité d'hémorphines extraites lorsque le pH de la phase aqueuse augmente peut s'expliquer par leur hydrophobie élevée et par leur haut point isoélectrique (9,5). Par conséquent, à pH 10, les acides aminés leucine et valine, qui sont présents en position N-terminale pour la LVVh-7 et la VVh-7 respectivement ne sont plus chargés, seul le noyau guanidinium (pK = 12,5) de l'arginine est chargé positivement, tandis qu'à pH 3 les deux hémorphines vont porter une charge positive supplémentaire, diminuant ainsi leur affinité pour la phase organique. Par conséquent, il était supposé que l'addition d'alkyl-sulfonate favorise le transport des hémorphines vers la phase organique.

2.1.4. Etude de l'association de l'agent surfactant avec les hydrolysats

Le comportement en phase aqueuse de l'agent surfactant en présence des peptides fut analysé par des mesures de tensions superficielles pour observer l'influence de la population peptidique, du pH, et du temps sur les propriétés tensioactives du milieu.

Les tensions de surface des solutions d'hydrolysat D.H. 3 % avec ou sans ajout de tensioactif ont été mesurées après deux jours d'incubation à température ambiante afin de voir l'effet de l'ajout de tensio-actif à pH 3 et pH 7 (figure 15).

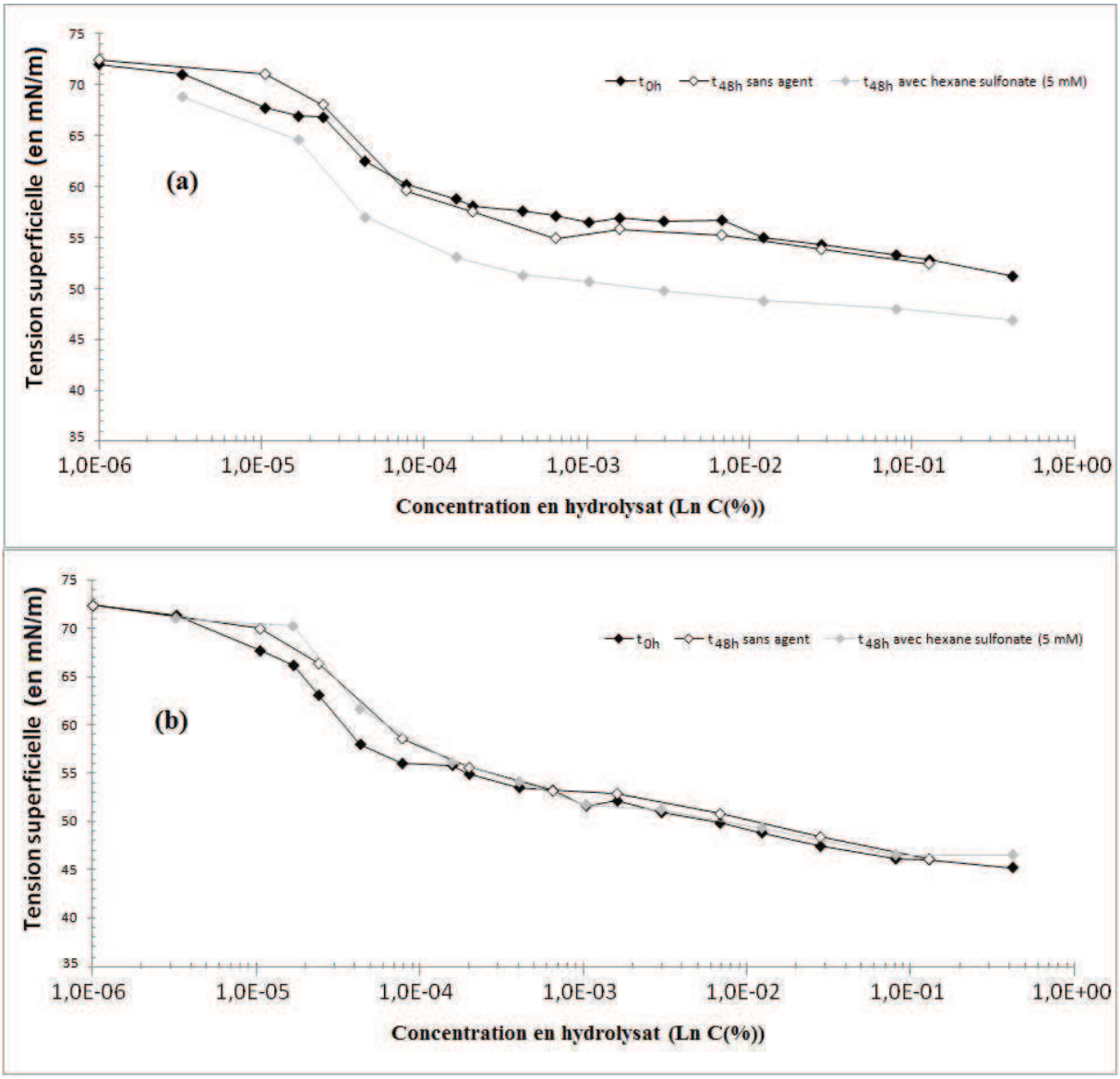


Figure 15. Mesures des tensions superficielles de l'hydrolysat de D.H. 3 % aux pH (a) 3 et (b) 7 en fonction de sa concentration à t_{0h} et t_{48h}.

L'agent fut ajouté en solution à une concentration de 5 mM. Cette concentration était plus faible que celle déterminée pour la suite de nos expériences, mais fut choisie pour voir une influence dès l'ajout de l'agent en présence d'hydrolysat (γ_{C6} = 66 mN/m à 5 mM, voir figure 12). En ce qui concerne l'étude sans agent surfactant et à pH 3, les valeurs de tensions superficielles de l'hydrolysat restent stables dans le temps. Une baisse significative de la tension superficielle est observée avec l'ajout de l'hexane-sulfonate. A pH 7 toutefois, que ce soit avec ou sans agent tensioactif, les valeurs restent identiques au cours du temps. L'association des peptides et de l'agent à pH 3 conduit à une diminution significative de la tension de surface, différente de celles observées pour l'agent seul ou l'hydrolysat seul. Les pH faibles sont donc plus favorables aux interactions entre les peptides chargés positivement et les alkyl-sulfonates chargés négativement qu'à pH 7.

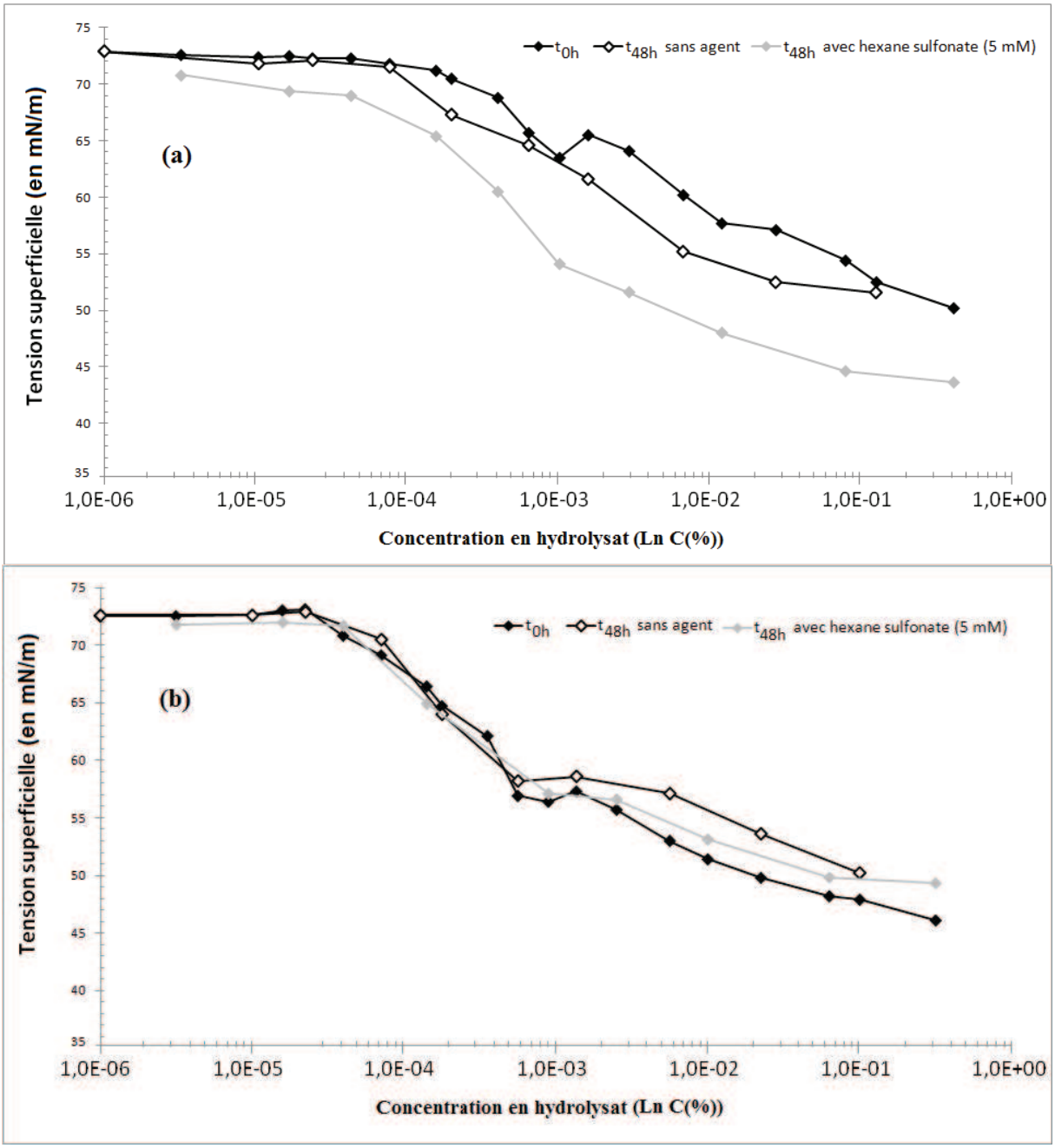


Figure 16. Mesures des tensions superficielles de l'hydrolysat de D.H. 15 % aux pH (a) 3 et (b) 7 en fonction de la concentration en hexane-sulfonate à t_{0h} et t_{48h}.

De la même manière, un abaissement significatif de la tension superficielle de l'hydrolysat peptidique de D.H. 15 % (figure 16) est observé après l'ajout d'agent formateur de paires d'ions à pH 3, tandis qu'à pH 7 l'influence de l'ajout de l'agent est faible. L'impact de l'ajout de l'agent surfactant est plus prononcé avec l'hydrolysat de D.H. 15 % (ΔTS = 6,6 mN/m) qu'avec l'hydrolysat de D.H. 3 % (ΔTS = 4,7 mN/m). Ceci peut être du au fait que plus de petits peptides, avec plus de charges disponibles, sont présents dans l'hydrolysat de D.H. 15% comme le montre la figure 8 (partie **II.2.2.**). Il y aurait donc plus de disponibilité pour que les peptides s'associent à l'agent formateur de paires d'ions.

Que ce soit donc avec l'hydrolysat de D.H. 3% ou D.H. 15%, la baisse de tension superficielle n'est significative qu'à pH 3, là où logiquement, la formation de paires d'ions entre l'alkyl-sulfonate, chargé négativement, et les peptides, alors chargés positivement, est favorisée. Ceci montre bien l'intérêt d'une telle association aux pH faibles, car même si les paires d'ions peuvent se former aux pH plus élevés, leur influence est moins sensible.

2.2. Influence de la polarité du solvant d'extraction

Afin de mettre en évidence l'influence de la variation de la polarité sur l'extraction assistée par paires d'ions, une étude a été menée à partir de l'hydrolysat de D.H. 15 %, en maintenant les conditions de pH à 7 et l'agent surfactant octane sulfonate. D'après l'échelle empirique de Reichardt (1994), l'octan-1-ol et le dichlorométhane présentent une valeur de polarité E_T^N de 0,537 et 0,309 respectivement, l'octan-1-ol étant plus polaire que le dichlorométhane. La polarité de la phase organique a alors été modifiée en augmentant le rapport dichlorométhane/octan-1-ol (10/90, 30/70, 50/50, 70/30 et 100/0 %, v/v), solvants miscibles entre eux. La figure 17 montre les profils chromatographiques correspondant à l'analyse par C.L.H.P.-P.I. des phases organiques après extraction pour les différents ratios de solvants testés. Les profils chromatographiques des hydrolysats après extraction ne présentent pas de différence majeure avec le profil initial et ne sont donc pas présentés.

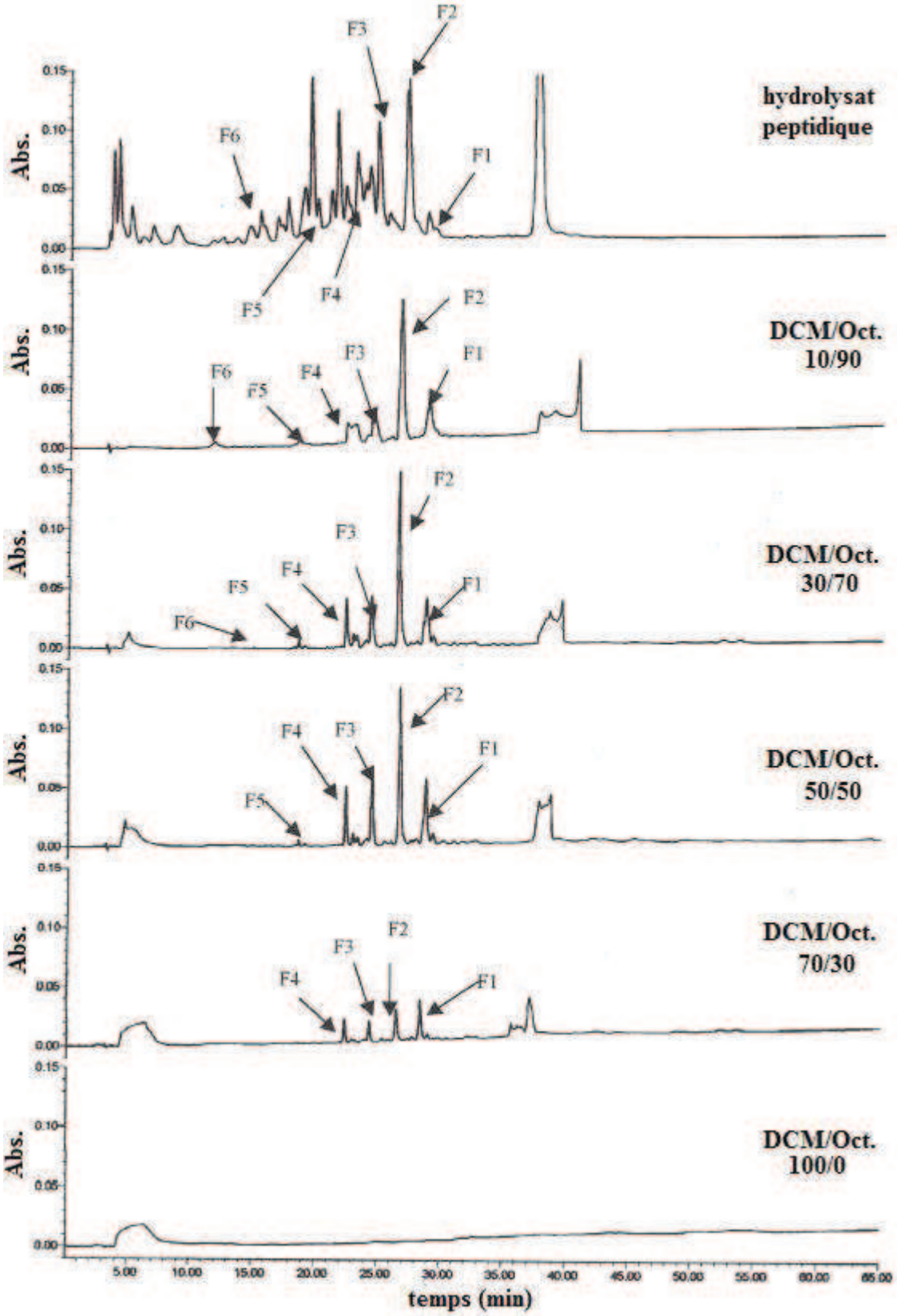


Figure 17. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. des phases organiques, pour différents rapports en dichlorométhane/octan-1-ol (%, v/v), après extraction avec l'agent octane-sulfonate à pH 7 pour l'hydrolysat de D.H. 15 %.

Plusieurs fractions peptidiques sont extraites dans les différentes phases organiques sauf dans le dichlorométhane pur et sont présentées dans le tableau 12.

N° de fraction	Séquence dans l'hémoglobine	Séquence peptidique	Hydrophobie (cal/mole)	Rendement d'extraction (%) pour les rapports DCM/oct. (%)				
				10/90	30/70	50/50	70/30	100/0
1	β(31-40)	LVVYPWTQRF	1675	26	25	26	18	0
2	β(32-40)	VVYPWTQRF	1661	20	19	17	5	0
3	β(113-124) ou β(114-125) α(36-45) ou α(37-46)	LARNFGKEFTPV FPTTKTYFPH	1170 1570	5	7	9	4	0
4	β(130-145) α(87-98)	QKVVAGVANALAHRYH HAHKLRVDPVNF	834 1137	5	9	10	5	0
5	β(7-13) α(30-33) β(130-140) β(135-145)	KAAVTAF ERMF QKVVAGVANAL GVANALAHRYH	1057 683 845 804	1	2	1	0	0
6	β(140-145)	LAHRYH	1058	1	0	0	0	0

Tableau 12. Séquences peptidiques, hydrophobie selon l'échelle de Bigelow et rendements d'extraction des peptides présents dans les fractions extraites dans la phase organique.

Les hémorphines avaient un rendement d'extraction variant de 0 à 26 % pour un ratio d'octan-1-ol allant de 0 à 90 % respectivement pour la LVVh-7 (fraction F1), et un rendement d'extraction variant de 0 à 20 % pour la VVh-7 (fraction F2) dans les mêmes conditions. On observe que plus la polarité diminuait, moins les peptides cibles étaient extraits. Ce n'était cependant pas exactement le même comportement pour tous les peptides extraits : les fractions 3 et 4 notamment présentent un maximum d'extraction à un rapport DCM/octan-1-ol de 50/50.

Bromberg et Klibanov (1994) ont montré que l'affinité de la paire d'ions hydrophobe, un complexe SDS-insuline dans leur étude, pour le solvant organique dépendait de la nature de celui-ci. En effet, des solvants plus polaires favorisaient la vitesse de transport de l'association. Par exemple, 10 % d'insuline étant extraite en 6 jours dans du perfluoromèthylcyclohexane alors que la même quantité était extraite en 12 heures dans du dichlorométhane, ce dernier étant plus polaire.

Outre l'intérêt d'amélioration de la vitesse de transfert, le choix d'un solvant peut permettre également d'obtenir des rendements, et potentiellement, des sélectivités différentes. On notera cependant que les deux peptides opioïdes extraits sont plus hydrophobes que la moyenne de ceux présents dans leurs hydrolysats respectifs en raison de leur séquence en acides aminés. Pour mieux appréhender notre système d'extraction, des études complémentaires sont menées en faisant varier l'agent surfactant.

2.3. Influence de la longueur de la chaîne carbonée de l'agent formateur de paires d'ions

L'objectif de cette étude était la détermination de l'influence de la longueur de chaine carbonée et de la polarité du solvant sur l'extraction des hémorphines issues de l'hydrolysat de D.H. 15 % par paires d'ions. Deux rapports en dichlorométhane/octan-1-ol furent choisis d'après les résultats précédents : le rapport 10/90 % où les hémorphines étaient mieux extraites, et le rapport de 70/30 % (v/v) pour tester l'influence d'un rapport moins polaire sur l'extraction des différentes fractions. Les extractions dans ces phases organiques ont été testées avec des agents surfactants alkyles sulfonates de différentes longueurs de chaine carbonée (4, 6 ou 8 carbones). Les profils chromatographiques correspondant à l'analyse des phases organiques après extraction pour les différents agents et rapports en solvants sont présentés dans la figure 18.

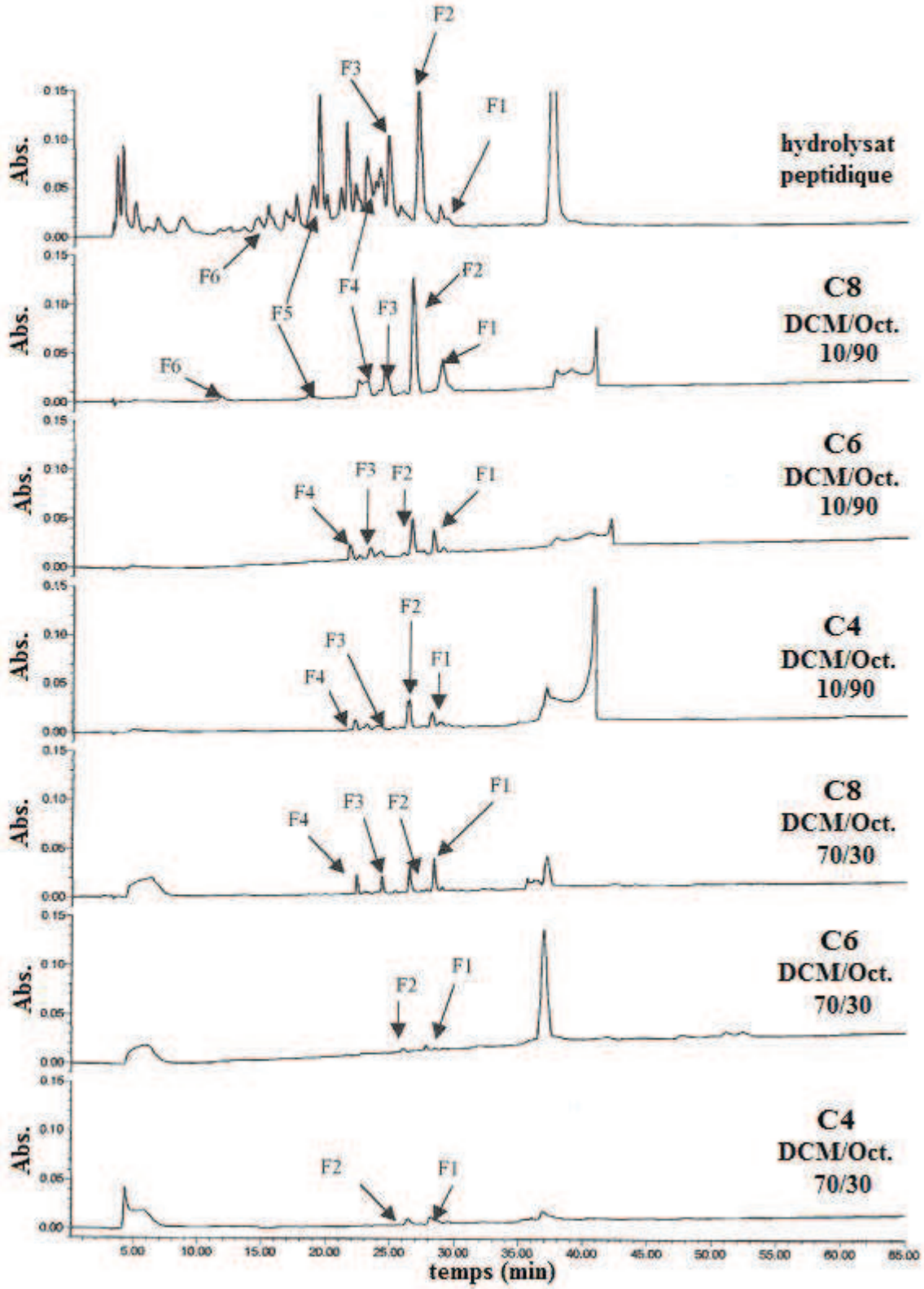


Figure 18. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. des phases organiques, pour des rapports en dichlorométhane/octan-1-ol de 10/90 et 70/30 % (v/v), après extraction avec les agents butane, hexane ou octane-sulfonate à pH 7 pour l'hydrolysat de D.H. 15 %.

Rapport DCM/oct.	Alkyl sulfonate	Rendement en LVVh-7 (%)	Rendement en VVh-7 (%)
10/90	C8	26	17
	C6	24	7
	C4	14	5
70/30	C8	23	4
	C6	5	1
	C4	6	1

Tableau 13. Rendements d'extraction des hémorphines pour les différents rapports de solvants et agents.

Les hémorphines avaient les rendements d'extraction présentés dans le tableau 13. On confirme globalement un meilleur rendement d'extraction lorsque la proportion d'octan-1-ol est plus importante dans le solvant. Des différences sont observées, pour un même rapport de solvant, lorsque la longueur de la chaine carbonée de l'agent change : la diminution du nombre de carbone dans la chaine alkyl entraine une baisse du rendement d'extraction. L'association peptide-agent surfactant est plus hydrophobe lorsque la longueur de la chaine carbonée augmente, ce qui accroit logiquement son affinité pour la phase organique. L'influence des variations dues à l'agent est également plus sensible avec le ratio 10/90 en DCM/octan-1-ol, les valeurs obtenues avec le ratio 70/30 étant relativement faibles.

Un solvant plus polaire favorise donc bien l'extraction de nos peptides cibles, et privilégier un fort ratio d'octan-1-ol dans nos expériences permettra de mieux mesurer l'impact de l'agent surfactant lors de l'extraction. De plus, une longueur de chaîne carbonée plus importante pour l'agent formateur de paires d'ions permet d'accentuer l'affinité de l'association peptide-agent pour la phase organique, et donc d'en améliorer l'extraction.

2.4. Influence de la longueur de chaîne carbonée de l'agent formateur de paires d'ions et du pH de la phase aqueuse sur l'extraction des hémorphines

L'objectif de cette étude était la détermination de l'influence de la longueur de chaine carbonée et du pH sur l'extraction des hémorphines par paires d'ions. Pour limiter les paramètres pouvant interagir et au vu des résultats précédents, la phase organique fut constituée d'octan-1-ol uniquement et les longueurs importantes de chaîne carbonée furent retenues afin de favoriser l'extraction. Il fut alors décidé de n'étudier le rendement d'extraction et le facteur d'enrichissement des hémorphines que pour ces variations de paramètres physico-chimiques.

Nous avons ainsi choisi les conditions préparatoires à l'extraction assistée par paires d'ions de LVVh-7 et VVh-7 avec des acides alkyls sulfonates. L'extraction assistée par paires d'ions des hémorphines fut menée dans un système biphasique eau/octan-1-ol à température ambiante, pendant 12h. La phase aqueuse contenait l'hydrolysat de D.H. 3% ou de 15 % (1 %, p/v) et de l'alkyl-sulfonate (50 mM) dont la longueur de chaîne carbonée était de 6, 7 ou 8

atomes de carbone, en présence d'une solution de phosphate de sodium 50 mM dans le but de maintenir une force ionique constante tout au long de l'extraction.

La figure 19 montre les profils chromatographiques de la phase organique après extraction assistée par paires d'ions à pH 3 sur les hydrolysats de D.H. 3 % et 15 % avec l'hexane-, l'heptane- ou l'octane-sulfonate. Il est observé que pour chaque agent testé, la LVVh-7 (temps de rétention : 27,5 min) et la VVh-7 (temps de rétention : 25,5 min) étaient extraites pour les hydrolysats de D.H. 3 % et 15 % respectivement. L'hème est également extrait dans la phase organique pour des temps de rétention de 37 min.

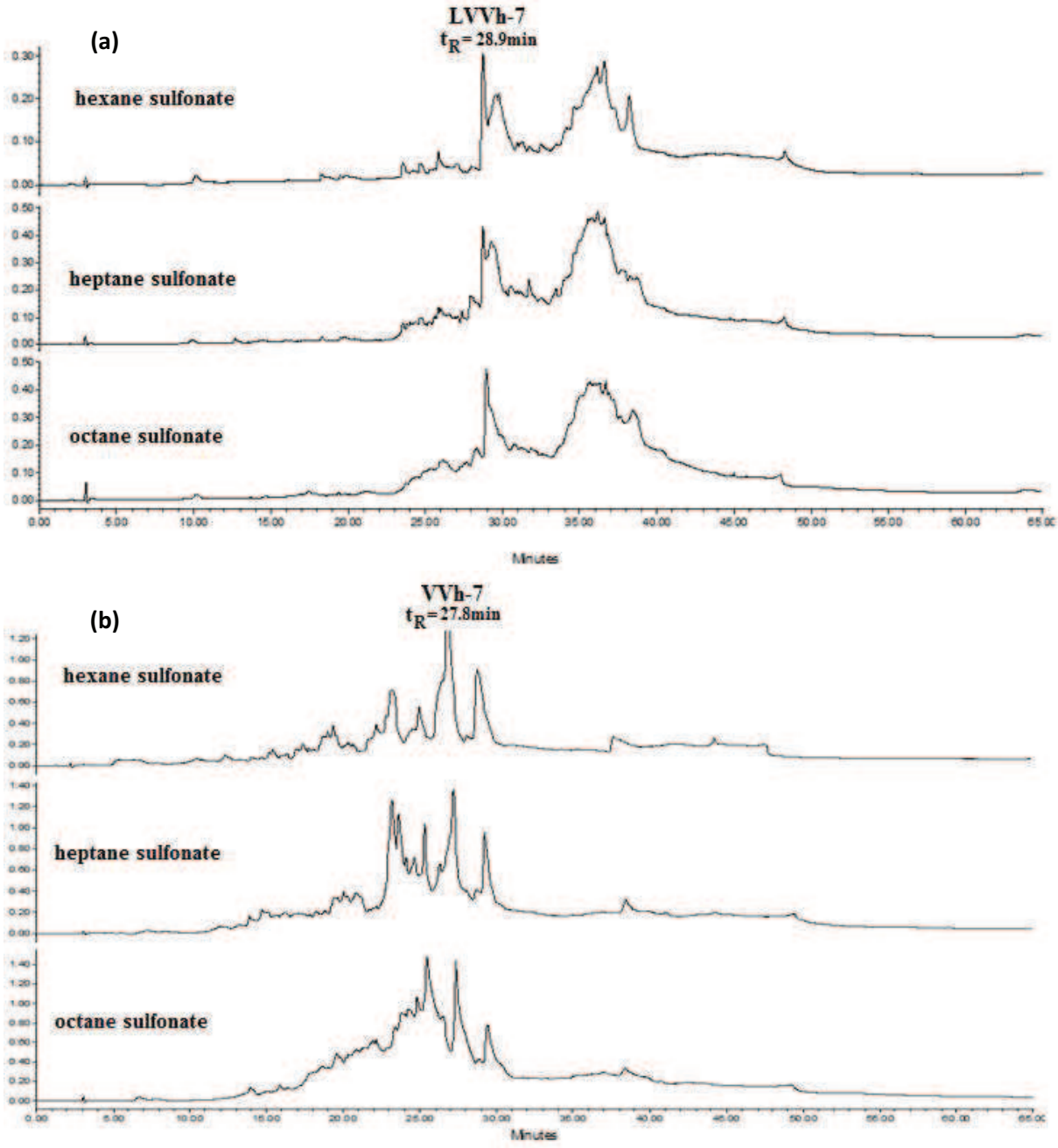


Figure 19. Profils chromatographiques des phases organiques après extraction assistée par paires d'ions en présence d'hexane, heptane ou octane sulfonate à pH 3 avec les hydrolysats de D.H. (a) 3 % et (b) 15 %.

Les profils chromatographiques, issus des expériences aux différents pH et agents surfactants, ont permis d'évaluer l'effet de la combinaison longueur de la chaîne alkyle/pH de la phase aqueuse, grâce à la détermination du rendement d'extraction et du facteur d'enrichissement de l'hémorphine dans la phase organique, comme expliqué dans le matériel et méthodes.

Les figures 20 et 21 montrent respectivement l'évolution du rendement d'extraction et du facteur d'enrichissement dans la phase organique en fonction du pH en présence d' hexane-, d'heptane- ou d'octane-sulfonate. L'extraction sans agent surfactant représente l'expérience témoin.

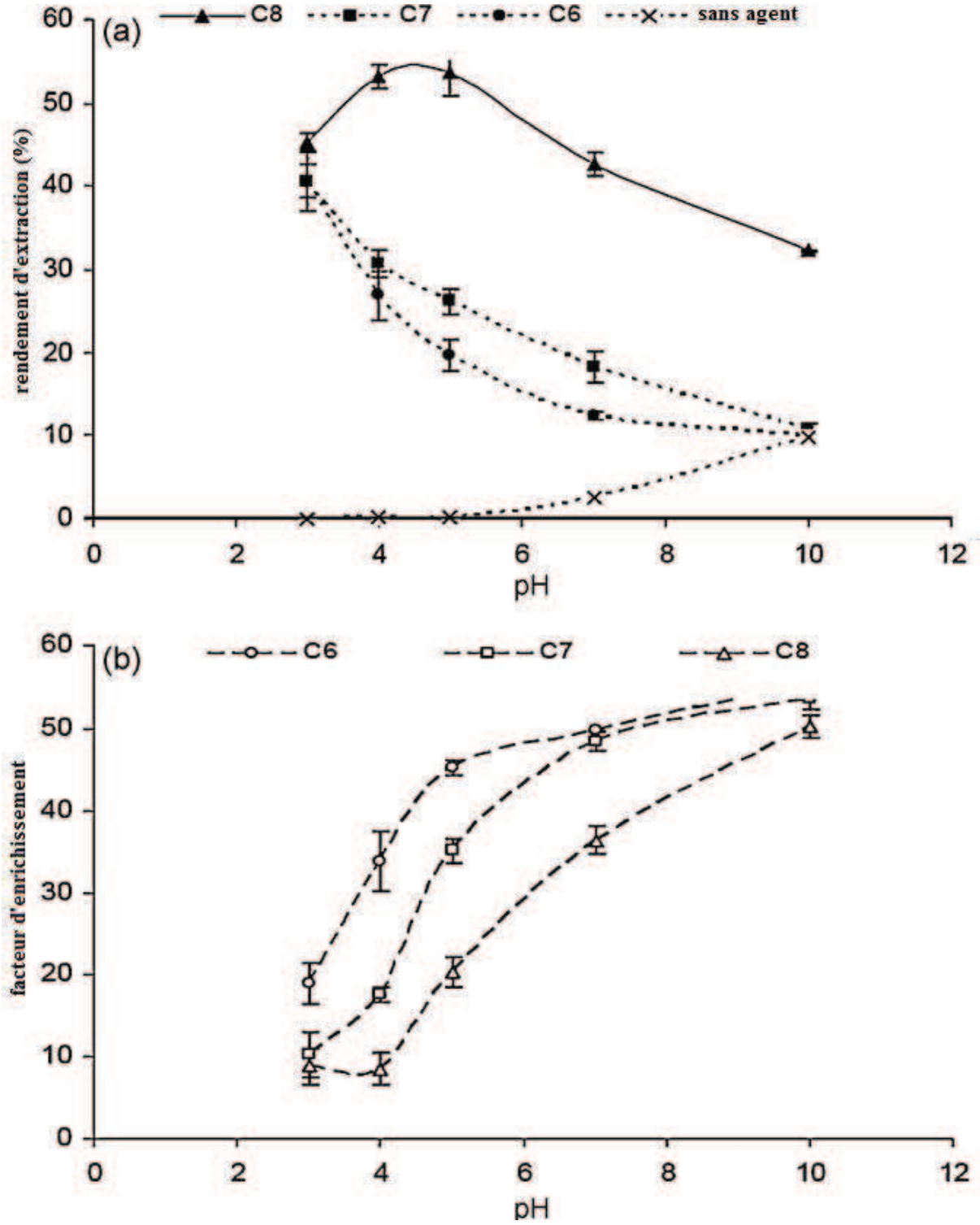


Figure 20. Rendements d'extraction (a) et facteurs d'enrichissement (b) du peptide LVVh-7 issu de l'hydrolysat de D.H. 3 %, dans l'octan-1-ol, après extraction assistée par paires d'ions pour les agents hexane, heptane et octane-sulfonates en fonction du pH.

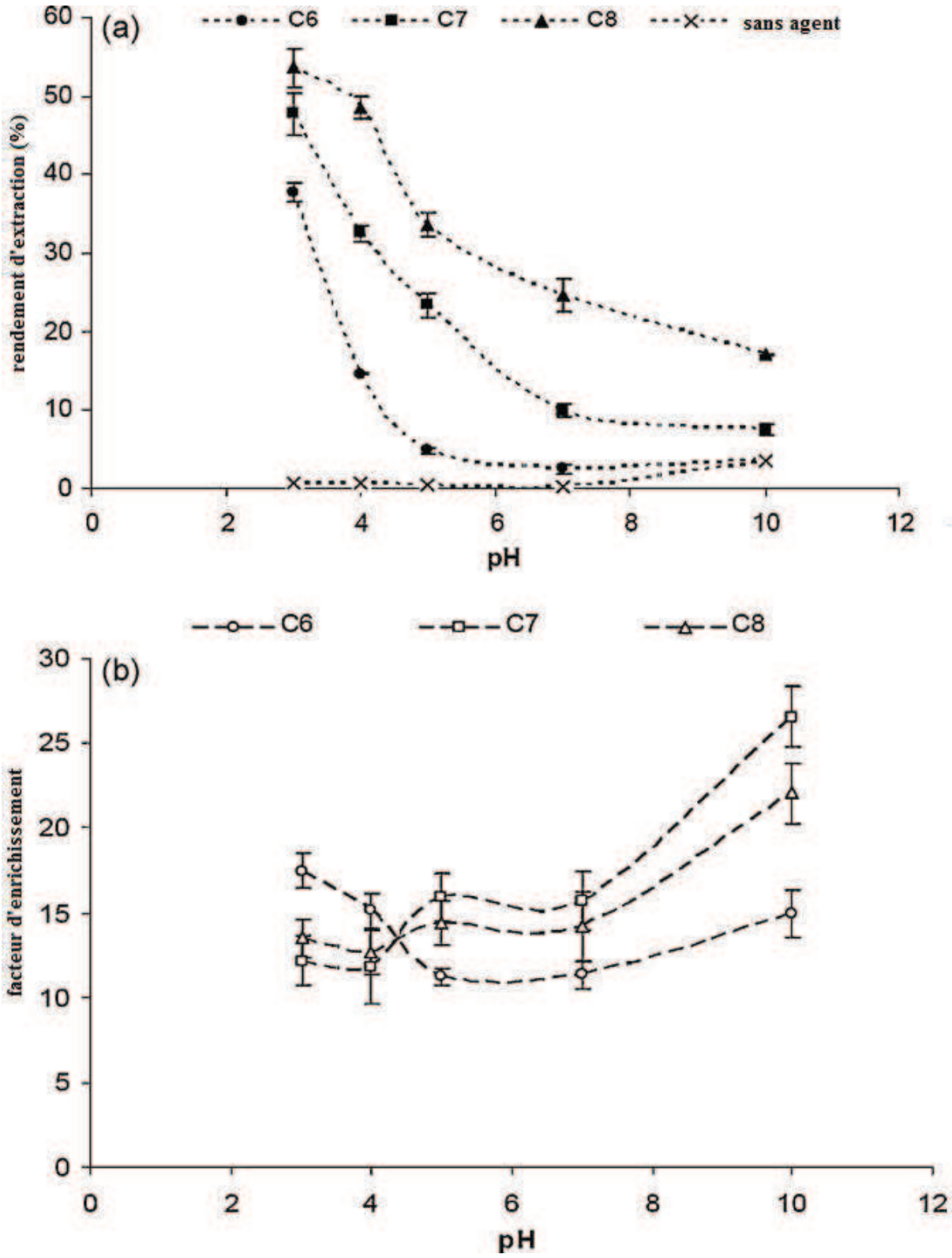


Figure 21. Rendements d'extraction (a) et facteurs d'enrichissement (b) du peptide VVh-7 issu de l'hydrolysat de D.H. 15 %, dans l'octan-1-ol, après extraction assistée par paires d'ions pour les agents hexane, heptane et octane-sulfonates en fonction du pH.

L'ajout d'alkyl-sulfonate augmente les rendements d'extraction des hémorphines, quel que soit le pH de la phase aqueuse, comparé à l'extraction dans le témoin sans agent. L'extraction témoin montre en effet une extraction nulle à pH 3 alors que les extractions avec les agents ont un rendement d'extraction compris entre 40 et 45 % pour l'hydrolysat de D.H. 3 % et entre 35 et 55 % pour l'hydrolysat de D.H. 15 % selon l'agent utilisé. Les charges positives présentes sur les hémorphines, en particulier sur l'arginine s'annulent avec l'augmentation du pH. Ainsi aux pH les plus basiques, la formation de paires d'ions avec l'agent, chargé négativement, n'est plus favorisée : on retrouve des résultats d'extraction avec l'agent proche de l'expérience témoin sans agent. De plus les sites chargés positivement des hémorphines diminuent avec l'augmentation du pH vers 10, et leur hydrophilie s'en trouve diminuée. Ceci augmente donc le coefficient de partage en faveur de la phase organique : on observe avec l'extraction témoin une extraction directe à hauteur de 5 et 10 % pour la VVh-7 et la LVVh-7 respectivement, cette différence de rendement étant logique au vue de l'hydrophobie légèrement plus élevée de la LVVh-7 que celle de la VVh-7. En outre, il apparait que l'octane-sulfonate permet une meilleure extraction des deux hémorphines que l' hexane- ou l'heptane-sulfonate, avec 5 à 20 % de rendement d'extraction en plus selon les conditions : la formation de paires d'ions avec un agent possédant une chaine hydrophobe plus longue favorise effectivement plus fortement le partage vers la phase organique.

Les figures 20 et 21 (b) montrent qu'un meilleur enrichissement qu'en extraction sans agent est obtenu pour les deux hémorphines, quelque que soit le pH de la phase aqueuse et l'alkyl-sulfonate utilisé. Cependant, lorsque l'extraction est réalisée en conditions acides, le facteur d'enrichissement est plus faible qu'à pH basique, en raison de l'extraction simultanée de plusieurs fractions peptidiques dans la phase organique (voir profils chromatographiques de la figure 19). Le nombre de fractions peptidiques extraites diminue fortement avec l'augmentation du pH, dû à la disparition des charges positives présentes dans les résidus arginine, lysine et histidine et de l'apparition de charges négatives dans les résidus acides glutamique et aspartique, ce qui limite fortement la formation de paires d'ions avec les sulfonates.

Concernant la LVVh-7, une amélioration du facteur d'enrichissement est observée du pH 3 jusqu'aux pH basiques avec les trois alkyl-sulfonates, avec un meilleur enrichissement pour l'agent en C6, puis en C7 et enfin en C8. Pour la VVh-7, l'hexane-sulfonate permet d'obtenir les meilleurs facteurs d'enrichissement aux pH 3 et 4, suivi des agents octane- et heptane-sulfonate, tandis que pour les pH supérieurs à 5, les meilleurs facteurs d'enrichissement sont obtenus avec l'heptane-sulfonate, puis avec les agents en C6 et C8.

Une comparaison des rendements d'extraction des hémorphines, obtenus lors des expériences réalisées avec les alkyl-sulfonates dans le mélange eau/octan-1-ol, a été faite avec ceux obtenus dans le système eau/butan-2-ol – octan-1-ol par Froidevaux *et coll. (*2001). Seulement 10 % des hémorphines étaient extraites par le mélange butan-2-ol – octan-1-ol à pH 3 alors que 40 à 50 % de rendement d'extraction ont été obtenus pour le même pH lorsque l'extraction s'effectue en présence d' hexane-, d'heptane- ou d'octane-sulfonate. Ainsi, l'extraction assistée par paires d'ions appliquée à des hydrolysats peptidiques complexes,

issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine, a permis d'accroître fortement le rendement d'extraction de deux peptides opioïdes. Il est cependant important de considérer, en vue de déterminer les meilleures conditions d'extraction des hémorphines, la combinaison de la longueur de la chaîne carbonée de l'agent surfactant et du pH de la phase aqueuse sur le rendement d'extraction et sur le facteur d'enrichissement des hémorphines. Pour un meilleur rendement d'extraction, il faut favoriser les conditions où les hémorphines sont le plus extraites : avec l'agent octane-sulfonate, à pH 3 pour la VVh-7 et aux pH 4 ou 5 pour la LVVh-7. Si on cherche à purifier les peptides opioïdes, on favorisera les conditions où l'enrichissement, et donc la sélectivité, sont les meilleures : là les possibilités sont multiples en fonction de l'objectif en rendement d'extraction que l'on souhaite conserver car en se rapprochant des pH basiques on gagne en sélectivité ce qu'on perd en rendement. Un bon compromis entre rendement et sélectivité peut se situer dans le choix de l'octane-sulfonate aux pH entre 5 et 7 pour les deux hémorphines.

La comparaison des coefficients de partage des hémorphines est présentée dans le tableau 14, pour les cas d'une extraction témoin, d'une extraction dans les meilleures conditions avec l'octane-sulfonate décrites juste au dessus et pour les cas relevés lors des expériences de Froidevaux *et coll.* (2006 et 2008) où le coefficient de partage des hémorphines, dans un système eau/butan-2-ol/octan-1-ol (45/45/10) sans agent surfactant fut mesuré.

	Sans agent	**Avec agent**	**Froidevaux *et coll.* (2006 et 2008)**
Coefficient de partage de la LVVh-7	0,04 +/- 0,01	1,64 +/- 0,10	0,33
Coefficient de partage de la VVh-7	0,03 +/- 0,01	1,60 +/- 0,15	0,31

Tableau 14. Coefficient de partage des hémorphines avec ou sans agent formateur de paires d'ions et dans les conditions de Froidevaux et coll. (2006 et 2008).

On observe une haute valeur du coefficient de partage dans le cas d'extractions avec l'alkyl-sulfonate, avec une augmentation d'environ 40 fois pour la phase organique de ces valeurs comparé aux expériences sans agent formateur de paires d'ions et aux travaux antérieurs. Cette comparaison montre bien qu'en présence d'alkyle sulfonate, le peptide a une meilleure affinité pour l'octan-1-ol que pour la phase aqueuse.

3. Extraction liquide-liquide assistée par paires d'ions associée à un contacteur à membrane

L'objectif de cette étude était de coupler le système d'extraction liquide-liquide assistée par paires d'ions étudié précédemment à un contacteur à membrane, pour profiter de la bonne sélectivité précédemment observée et l'associer à une montée en échelle du système. L'introduction d'une membrane à notre système permettait également d'introduire de nouveaux paramètres de sélectivité, tels que le seuil de coupure et la nature de la membrane.

3.1. Choix des conditions opératoires

L'hydrolysat de D.H. 3 % est retenu pour la suite des expériences car sa population peptidique variée en terme de taille moléculaire (de 1000 à 7000 Da) permettrait d'observer l'impact des caractéristiques de la membrane, notamment son seuil de coupure à 10 kDa, sur l'extraction des peptides. Comme annoncé au **III.A.2.1.1.**, seul le solvant octan-1-ol sera étudié dans un souci de compatibilité chimique avec les matériaux des membranes.

Choix de la méthode de décoloration

Nous avons comparé deux méthodes : un protocole de décoloration par ultrafiltration et un protocole de décoloration par précipitation en abaissant le pH (**II.1.6.**), dont le principe repose sur la différence entre le pHi de l'hème et des peptides en solution qui ne doivent alors pas précipiter au même pH.

Plusieurs choix dans les conditions opératoires utilisées dans le système de micro-extraction biphasique directe étudié précédemment mettaient en évidence un trouble dans la solution d'hydrolysat. En travaillant à de plus gros volumes pour les expériences avec le contacteur à membrane, une forte précipitation fut observée. Les analyses en C.L.H.P.-P.I. ont alors permis d'estimer une perte en peptides dans l'hydrolysat de départ d'environ 90 %. Pour que l'expérience se déroule dans de meilleures conditions, et pour éviter que la formation d'un précipité colmate la membrane d'ultrafiltration, nous avons cherché à réduire la proportion d'hème dans l'hydrolysat de départ tout en conservant un maximum de peptides (des phénomènes similaires d'agrégats hème-peptides colmatant une membrane d'UF avaient déjà été observés par Lebrun *et coll.* (1998)).

Les profils chromatographiques des hydrolysats avant et après les protocoles de décoloration sont présentés dans la figure 22. Le tableau 15 récapitule les quantités restantes en hème, peptides et au total d'hydrolysat après décoloration.

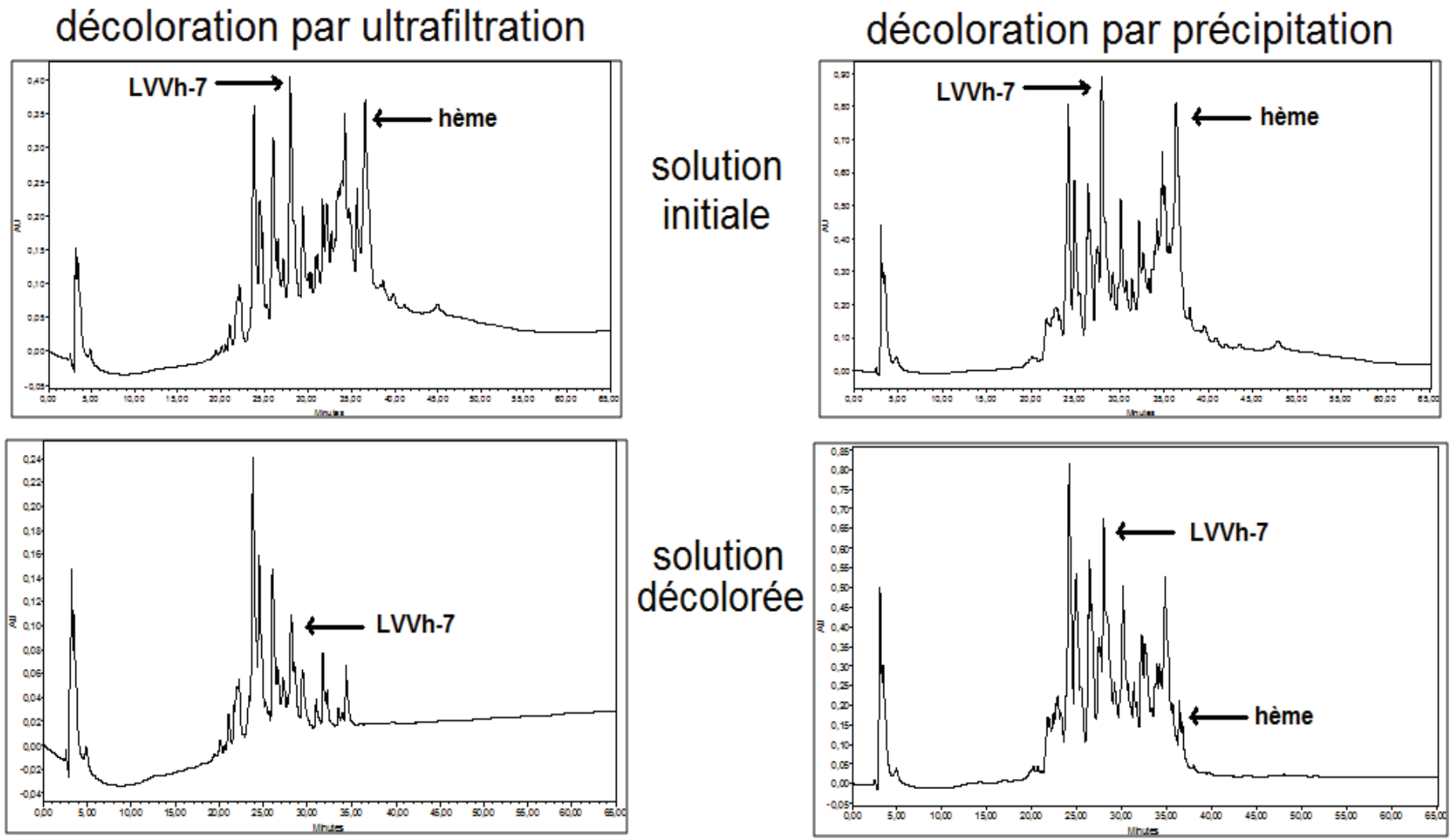


Figure 22. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. des hydrolysats de D.H. 3 % avant et après le traitement de décoloration par la méthode d'ultrafiltration et de précipitation par abaissement de pH.

Traitement	$R_{total\ en\ peptides}$ (%)	R_{LVVh-7} (%)	Hème éliminé (%)
Ultrafiltration	25,5	20,2	99,7
Précipitation par pH	80,4	90,8	91,6

Tableau 15. Rendements de récupération totale en peptides, en LVVh-7 et d'élimination de l'hème dans les solutions, après traitement de décoloration par ultrafiltration ou par précipitation par pH.

Les profils chromatographiques montraient, dans le cas de l'ultrafiltration, qu'il ne restait plus que 25,5 % de la population peptidique initialement présente dans l'hydrolysat. Les peptides de poids moléculaire important (figure 8, partie **II.2.2.**), les plus hydrophobes (avec un temps de rétention en C.H.L.P.-P.I. plus grand), étaient stoppés par la membrane. Ceci permettait d'éliminer presque totalement l'hème de l'hydrolysat filtré, mais notre peptide témoin, l'hémorphine LVVh-7, n'était plus présent dans le milieu qu'à hauteur de 20,2 %.

Dans le cas de la décoloration par abaissement du pH, l'hème n'est pas totalement éliminé, il en reste dans le surnageant 8,4 %. Mais plus de 80 % de l'ensemble de la population peptidique est conservée en solution, et plus de 90 % du peptide d'intérêt.

Nous choisissons donc de retenir la méthode de décoloration par précipitation en abaissant le pH car il permet, en éliminant plus de 90 % d'hème, de conserver une population peptidique variée en quantité importante, dont le peptide témoin LVVh-7.

Choix de l'agent surfactant et du pH

Les expériences d'extractions liquide-liquide assistées par paires d'ions de la partie précédente ont permis de mettre en évidence l'existence d'un compromis à trouver entre le rendement d'extraction et l'enrichissement. Mais il faut ajouter à cela la contrainte de la précipitation des peptides. En effet, le peu d'hème restant en solution est particulièrement sensible aux perturbations dans son environnement aqueux : l'ajout de l'agent formateur de paires d'ions, les conditions de pH peuvent provoquer une précipitation, et donc une perte en peptides.

Nous avons choisi de fixer le pH à 3 car à ce pH la formation des paires d'ions est favorisée : les rendements observés dans les expériences précédentes en micro-extraction étaient parmi les plus élevés, mais l'enrichissement, pas très bon, pourrait toutefois être amélioré en ajoutant une nouvelle sélectivité liée au seuil de coupure de la membrane.

Différents agents alkyls sulfonates furent ensuite testés en analysant leur comportement en phase aqueuse et en extraction dans l'octan-1-ol par C.L.H.P.-P.I.. Les concentrations en LVVh-7 mesurées sont présentées dans la figure 23.

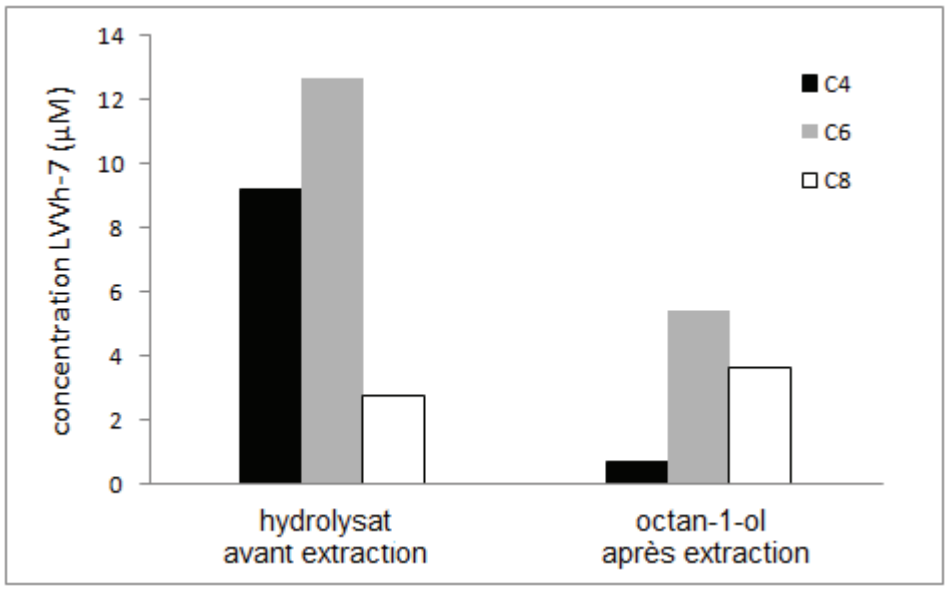


Figure 23. Concentrations en LVVh-7 dans l'hydrolysat décoloré avant extraction et dans l'octan-1-ol après extraction pour les agents butane, hexane et octane-sulfonates (50 mM).

Dans l'hydrolysat à pH 3 avec l'agent alkyl-sulfonate, un précipité se formait avec l'agent en C8, ce qui explique la forte chute de concentration en LVVh-7 observée. Dans l'octan-1-ol après extraction, l'agent en C4 n'autorisait qu'un faible rendement d'extraction. L'hexane sulfonate apparaissait alors comme la meilleure option tant en terme de stabilité en solution qu'en efficacité d'extraction.

3.2. Expériences témoins

Une série d'expériences témoins fut réalisée pour aborder, étape par étape, l'influence des membranes sur notre système complexe. Nous avons étudié l'influence de la membrane en simple procédé d'ultrafiltration de l'hydrolysat, de l'hydrolysat avec l'agent formateur de paires d'ions en solution, puis en extraction liquide-liquide en présence d'agent dans le contacteur membranaire.

Ultrafiltration de l'hydrolysat seul

Cette opération consistait en une filtration simple de l'hydrolysat telle que décrit au **III.A.1.2.1.**, afin d'observer l'impact de la membrane en fibres creuse en PES (G.E. Healthcare) et PS (Koch) d'un seuil de coupure de 10 kDa sur la population peptidique. Les profils chromatographiques des filtrats issus de l'ultrafiltration par les membranes en PES et PS sont présentés dans la figure 24 et les rendements de récupération sont présentés dans le tableau 16.

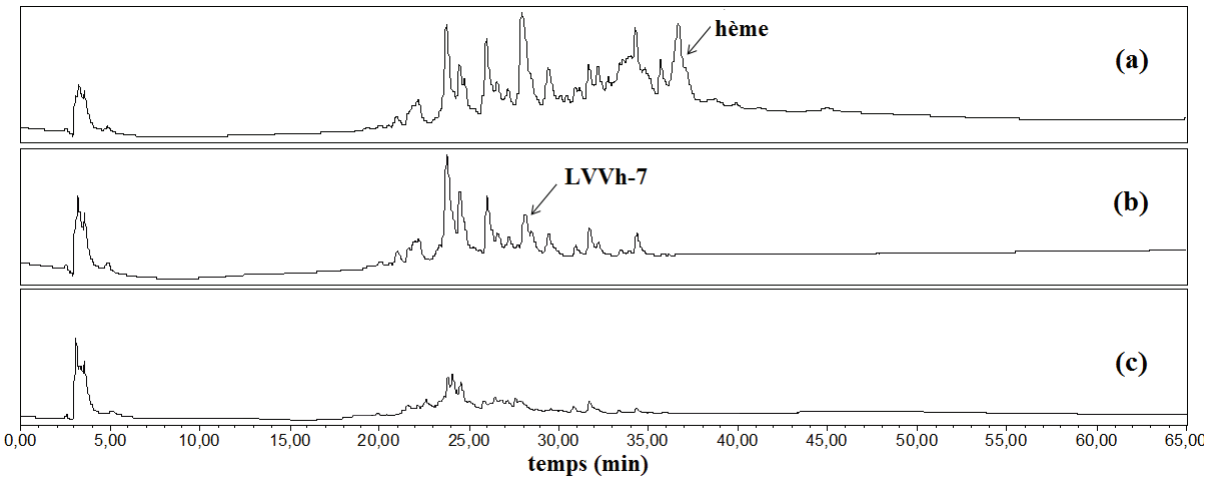


Figure 24. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. de l'hydrolysat décoloré (a) et des filtrats sur la membrane en (b) PES et (c) PS à pH 3.

Ultrafiltration	**$R_{total\ en\ peptides}$ (%)**	**R_{LVVh-7} (%)**	**Hème éliminé (%)**
Membrane en PES	25,5	20,2	99,7
Membrane en PS	11,2	6,2	99,9

Tableau 16. Rendements de récupération totale en peptides, en hème et en LVVh-7 dans les solutions après ultrafiltration sur membrane en PES ou PS.

Les deux membranes présentaient un fort taux de rejet : la population peptidique n'est retrouvée dans le filtrat qu'à hauteur de 25,5 % et 11,2 % pour les membranes en PES et PS respectivement. De la même manière, le peptide témoin LVVh-7 est mieux récupéré avec la membrane en PES qu'avec celle en PS.

Cette sélection au passage à travers la membrane peut être influencée par deux phénomènes : le seuil de coupure et la nature des membranes. Le seuil de coupure de 10 kDa des membranes empêchait les peptides de taille moléculaire plus importante de la traverser : les peptides les plus grands (population peptidique allant jusqu'à 7000 Da dans cet hydrolysat de D.H. 3%, (figure 8, partie **II.2.2.**)) et ceux agrégés avec l'hème, particulièrement les plus hydrophobes, peuvent former des associations de plus grande taille et être retenus à l'interface. A cela peuvent s'ajouter des phénomènes d'interactions peptide-membrane : le matériau PS étant sensiblement plus hydrophobe que le PES (Gourley *et coll*., 1994), l'affinité avec les peptides hydrophobes, et donc en particulier avec la LVVh-7, peut ralentir son transfert ou même aboutir à un phénomène d'adsorption.

Ultrafiltration de l'hydrolysat avec l'agent formateur de paires d'ions

Le même système que précédemment fut étudié mais en ajoutant cette fois l'hexane sulfonate (50 mM) au milieu aqueux. Les profils chromatographiques des filtrats issus de l'ultrafiltration par les membranes en PES et PS sont présentés dans la figure 25. Les rendements de récupération sont présentés dans le tableau 17.

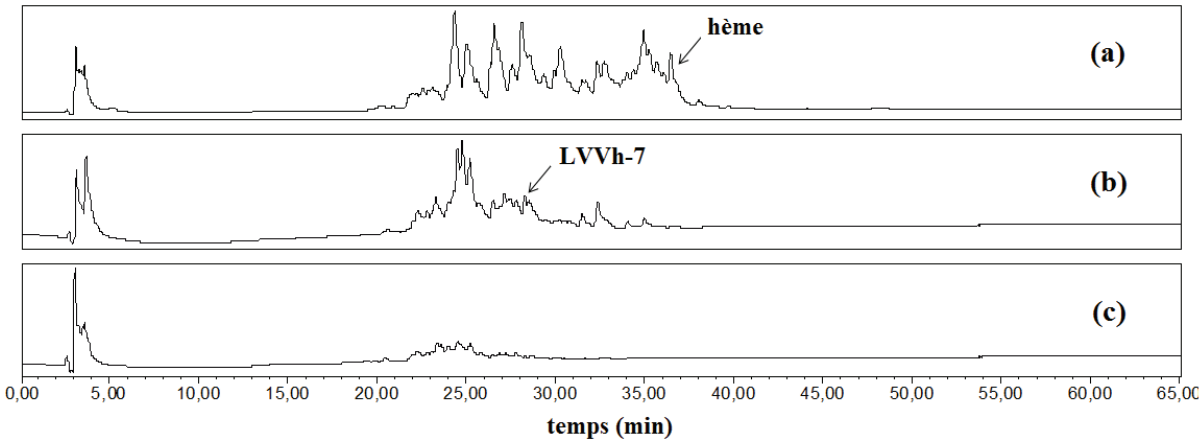


Figure 25. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. de l'hydrolysat décoloré (a) et des filtrats sur la membrane en (b) PES et (c) PS à pH 3 avec l'agent hexane-sulfonate.

Ultrafiltration	**$R_{total\ en\ peptides}$ (%)**	**R_{LVVh-7} (%)**	**Hème éliminé (%)**
Membrane en PES	27,4	13,3	99,8
Membrane en PS	2,9	3,2	99,9

Tableau 17. *Rendements de récupération totale en peptides, en hème et en LVVh-7 dans les solutions contenant de l'hexane sulfonate après ultrafiltration sur membrane en PES ou PS.*

Les taux de passage sont du même ordre de grandeur avec la membrane en PES pour l'hème et la population générale de peptides que pour la filtration sans paires d'ions observée dans la partie précédente. Une baisse sensible est observée pour la LVVh-7 avec la membrane en PES, tout comme l'ensemble des taux de passages avec la membrane en PS. Ceci peut s'expliquer par la formation de paires d'ions peptide-agent, en plus des agrégats hème-peptide existants déjà en solution : la formation de paires d'ions rend l'association peptide-agent globalement neutre, ce qui diminue son hydrophilie. Son affinité pour la membrane pourrait ainsi être plus prononcée, ce qui peut ralentir, voire empêcher son transfert. Cet effet se fait d'autant plus remarquer avec le peptide LVVh-7, plus hydrophobe que la moyenne de la population peptidique et qui, par l'ajout d'une chaîne carbonée hydrophobe supplémentaire et la neutralisation d'une partie de ses charges, marque d'autant plus son caractère hydrophobe.

3.3. Extraction biphasique via un contacteur à membrane

L'hydrolysat décoloré est ensuite amené à pH 3 en présence d'hexane sulfonate et est placé, via le contacteur à membrane en interface, en contact avec l'octan-1-ol dans un montage à contre-courant. Les profils chromatographiques des phases extraites aux temps finaux de l'expérience (27 h pour la membrane en PES, 48 h pour la membrane en PS) sont présentés dans la figure 26. On n'observe pas la présence d'hème en phase organique. La membrane a effectivement empêché l'extraction de l'hème grâce à une rétention liée au seuil de coupure de la membrane. La figure 27 présente l'évolution de la concentration en LVVh-7 au cours du temps pour les deux expériences.

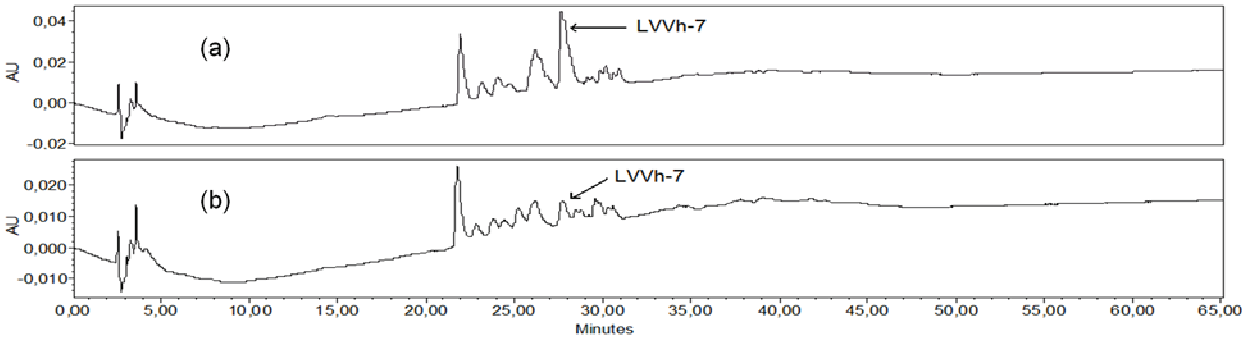


Figure 26. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. des phases organiques aux temps finaux pour (a) la membrane en PES et (b) la membrane en PS.

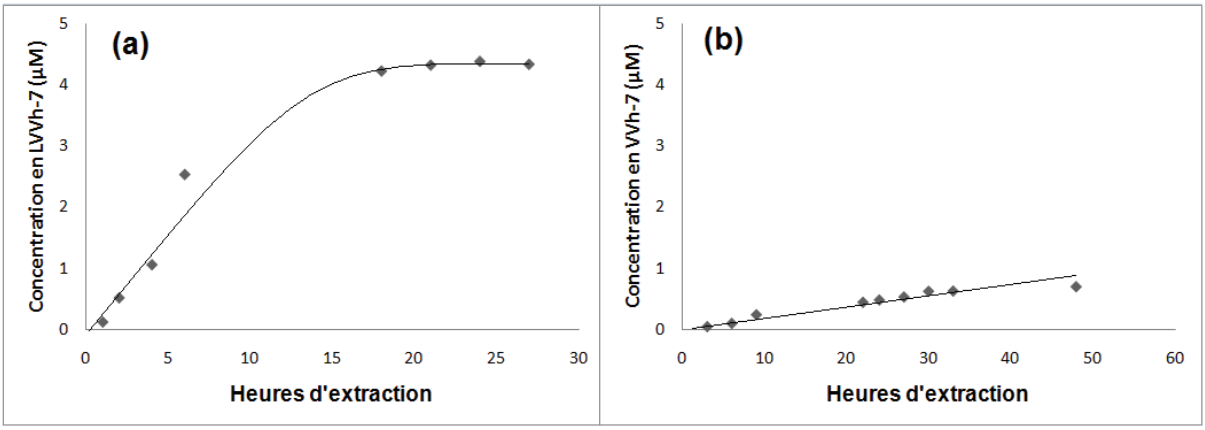


Figure 27. Evolution de l'extraction de LVVh-7 en phase organique en fonction du temps pour les membranes d'ultrafiltration en (a) PES et en (b) PS.

On remarque que l'extraction avec la membrane en PES est plus rapide qu'avec la membrane en PS. Nous obtenons, pour la membrane en PES, une vitesse de transfert de la LVVh-7 de $3{,}32.10^{-6}$ M/h.m² avec un équilibre de concentration atteint entre les deux phases au bout de 15 h de traitement, et une concentration finale en LVVh-7 de 4,3 µM (rendement de 13,9 %, enrichissement de 12,8 par rapport à l'hydrolysat initial). Le transfert avec la membrane en PS est plus lent, avec une vitesse de transfert de $1{,}67.10^{-8}$ M/h.m² pour une concentration finale en LVVh-7 de 0,71 µM (rendement de 5.0 %, enrichissement de 3,85). Après 48 h de traitement, l'état stationnaire ne semble pas atteint (R^2 = 0,89 pour la droite de

régression de la pente ; le dernier point à 48 h est insuffisant pour être significatif sur l'équilibre).

Les différences observées entre les deux membranes peuvent être dues à leur nature différente, le PS étant sensiblement plus hydrophobe que les PES. Les peptides opioïdes tels que la LVVh-7 sont relativement hydrophobes (environ 1700 cal/mol selon l'échelle de Bigelow (1967)), ce qui peut expliquer leur plus grande affinité pour la membrane en PS, et donc ralentir leur transfert. Dans les deux cas cependant, le matériau membranaire aura tendance à adsorber les peptides (Gourley *et coll*., 1994), ce qui peut expliquer les faibles vitesses de migration.

Le tableau 18 récapitule les rendements d'extraction et les enrichissements des différents protocoles d'extraction étudiés.

			LVVh-7	
Protocole d'extraction	**Référence dans la partie III.A.**	**Membrane**	**Rendement (%)**	**Enrichissement**
Directe, en octan-1-ol	**2.4.**	-	40,5	18,9
Supportée, en octan-1-ol avec C6	**3.3**	PES	13,9	12,8
		PS	5,0	3,85
Filtration simple, avec C6	**3.2**	PES	13,3	-
		PS	3,2	-
Filtration simple, hydrolysat seul	**3.2**	PES	20,2	-
		PS	6,2	-

Tableau 18. Tableau récapitulatif des rendements et enrichissements des différents protocoles d'extraction de la LVVh-7 à pH 3.

Les rendements d'extraction sont plus faibles qu'en extraction liquide-liquide directe. Ceci peut être lié aux taux de passage des membranes observés dans la partie précédente : en effet, les membranes retiennent, par leur seuil de coupure et suivant le protocole employé, une part importante du peptide cible LVVh-7. Cette sélectivité supplémentaire permet toutefois de conserver de bon enrichissement, notamment avec la membrane en PES.

Conclusion

L'association d'un contacteur à membrane pour supporter l'interface eau/octan-1-ol au procédé d'extraction sélective assistée par paires d'ions étudiées précédemment permit, à partir d'un hydrolysat partiellement décoloré, d'extraire une fraction peptidique contenant le peptide opioïde LVV-hémorphine-7.

L'extraction avec une membrane en PES permet d'atteindre un état stationnaire plus rapidement qu'avec une membrane en PS. Ces méthodes d'extraction liquide-liquide

supportées par des membranes restent toutefois plus lentes que les méthodes d'extraction directe où l'équilibre était déjà atteint après 6 h (Bromberg et Klibanov, 1994). Les interactions, notamment liées à la taille moléculaire des peptides (seuil de coupure de la membrane) et à leur hydrophobie ainsi que celle de la membrane, entraine une baisse des rendements d'extraction malgré l'augmentation de la surface d'échange, mais permet de conserver une bonne sélectivité.

Conclusion

Nous avons réussi à extraire d'un mélange complexe les peptides opioïdes LVV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-7 dans des solvants organiques, l'octan-1-ol et le DCM, grâce à la formation de paires d'ions avec des alkyl-sulfonates.

L'étude des conditions expérimentales (pH de la solution aqueuse, nature du solvant, longueur de la chaîne carbonée de l'agent surfactant) ont permis de favoriser l'affinité des peptides hydrophobes cibles pour la phase organique : leur coefficient de partage fut multiplié par 40. La recherche d'un compromis entre le rendement d'extraction et ratio d'enrichissement fut mis en évidence lors des variations du pH, les pH faibles favorisant un bon rendement d'extraction tandis que l'enrichissement était meilleur pour des valeurs de pH élevées.

Cette première étape permit la mise en œuvre d'un système d'extraction biphasique supporté par un contacteur à membrane. L'introduction de membranes pour pouvoir monter en échelle ne permit cependant pas d'obtenir de meilleurs rendements d'extraction, les interactions entre les peptides hydrophobes avec l'agent surfactant, l'hème et la membrane étant multiples. La membrane en PES présentait toutefois des caractéristiques plus intéressantes que celle en PS, la vitesse de transfert du peptide opioïde y étant près de 200 fois supérieure, et l'enrichissement en LVVh-7 restait intéressant à pH faible.

Les paramètres physico-chimiques ont donc un rôle prépondérant dans le bon niveau d'extraction des peptides. L'hydrophobie en premier lieu : nos peptides cibles sont plus hydrophobes que la moyenne de la population peptidique, et celle-ci est renforcée par la formation de la paire d'ions. Mais cette caractéristique peut également avoir une influence négative sur le transfert, notamment dans le cas de membranes d'ultrafiltration qui peuvent adsorber ces associations hydrophobes ou ralentir leur transfert. La membrane ajoute une sélectivité au transfert des peptides et des différentes associations de ceux-ci avec l'agent surfactant ou l'hème, en jouant sur la taille moléculaire via le seuil de coupure de celle-ci. Enfin le choix du solvant d'extraction permet, par sa nature et ses propriétés, de favoriser l'équilibre de partage des peptides et d'effectuer ainsi une sélection supplémentaire.

M. Vanhoute, R. Froidevaux, A. Vanvlassenbroeck, D. Lecouturier, P. Dhulster, D. Guillochon, Ion-pairing separation of bioactive peptides using an aqueous/octan-1-ol micro-extraction system from bovine haemoglobin complex hydrolysates, *Journal of chromatography B 877*, 2009, 1683-1688.

Journal of Chromatography B, 877 (2009) 1683–1688

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Ion-pairing separation of bioactive peptides using an aqueous/octan-1-ol micro-extraction system from bovine haemoglobin complex hydrolysates

Mathieu Vanhoute, Renato Froidevaux*, Aurelien Vanvlassenbroeck, Didier Lecouturier, Pascal Dhulster, Didier Guillochon

Laboratoire de Procédés Biologiques en génie Enzymatique et Microbien, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 October 2008
Accepted 1 April 2009
Available online 9 April 2009

Keywords:
Ion-pair micro-extraction
Liquid/liquid biphasic system
Haemoglobin
Peptides
Haemorphins

ABSTRACT

The ion-pair concept was applied on complex haemoglobin hydrolysates to extract two opioid peptides, LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7, in an aqueous/octan-1-ol micro-extraction system in the presence of alkyl-sulfonic acid as a surfactant agent and in relation to the haemorphin physico-chemical properties (charge, hydrophobicity). The effect of combined alkyl chain length/aqueous phase pH and the haem behaviour during the extraction, on the haemorphin recovery yield and enrichment has been determined. It has proved that transport over the organic phase is mediated by the alkyl-sulfonic acids, whatever be the aqueous phase pH. However, increasing both the alkyl chain length and the pH in the aqueous phase shows an haemorphin enrichment ratio increase but a recovery decrease of the extracted opioid peptides in the organic phase. Therefore, the best conditions to extract LVVh-7 and VVh-7 are the use of the octane-sulfonic acid at aqueous phase pH of 5 or 7 and the octane or the heptane-sulfonic acid with an aqueous phase pH of 5 or 7 respectively. In these conditions, a partition coefficient of 1.64 and 1.60 respectively for LVVh-7 and VVh-7 are obtained and represent about 40 times that acquired without agent.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Enzymatic hydrolysis of proteins is widely used in the food industry to improve functional properties such as solubility, emulsification, gelation and taste, or to prepare extensively hydrolysed proteins for hypoallergenic infant diets and nutritional therapy [1,2]. More recently the pharmaceutical and food industries have shown increasing interest in peptides derived from protein hydrolysates as components of functional foods [3,4]. Much research has focused on the isolation of peptides derived from various protein sources (milk, soya, fish, ...). Numerous biologically active peptides (antihypertensive, opioid, antibacterial, ...) have already been obtained by hydrolysis of casein, soya proteins, gluten, tuna myoglobin and others [3–11].

The preparation of such peptides or peptide-containing fractions generally required laborious chromatographic steps including pre-fractionation methods as gel filtration and reverse phase liquid chromatography [12,13]. Therefore, replacement of even one column chromatographic operation by a simple-yet effective-separation step in an overall purification scheme could significantly reduce the expense of producing peptides of interest. Moreover, development of processes to prepare pure active peptides or enriched active peptide fractions is very difficult because these peptides are in a very complex mixture, i.e. an hydrolysate containing more than hundred peptides whose sequence is different.

LVV-haemorphin-7 (LVVh-7) and VV-haemorphin-7 (VVh-7) were isolated and characterized for the first time in our laboratory [14]. These peptides correspond respectively to residues 31–40 (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) and 32–40 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe) of bovine haemoglobin β-chain. The hydrophobic properties of these two peptides, via their sequences, have allowed their solubilisation in aliphatic alcohol mixture butan-2-ol and octan-1-ol. Mixture design has then been used to improve the extraction of LVVh-7 and VVh-7 in the course of the haemoglobin hydrolysis by pepsin at pH 3 by a mixture of butan-2-ol and octan-1-ol. A biphasic system composed of 45% water, 45% butan-2-ol and 10% octan-1-ol was proposed [15]. However, even if a good selectivity was obtained, with only four extracted peptides including the two haemorphins, low extraction recovery was observed due to the low haemorphin partition coefficient (about 0.32).

Hydrophobic ion pair has been often used for non-aqueous enzyme reactions [14–16] or enhanced protein stability in organic solvent [17,18]. Major advantage of hydrophobic ion-pairing is to

* Corresponding author at: Laboratoire de Procédés Biologiques en génie Enzymatique et Microbien, Polytech'Lille, Boulevard Paul Langevin, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. Tel.: +33 03 28 76 73 90; fax: +33 03 28 76 73 81.
E-mail address: renato.froidevaux@univ-lille1.fr (R. Froidevaux).

1570-0232/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jchromb.2009.04.011

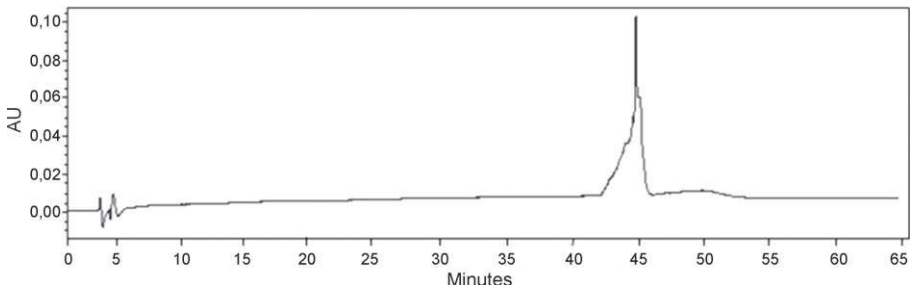


Fig. 1. RP-HPLC profile of octan-1-ol. 50 μL of organic solvent were fractionated on C4-column.

increase the lipophilicity of hydrophilic molecules [17,19]. Another strategy has also been developed for the separation of peptides or proteins by ionic-pairing with amphipathic molecules [20–23]. Hydrophobically modified peptides or proteins allowed the increase of their extraction in organic solvent. For mixtures containing more than hundred different peptides, this strategy appears a good means to separate peptides by modifying their hydrophobicity thanks to ion pair agent–peptide complex formation and in using liquid/liquid medium to selectively extract some bioactive peptides. To allow this study, two opioid peptides, LVV-haemorphin-7 and VV-haemorphin-7, have been chosen because previous studies have shown that these peptides can be selectively extracted in a biphasic system containing butan-2-ol–octan-1-ol but a very low partition coefficient is obtained [24,25]. Therefore, ion-pairing extraction has been applied with alkyl-sulfonic acids, chosen as acidic amphipathic surface-active agents, to increase the lipophilicity of the active peptides via hydrophobic ion-pairing. Action of the alkyl-sulfonic acid counter anions as lipophilicity modulator at different pH and with different alkyl chain lengths, and a partition coefficient comparison with and without alkyl-sulfonic acid have been discussed in previous studies [24,25] and have demonstrated the potential of this system for selective extraction of peptides.

2. Experimental procedure

2.1. Materials

All common chemicals and solvents were of analytical grade from commercial sources. Bovine haemoglobin was spray-dried beef haemoglobin powder from Vapran SA (France). Pig pepsin [E.C. 232-629-3, 3260 UAE/mg solid] and alkyl-sulfonic acid sodium salts were purchased from Sigma. Acetonitrile was of HPLC grade. All aqueous HPLC eluent were degassed with helium.

2.2. Hydrolysate preparation

Bovine haemoglobin hydrolysis by pepsin was performed at 23 °C at pH 3 with pH-stat. Haemoglobin solution (2%, w/v) was incubated with pig pepsin (E/S = 2.5%, w/w) for 2.5 min and 10 h. Reaction was stopped by inactivating pepsin by increasing the pH to 10 with 5 M NaOH.

2.3. Determination of the haemoglobin hydrolysis degree

The degree of hydrolysis was defined as the ratio of the number of peptide bonds cleaved to the total number of peptide bonds in haemoglobin determined by the trinitrobenzene sulphonate method [30]. 2.5 min and 10 h of hydrolysis by pepsin corresponded to DH 3% and 15% respectively [26].

2.4. Haemorphin ion-pair micro-extraction

Ion-pair micro-extraction was carried out in a liquid–liquid biphasic system, with aqueous and organic phases at equal volumes (400 μL). The aqueous phase contained the DH 3% or 15% hydrolysate (1%, w/v) and alkyl-sulfonic acid with a 6, 7 or 8 carbon chain length (50 mM), in the presence of 50 mM phosphate solution. Alkyl-sulfonic acid with 9 carbons or more were not

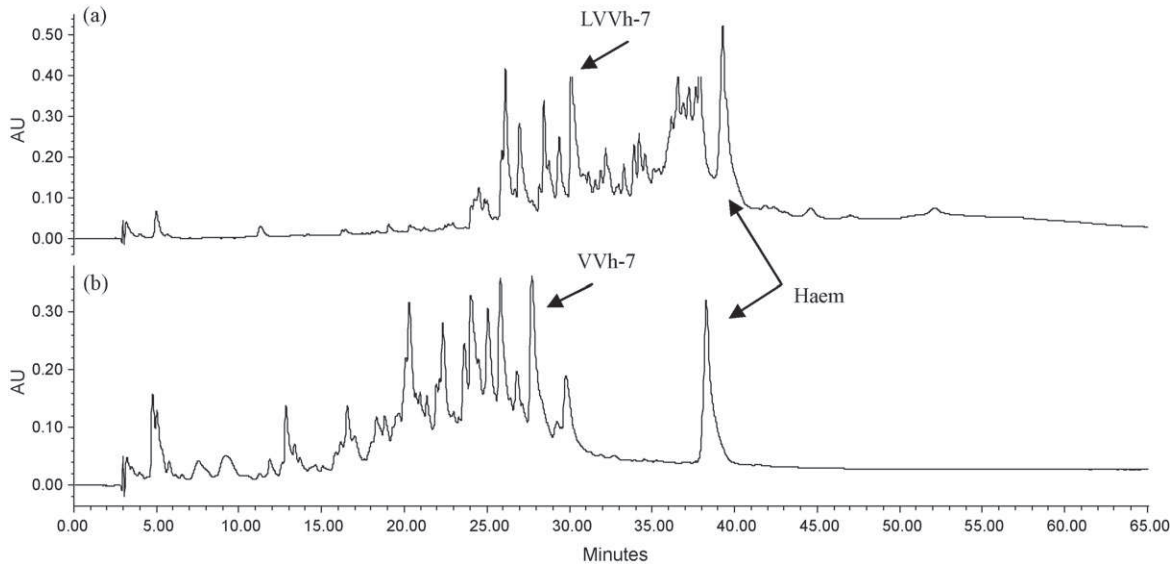


Fig. 2. RP-HPLC profiles of peptidic hydrolysates at (a) 3% and (b) 15% of hydrolysis degree. 40 μL of solution (1%, w/v) were fractionated on C4-column.

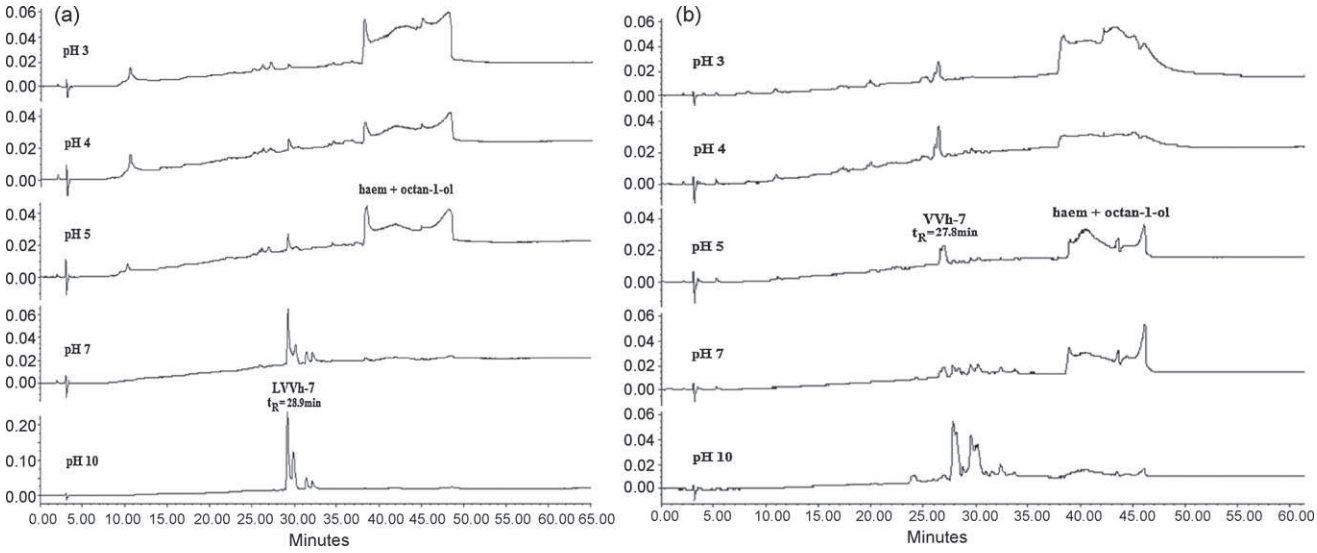


Fig. 3. RP-HPLC profiles of the organic phases after ion-pair micro-extraction without alkyl-sulfonic acids and at pH 3, 4, 5, 7 and 10 with the (a) DH 3% hydrolysate and (b) DH 15% hydrolysate. 100 μL of organic phase were fractionated on C4-column.

applicable because of their bad solubility in aqueous solution. pH from 3 to 10 was adjusted with HCl or NaOH. Below pH 3, haem present in the hydrolysate immediately precipitate causing a loss of peptides in solution. The organic phase was composed of octan-1-ol. The extraction was performed at room temperature for 12 h (preliminary studies have shown that there was no difference in extraction recovery between 6 and 24 h) on a Rotator SB3 (Stuart®) at 17 rpm. After extraction, the sample was centrifuged at 5000 rpm for 10 min, and the organic phase was collected and directly analysed by RP-HPLC. For all experiments, LVVh-7 and VVh-7 extraction yields and enrichments were determined for DH 3% and 15% respectively.

2.5. Analytical methods

2.5.1. RP-HPLC analysis

HPLC apparatus consisted of a Waters 600^E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 17 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC Image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyse chromatographic data. All the chromatographic process was performed with a Vydac C4-column (250 mm × 4.6 mm internal diameter). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:1, by volume) as eluent B. The flow rate was 1 mL/min. The gradient applied was 0–67% (v/v) B over 30 min then 67–87% (v/v) B over 35 min. On-line instantaneous UV absorbance scans were performed between 200 and 395 nm with photodiode array detector at a rate of one spectrum every second. The resolution was 1.2 nm.

2.5.2. Haemorphin and haem quantification

Identification and quantification of expected haemorphins and haem in the organic phases were carried out by UV-spectral comparison and standard curves with the Millennium software, as described previously [24]. Distortion of the octan-1-ol peak shape (retention time about 45 min) did not influence haemorphin detec-

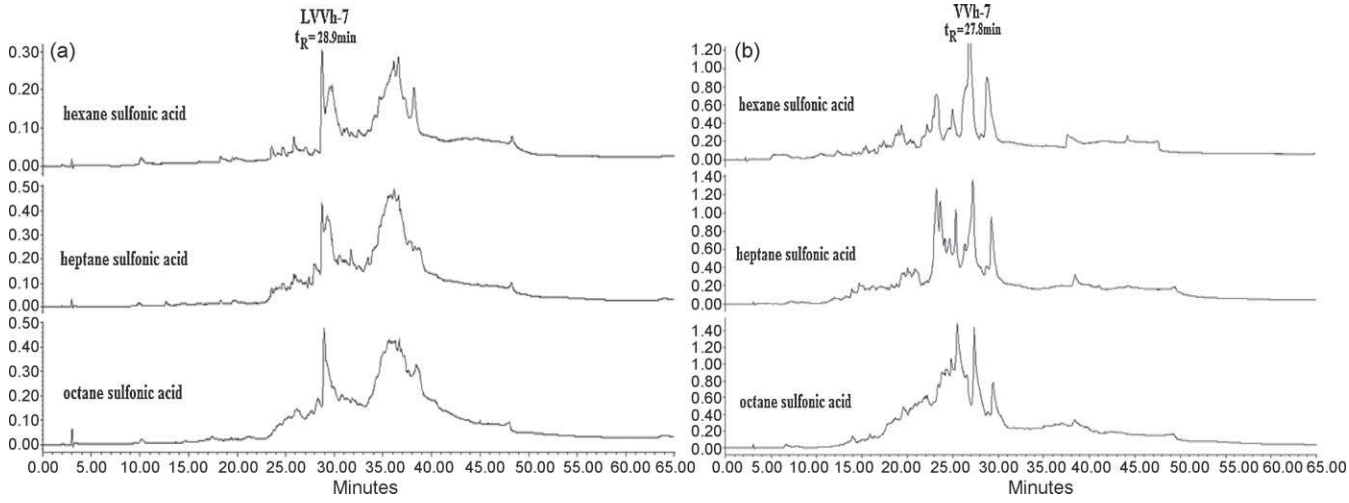


Fig. 4. RP-HPLC profiles of the organic phases after ion-pair micro-extraction in the presence of hexane, heptane or octane-sulfonic acid and at pH 3 with the (a) DH 3% hydrolysate and (b) DH 15% hydrolysate. 100 μL of organic phase were fractionated on C4-column.

tion and quantification by the Millennium software. Fig. 1 shows a peak with a retention time of about 45 min which corresponds to the octan-1-ol solvent.

2.6. Response measurement

The enrichment ratio (ER) and recovery (R) of the haemorphins were the response variables used to analyse the experiments.

The haemorphin ER was calculated using Eq. (1):

$$\mathrm{ER} = \frac{[(\%_h)_{\mathrm{final}}]_O}{[(\%_h)_{\mathrm{initial}}]_A} \quad (1)$$

- $[(\%_h)_{\mathrm{final}}]_O$ (percentage of haemorphin in final organic phase) is the ratio of the haemorphin-containing fraction area in the organic phase after ion-pair extraction on the extracted peptide total area in the organic phase after the extraction.
- $[(\%_h)_{\mathrm{initial}}]_A$ (percentage of haemorphin in initial aqueous phase) is the ratio of the haemorphin-containing fraction area in the aqueous phase before the extraction on the peptide total area in the aqueous phase before ion-pair extraction.

Therefore, the ER factor is an evaluation of the purification degree of extracted haemorphin in the organic phase and it allows to determine the selectivity of the extraction system.

The haemorphin R (%) was evaluated with Eq. (2):

$$R = \frac{[(C_h)_{\mathrm{final}}]_O}{[(C_h)_{\mathrm{initial}}]_A} \times \left(\frac{V_O}{V_A}\right) \times 100 \quad (2)$$

where $[(C_h)_{\mathrm{final}}]_O$ is the haemorphin concentration in the organic phase after ion-pair extraction, $[(C_h)_{\mathrm{initial}}]_A$ is the haemorphin concentration in the aqueous phase before the extraction and V_O and V_A are the volumes of the organic and aqueous phase respectively (in our experiments the volumes are equal).

It was also possible to obtain a high haemorphin R but a low ER because many other peptides are extracted in the organic phase with the haemorphins.

All areas were obtained thanks to the Millennium software and all calculations were carried out using three parallel determinations.

3. Results and discussion

3.1. Recovery in the absence of alkyl-sulfonic acids

The experiment was carried out to check if some peptides in the absence of a carrier ion can pass the liquid–liquid interface. The tested hydrolysates were a DH 3% hydrolysate for LVVh-7 and a DH 15% for VVh-7 because these opioid peptides are predominantly present in these peptidic mixtures [9]. Extraction was performed with octan-1-ol as the organic phase because it is a water immiscible solvent and it is the reference for the determination of the partition coefficient of biomolecules [27]. Moreover, alcohol solvents have shown a better extraction towards the two haemorphins than solvents less polar [28]. The aqueous pH varied from 3 to 10 and the ionic strength was maintained thanks to 50 mM of phosphate salt during the extraction. Fig. 2 shows chromatographic profiles of the DH 3% and 15% hydrolysates respectively. Haem molecule was detected with a retention time of 38.4 min. LVVh-7 was detected in DH 3% hydrolysate with a retention time of 28.9 min and VVh-7 in DH 15% hydrolysate with a retention time of 27.8 min. These peptides contained an arginine basic residue in their sequence and had a hydrophobicity of about 1700 cal/mol, as the Bigelow scale [27], which was a high value compared with the average hydrophobicity of peptides produced during haemoglobin hydrolysis by pepsin which is about 1000 cal/mol. Moreover, these haemorphins were present in some very complex peptidic mixtures which contained more than hundreds of peptides with different sequence [29].

Fig. 3 shows chromatographic profiles of the organic phases after ion-pair micro-extraction in the absence of alkyl-sulfonic acids at pH 3, 4, 5, 7 and 10 and for DH 3% (Fig. 3a) and DH 15% (Fig. 3b) hydrolysates respectively. Haem was extracted in the octan-1-ol phase and was detected at a retention time of 37 min: its quantity decreased when the aqueous pH increased. Haem structure contains carboxyl groups which were not ionized at acidic pH and therefore increased its hydrophobicity. However, when the aqueous phase was at basic pH, less haem was extracted because of the carboxyl groups ionization.

Few peptides were extracted at acidic aqueous phase pH for each hydrolysate, whereas the extracted peptide number increased when the pH value is upper or equal to 7. Among these peptides, LVVh-7 (RT about 29 min) and VVh-7 (RT about 28 min) were present in the organic phase for the respective studied 3% and 15% hydrolysates. Their increase could be explained by their high hydrophobicity.

In the following studies, it was supposed that the alkyl-sulfonic acid adding could mediate the haemorphin transport in the organic phase and also improve their extraction.

3.2. Effect of combined alkyl chain length and pH on haemorphin partitioning

The objective of this study was to determine the effect of the combination of alkyl chain length and aqueous pH on the haemorphin recovery by ion-pair extraction. Variation in extraction time and organic solvent polarity were not considered. However, preliminary studies have shown that there was no difference in extraction recovery between 6 and 24 h. At this stage, it was decided to investigate extraction recoveries and enrichment only by varying chemical parameters. This study allowed also to choose conditions to prepare LVVh-7 and VVh-7 by extraction assisted by ion-pairing with an alkyl-sulfonic acid.

Therefore, ion-pair extraction of haemorphins was carried out in a water/octan-1-ol biphasic system at room temperature and during 12 h. The aqueous phase contained the DH 3% or 15% hydrolysate and alkyl-sulfonic acid with different carbon numbers (6, 7 or 8), in the presence of 50 mM phosphate salt to maintain an ionic strength during the extraction. Although there are an almost unlimited number of possible carrier candidates, alkyl-sulfonic acids were chosen as they have proved their ion-pair mediated transport capability for cationic substances [30]. The pH of the aqueous phase varied from 3 to 10. It was emphasized that the amounts of alkyl-sulfonic acids employed in the experiments were well below the critical micelle concentration [31]; thus, the haemorphin extraction behaviour was distinct from that observed for micellar systems.

Fig. 4 shows an example of chromatographic profiles of organic phase after ion-pair micro-extraction at pH 3 on DH 3% (Fig. 4a) and 15% (Fig. 4b) hydrolysates respectively and with hexane, heptane or octane-sulfonic acid. It was observed that, for each tested surfactant agent, LVVh-7 and VVh-7 were extracted with the respective DH 3% and 15% hydrolysates (retention times of 27.5 min for LVVh-7 and 25.5 min for VVh-7). Haem was also extracted in the organic phases with a retention time of 37 min.

Chromatographic profiles, issuing from the experiments at different pH and with each surfactant agent, have allowed to evaluate the effect of the alkyl chain length/pH combination by the determination of the haemorphin recovery (R) and the haemorphin enrichment ratio (ER) in the organic phase, as it is explained in Section 2. Figs. 5 and 6 show the respective LVVh-7 and VVh-7 R (Figs. 5a and 6a) and ER (Figs. 5b and 6b) evolutions in the organic phase as a function of pH and in the presence of hexane, heptane or octane-sulfonic acid. The ER is an evaluation of the ion-pair micro-

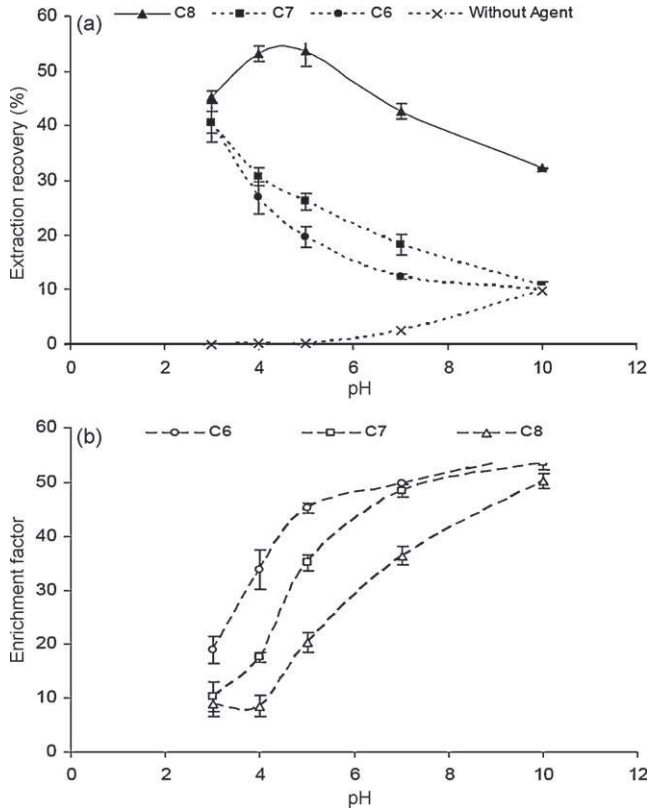


Fig. 5. LVVh-7 recovery (a) and enrichment ratio (b) by ion-pair micro-extraction in function of pH on a DH 3% peptic hydrolysate in a water/octan-1-ol biphasic system and in the presence of hexane, heptane and octane-sulfonic acid. All values are mean ± standard deviation based on three determinations.

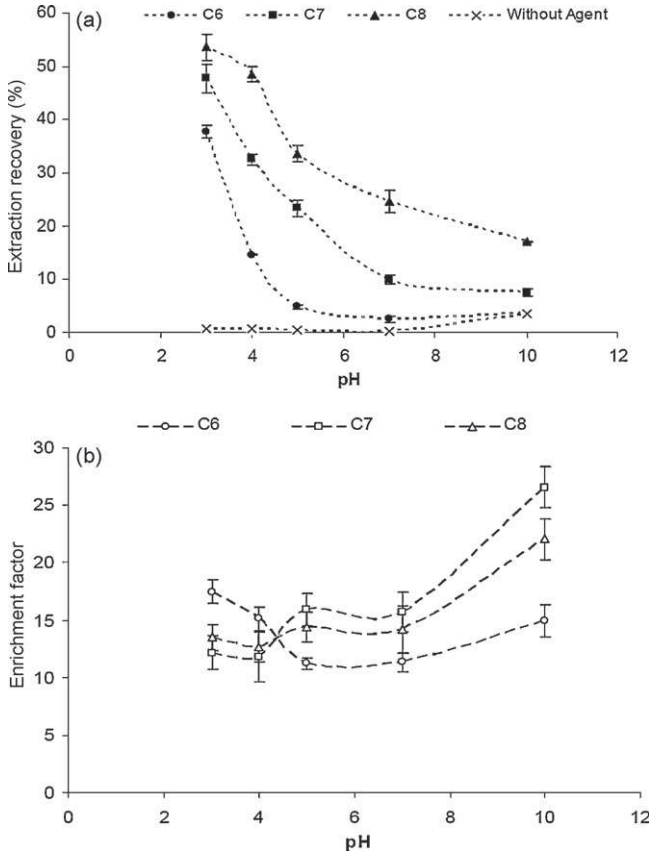


Fig. 6. VVh-7 recovery (a) and enrichment ratio (b) by ion-pair micro-extraction in function of pH on a DH 15% peptic hydrolysate in a water/octan-1-ol biphasic system and in the presence of hexane, heptane and octane-sulfonic acid. All values are mean ± standard deviation based on three determinations.

extraction system selectivity because it defined the purification degree of extracted haemorphin in the organic phase.

LVVh-7 and VVh-7 *R* evolution was compared with the experiments without surfactant agent. The alkyl-sulfonic acid adding influenced haemorphin extraction whatever the aqueous phase pH. It appeared that the octane-sulfonic acid allowed a better haemorphin extraction than the heptane and hexane-sulfonic acids from a pH value of 3, whereas a low difference was observed when the pH increased towards the value of 10.

Figs. 5b and 6b show that an ER was obtained for the two hydrolysates whatever the aqueous phase pH and the used alkyl-sulfonic acid. However, when the extraction occurred at acidic pH, a low haemorphin ER was obtained, due to the appearance of many other peptidic fractions in the octan-1-ol phase (see chromatographic profiles in Fig. 4). This peptidic fraction number was much reduced when the aqueous phase pH increased, due to the positive charge disappearance in the side-chain of arginine, lysine and histidine residues and the negative charge appearance in the side-chain of aspartic and glutamic acids present in the two haemorphins.

In the objective to determine the best conditions of haemorphin extraction, it was important to consider both the effect of the alkyl chain length/pH combination and the haem behaviour during the extraction, on the haemorphin *R* and ER responses. Therefore, the extraction occurred with the octane-sulfonic acid at pH 5 or 7 and with heptanes or octane-sulfonic acid at pH 5 or 7 appeared to be a good compromise for LVVh-7 and VVh-7 respectively.

A comparison of the haemorphin partition coefficients has been realized (Table 1) with alkyl-sulfonic acid in the best extraction conditions, without alkyl-sulfonic acid addition and with previous studies where the extraction occurred in an aqueous/butan-2-ol–octan-1-ol biphasic medium [24,25]. It is observed a high partition coefficient increased when the extraction occurred in the presence of the alkyl-sulfonic acid, with an improvement of about 40 times the values for each haemorphin compared with experiments without ion-pairing agent, and a 5 time improvement compared with the previous studies [24,25]. These comparisons demonstrated the effective extraction of the opioid peptides thanks to the alkyl-sulfonic agent using and the real potential of the peptide selective separation acquired with ion-pairing extraction in controlled liquid/liquid biphasic medium.

Table 1
Partition coefficients of the haemorphins with and without alkyl-sulfonic acid and in Refs. [24,25] conditions. Mean and standard deviation (S.D.) based on three determinations.

	Without agent	With agent	Refs. [24,25]
LVVh-7 partition coefficient	0.04 ± 0.01	1.64 ± 0.10	0.33
VVh-7 partition coefficient	0.03 ± 0.01	1.60 ± 0.15	0.31

4. Conclusion and perspectives

Ion-pairing concept was applied on peptic hydrolysates issue from bovine haemoglobin in a water/octan-1-ol biphasic system and in the presence of alkyl-sulfonic acids. This study allowed to show the feasibility of ion-pairing on LVVh-7 and VVh-7 extraction from complex peptidic hydrolysates. It has also showed that the alkyl chain length/aqueous phase pH combination, and the haem behaviour during extraction, had an effect on the haemorphin recovery and enrichment ratio.

The researches have shown that the conditions for optimal recovery varied from peptide to peptide. Therefore, the best conditions to extract LVVh-7, allowing convenient enrichment ratio and yield and the absence of haem precipitation, would be the use of octane-sulfonic acid at aqueous phase pH of 5 or 7. For VVh-7, the best conditions would be the use of the octane or the heptane-sulfonic acid and an aqueous phase pH of 5 or 7. In these conditions, the partition coefficient of each haemorphin has been improvement about 40 times compared to those without agents.

Separation of haemorphins by ion-pairing with amphipathic alkyl-sulfonic acids, in a liquid/liquid biphasic system and from bovine haemoglobin complex peptic hydrolysates, also appeared as an efficient alternative to the fractionation with chromatographic methods. Moreover, although there are many more conditions which might be tested (other negatively charged counter-ions or counter-ion concentration), it is obvious that there is a large potential in this system for selective extraction of peptides.

Recovery of extracted haemorphin by evaporation of the octan-1-ol appears to be very difficult, owing to the high boiling temperature of the solvent (about 195 °C). Previously, aluminium oxide support has allowed to haemorphin and haem separate in a butan-2-ol–octan-1-ol mixture [25]. This support could be tested to haemorphin recover in the octan-1-ol organic phase after ion-pairing extraction.

Acknowledgements

We would like to thank Mrs. Christine Vanuxem for reviewing the English manuscript. This work was supported by grants from Nord-Pas-de-Calais Region.

References

[1] H. Meisel, Livest. Prod. Sci. 50 (1997) 125.
[2] H. Meisel, E. Schlimme, Kieler Milchw. Forsch. 48 (1996) 343.
[3] V. Brantl, C. Gramsch, F. Lottspeich, R. Mertz, K.H. Jaeger, A. Herz, Eur. J. Pharmacol. 125 (1986) 309.
[4] N. Barkhudaryan, J. Kellerman, A. Goloyan, F. Lottspeich, FEBS Lett. 329 (1993) 215.
[5] J.M. Piot, Q. Zhao, D. Guillochon, G. Ricart, D. Thomas, Biochem. Biophys. Res. Commun. 189 (1992) 101.
[6] I. Aubes-Dufau, J. Capdevielle, J.L. Seris, D. Combes, FEBS Lett. 364 (1995) 115.
[7] I. Lovsin-Kukman, M. Zelenik-Blatnik, V. Abram, J. Chromatogr. A. 704 (1995) 113.
[8] L. Lemieux, R.E. Simard, Lait 71 (1991) 599.
[9] B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, Biotechnol. Appl. Biochem. 29 (1999) 25.
[10] R. Froidevaux, F. Krier, N. Nedjar-Arroume, D. Vercaigne-Marko, E. Kosciarz, C. Ruckebusch, P. Dhulster, D. Guillochon, FEBS Lett. 491 (1–2) (2001) 159.
[11] R. Daoud, V. Dubois, L. Bors-Dodita, N. Nedjar-Arroume, F. Krier, N. Chihib, P. Mary, M. Kouach, G. Briand, D. Guillochon, Peptides 26 (5) (2005) 713.
[12] J.M. Piot, D. Guillochon, Q.Y. Zhao, G. Ricart, B. Fournet, D. Thomas, J. Chromatogr. 481 (2001) 221.
[13] L. Choisnard, D. Durand, D. Vercaigne-Marko, N. Nedjar-Arroume, P. Dhulster, D. Guillochon, Biotechnol. Appl. Biochem. 34 (2001) 173.
[14] V.M. Paradkar, J.S. Dordick, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 5009.
[15] B.S. Kendrick, J.D. Meyer, J.E. Matsuura, J.F. Carpenter, M.C. Manning, Arch. Biochem. Biophys. 347 (1997) 113.
[16] D.H. Altreuter, J.S. Dordick, D.S. Clark, Biotechnol. Bioeng. 81 (7) (2003) 809.
[17] J. Matsuura, M.E. Powers, M.C. Manning, E. Shefter, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 1261.
[18] J.D. Meyer, M.C. Manning, Pharm. Res. 15 (1998) 188.
[19] J.D. Meyer, J.E. Matsuura, B.S. Kendrick, E.S. Evans, G.J. Evans, M.C. Manning, Biopolymers 35 (1995) 451.
[20] A. Adjei, S. Rao, J. Garren, G. Menon, M. Vadnere, Int. J. Pharm. 90 (1993) 141.
[21] S.H. Choi, T.G. Park, Int. J. Pharm. 203 (2000) 193.
[22] H.J. Buschmann, L. Mutihac, Complexation, liquid–liquid extraction, and transport through a liquid membrane of protonated peptides using crown ethers, Anal. Chim. Acta. 466 (2002) 101–108.
[23] M. Shibue, C.T. Mant, R.S. Hodges, J. Chromatogr. A 1080 (1) (2005) 58.
[24] R. Froidevaux, D. Vercaigne-Marko, R. Kapel, D. Lecouturier, S. Chung, P. Dhulster, D. Guillochon, J. Chem. Technol. Biotechnol. 81 (2006) 1433.
[25] R. Froidevaux, M. Vanhoute, D. Lecouturier, P. Dhulster, D. Guillochon, Process Biochem. 43 (2008) 431.
[26] J. Adler-Nissen, J. Agric. Food Chem. 27 (6) (1979) 1256.
[27] C.C. Bigelow, J. Theor. Biol. 16 (1967) 187.
[28] Q. Zhao, J.M. Piot, Prep. Biochem. Biotechnol. 28 (1) (1998) 61.
[29] R. Froidevaux, B. Lignot, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, B. Coddeville, G. Ricart, J. Chromatogr. A 873 (2) (2000) 185.
[30] T.S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard, T.G. Halvorsen, K.E. Rasmussen, J. Chromatogr. A 998 (2003) 61.
[31] P. Mukerjee, K.J. Mysels, Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems, 36, National Bureau of Standards, Washington, DC, 1971.

B. Extraction de peptides par moussage-drainage

L'objectif des travaux de cette seconde section était l'exploitation du pouvoir tensioactif des peptides pour pouvoir créer, grâce à un drainage forcé, une sélection de population peptidique suite à un procédé de moussage.

Se basant sur les propriétés tensioactives des peptides présents dans les hydrolysats, la formation de mousse permettait d'entrainer une population peptidique, en fonction de son affinité, à l'interface air-liquide et dans le volume de liquide interstitiel compris entre les bulles de mousse. La nouveauté dans ce procédé de moussage est l'ajout d'un drainage forcé, c'est-à-dire l'ajout d'un volume de solution sur la mousse formée, en vue de fractionner des populations peptidiques présentant des propriétés tensioactives différentes.

Dans un premier temps, des études préliminaires par analyse des tensions de surface des hydrolysats de D.H. de 3, 15 et 23 % furent menées pour déterminer quelle concentration en hydrolysat était nécessaire pour atteindre des propriétés tensioactives stables. Des études similaires en fonction du pH permirent de fixer les conditions opératoires initiales de notre système.

Le procédé de moussage-drainage fut ensuite mis en œuvre. Le choix du D.H. de l'hydrolysat était basé sur la stabilité de la mousse, ce qui élimina l'hydrolysat de D.H. 23 %, et l'efficacité du drainage forcé, ce qui élimina l'hydrolysat de D.H. 15 %. La fraction peptidique isolée de l'hydrolysat de D.H. 3 % fut l'objet d'une recherche d'activité antimicrobienne.

L'intérêt et l'efficacité du procédé étant démontrés, nous avons étudié l'impact des différents paramètres physico-chimiques sur l'extraction. Une étude des paramètres permit de connaitre les limites de notre procédé, ce qui nous permit de mettre en place un plan d'expériences pour cribler rapidement et efficacement les 6 facteurs retenus. Le procédé fut ensuite optimisé via un second plan d'expériences centré sur les quatre paramètres dominants mis en évidence.

1. Matériels et méthodes spécifiques

1.1. Montage et protocole d'extraction par moussage-drainage

Le système présenté dans la figure 28 consiste en une colonne de verre d'un diamètre intérieur de 3,5 cm, d'une hauteur de 80 cm, le tout fermé à l'extrémité inférieure par un verre fritté de porosité n° 3. 100 ml d'hydrolysat peptidique (0,1%, p/v), dans une solution de tampon phosphate 100 mM à pH7, sont placés dans le bas de la colonne et maintenu à 25 ° C. L'air comprimé (50 mL/s) est introduit dans la solution à travers le verre fritté, ce qui entraîne la formation de mousse. Après avoir atteint une hauteur de mousse de 60 cm, l'injection de gaz est stoppée. Différents volumes de drainage (50, 100, 150 mL) de tampon phosphate 50 mM à pH 7,0 ont été appliqués à la mousse de tête de colonne, à un débit de 100 mL/min. Après un drainage de 30 minutes, la mousse de tête, qui correspond à environ 1-3 cm de hauteur de mousse, est collectée et le liquide récupéré a été analysé par C.L.H.P.-P.I..

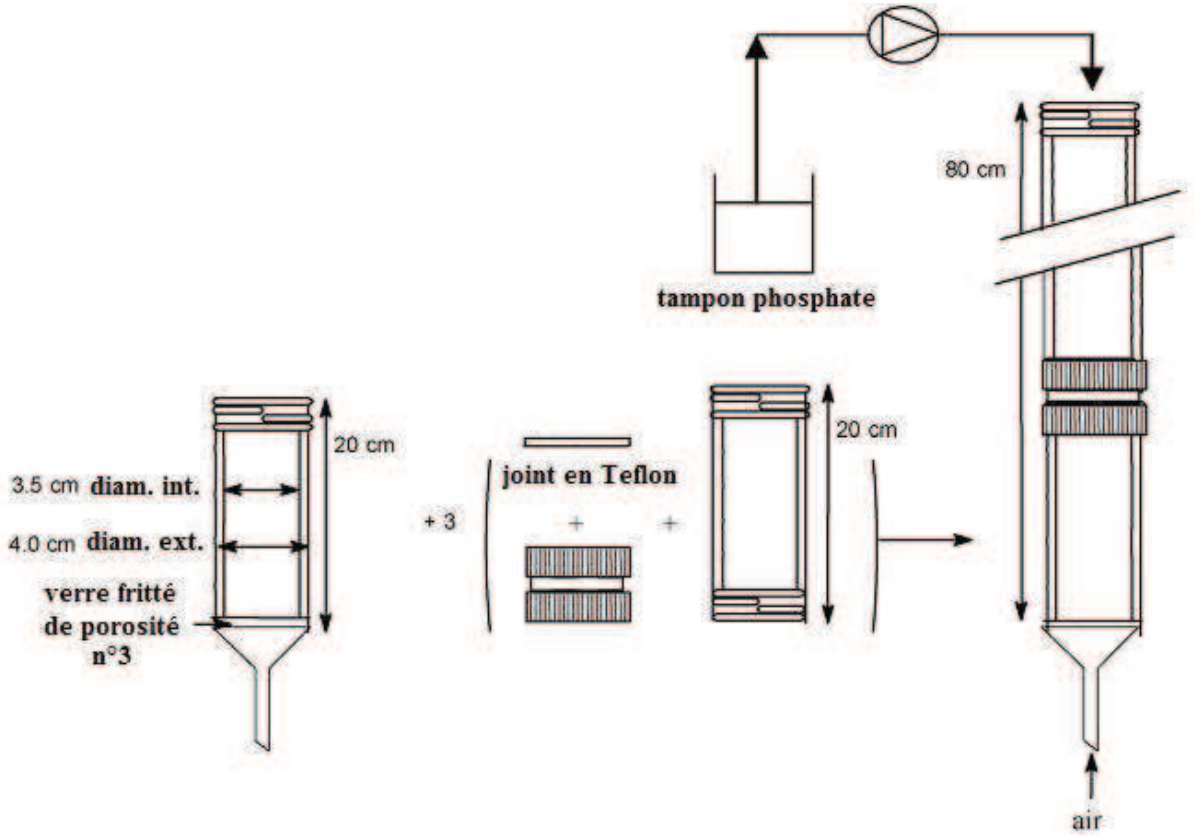


Figure 28. Schéma du montage expérimental du système de moussage-drainage : 4 manchons de verre d'une hauteur totale de 80 cm étaient connectés par une jonction SLV et un joint en Teflon.

1.2. Tests antimicrobiens

L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de Parish *et coll.* (2001). Quatre espèces de bactéries ont été utilisées comme micro-organismes témoins pour la détermination de l'activité antibactérienne : deux à Gram-négatif *(Escherichia coli* et

Salmonella enteritidis) et deux à Gram-positif *(Micrococcus luteus* A270 et *Enterococcus faecalis).* La mousse récupérée en tête de colonne après le drainage a été purifiée par C.L.H.P.-P.I. afin d'éliminer l'hème. Après évaporation des solvants au rotavapeur, environ 0,5 mg de la fraction peptidique a été obtenue. Cette quantité a été remise en suspension dans 100 µL d'un tampon phosphate de sodium à 50 mM, pH 6,5. 20 µL de cette solution peptidique a été transférée dans des puits de 5 mm de diamètre, creusés dans la couche d'agarose (1%) contenant 107 cellules bactériennes. Pour permettre la diffusion des peptides, les boîtes de Petri ont d'abord été mises à incuber dans une étuve humide pendant 3 h à 4 °C pour *M. luteus* A270 et à 37 °C pour les autres souches. Après cette période de diffusion, 10 ml de milieu Mueller-Hinton (42 g/L) contenant 1% d'agar ont été ajoutés en une couche supérieure et les plaques ont été incubées 24 h à 37 °C. L'activité antibactérienne a été mesurée par le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne par rapport à un contrôle positif qui était le chloramphénicol (1 mg/L) et à un contrôle négatif, le tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 6,5).

1.3. Plans d'expériences

1.3.1. Matrice de criblage

Un plan d'expériences fut établi sur le modèle d'une matrice d'Hadamard pour déterminer l'influence de six paramètres ou facteurs sur le fractionnement de la population peptidique. Les interactions entre les paramètres ne furent pas considérées et nous avons utilisés un modèle polynomial de premier ordre. Le modèle mathématique associé est donné par la relation (équation 5) :

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i \qquad \text{(Eq. 5)}$$

où Y est la réponse (l'enrichissement), X_i sont les variables naturelles codées du niveau du paramètre i et b_0 est la valeur réponse moyenne. Les coefficients b_i sont déterminés par la relation suivante (équation 6) :

$$b_i = \frac{1}{2} \left[M_{Xi=+1} - M_{xi=-1} \right] \qquad \text{(Eq. 6)}$$

où $M_{Xi=+1}$ est la moyenne des résultats lorsque la variable est codée au « niveau haut » +1 et $M_{xi=-1}$ est la moyenne des résultats lorsque la variable est codée au « niveau bas » -1.

1.3.2. Matrice composite

Dans le but de déterminer les valeurs des paramètres retenus permettant d'obtenir le meilleur facteur d'enrichissement, une seconde étude fut menée en utilisant un plan composite centré. Ce plan d'expériences est un plan 2^k factoriel complet où un domaine de 2^k

expériences est requis pour couvrir toutes les combinaisons de niveaux des facteurs (les niveaux hauts et bas sont codés X_i = -1 et X_i = +1 respectivement), le point central, répété pour estimer l'erreur expérimentale, et les points axiaux placés symétriquement par rapport au centre du domaine de manière à encadrer tout le domaine expérimental d'une distance α donnée par la relation :

$\alpha = \left[n_f\right]^{0.25}$ (n_f représentant le nombre de sommets du domaine étudié et est égal à 2^k ; ici α = 2)

La relation entre les échelles codée et naturelle est donnée par la relation suivante :

$u_i = u_i^0 + \Delta u_i X_i$ où u_i est la variable originale, u_i^0 est le point central de l'intervalle d'origine, X_i la variable codée et Δu_i l'échelle d'origine de l'intervalle.

Le plan d'expériences composite centré est représenté par un modèle mathématique obtenu par des régressions multiples et ajusté avec une fonction polynomiale du second ordre de la forme suivante (équation 7) :

$$y = \beta_o + \sum_i \beta_i X_i + \sum_i \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{ij} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \qquad \text{(Eq. 7)}$$

y est la matrice des réponses. Les coefficients β du modèle sont déterminés par la matrice algébrique d'après la relation (équation 8) :

$$\beta = \left(X^t X\right)^{-1} X^t y \qquad \text{(Eq. 8)}$$

X est la matrice des expériences en variables codées. X^t est la transposée de cette matrice et $\left(X^t X\right)^{-1}$ est l'inverse de la matrice produit de X^t par X. β_i est le coefficient du facteur d'effet i. β_{ij} est le coefficient d'interaction entre les facteurs i et j. β_i et β_{ij} furent calculés à l'aide du logiciel Modde 5.

2. Mise en œuvre du procédé de moussage-drainage

La figure 29 (a) montre le profil chromatographique de l'hémoglobine utilisée pour produire les hydrolysats peptidiques étudiés. La molécule d'hème est présente au temps de rétention de 37 min et les chaînes alpha et beta sont présentes aux temps de rétention compris entre 40 min et 50 min. les figures 29 (b), (c) et (d) montrent les profils chromatographiques des hydrolysats d'hémoglobine bovine aux degrés d'hydrolyse 3, 15 et 23 % respectivement, qui ont été utilisés dans notre système de moussage drainage. L'hème est toujours élué avec un temps de rétention de 37 min car il n'est pas dégradé par la pepsine. Les chaînes d'hémoglobine sont hydrolysées pour obtenir les hydrolysats peptidiques qui contiennent des peptides différents de la protéine initiale de part leur poids moléculaire, le nombre de sites ionisables et leur hydrophobie de surface. De manière générale, plus l'hydrolyse dure longtemps, plus l'hydrolysat sera hydrophile, en raison de la présence de nombreux petits peptides hydrophiles possédant plus de sites ionisables (plus de groupements terminaux amines et acides carboxyliques disponibles).

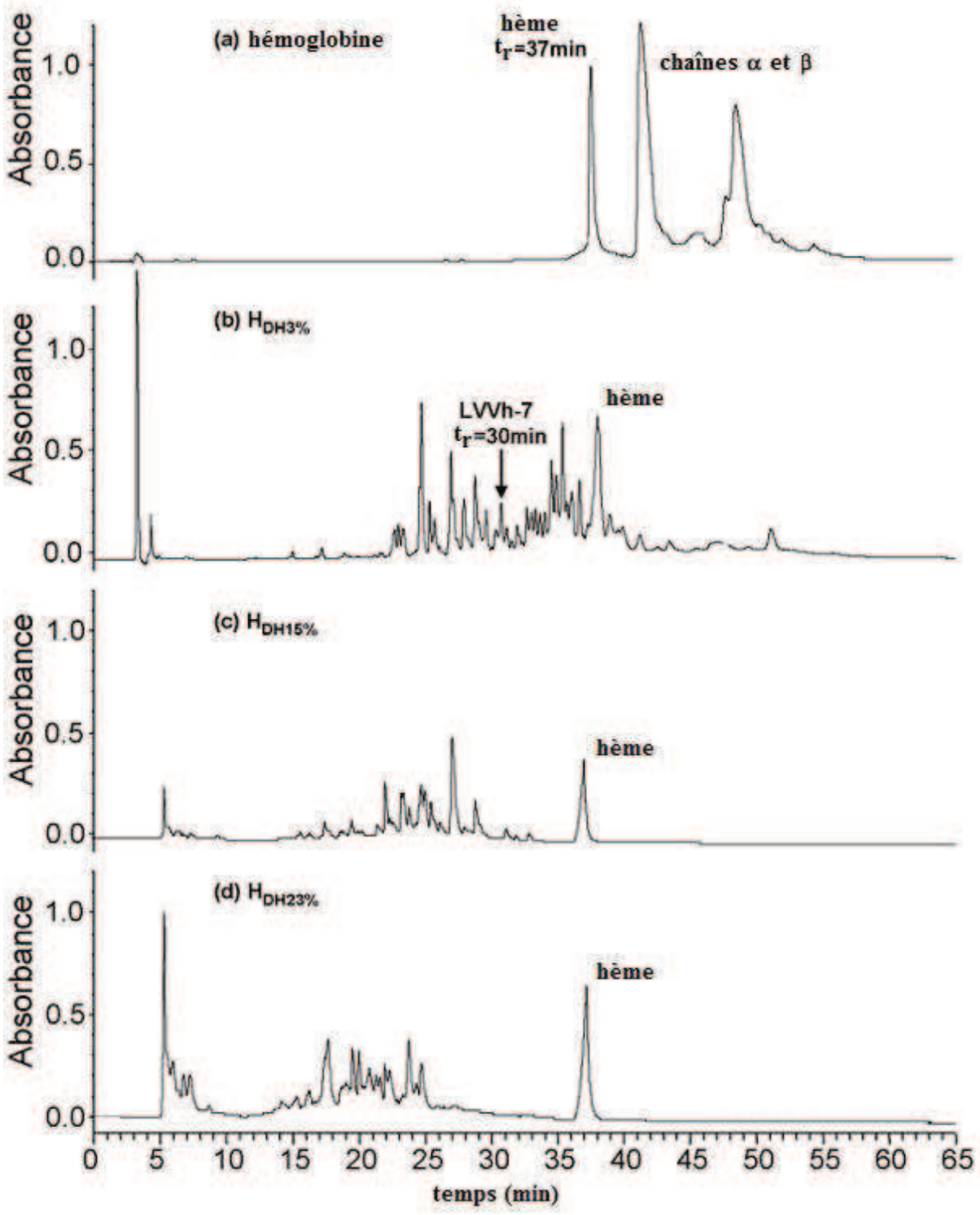


Figure 29. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. de l'hémoglobine et des hydrolysats peptidiques de D.H. 3, 15 et 23 %.

2.1. Influence de la concentration sur la tension interfaciale gaz/liquide

Cette étude a pour objectif, grâce aux mesures des tensions superficielles entre la phase aqueuse contenant les peptides et l'air, de déterminer les propriétés tensioactives de nos différents hydrolysats.

Les mesures de tensions superficielles (γ_{lv}) ont été effectuées grâce à un tensiomètre à goutte pendante comme décrit dans le matériel et méthodes. La figure 30 compare les résultats pour l'hémoglobine et les hydrolysats à 3, 15 et 23 % de D.H.. A cause de la distribution polydisperse de la taille des peptides de chaque hydrolysat, la concentration de la solution est exprimée en g/100 mL. On observe que ces courbes γ_{lv} sont de formes sigmoïdales et peuvent être modélisées mathématiquement suivant l'équation 9 (Krishnan *et coll.* (2003)) :

$$\gamma_{lv} = [(\gamma^{0}_{lv} - \gamma^{'}_{lv})/(1 + \ln(C_B{}^{\pi/2}) / \ln(C_B))^{M}] + \gamma^{'}_{lv} \qquad \text{(Eq. 9)}$$

où γ^{0}_{lv} et $\gamma^{'}_{lv}$ sont respectivement les valeurs de tensions superficielles à faible et haute concentration. C_B est la concentration de la solution d'alimentation, $Ln(C_B{}^{\pi/2})$ est le paramètre mesurant le logarithme népérien de la concentration obtenue pour la valeur $(\gamma^{0}_{lv} - \gamma^{'}_{lv})/2$. La différence entre ces valeurs extrême $(\gamma^{0}_{lv} - \gamma^{'}_{lv})$ est appelée $\pi^{max} = (\gamma^{0}_{lv} - \gamma^{'}_{lv})$ et M est un paramètre lié à la courbure de la courbe.

La figure 30 et le tableau 19 montrent que l'augmentation de la concentration en hydrolysat dans la solution d'alimentation ne change pas de manière significative la valeur de γ_{lv}, valeur stable autour de 40 $mN.m^{-1}$. En prenant en compte que $25 < \pi^{max} < 50$ $mN.m^{-1}$ soit un ordre de grandeur typique pour des surfactants tels que la plupart des tensioactifs, les solutions aqueuses d'hémoglobine et les hydrolysats sont des systèmes avec un pouvoir surfactant modéré. Cependant, pour nos applications expérimentales, les propriétés tensioactives sont suffisantes pour générer de la mousse.

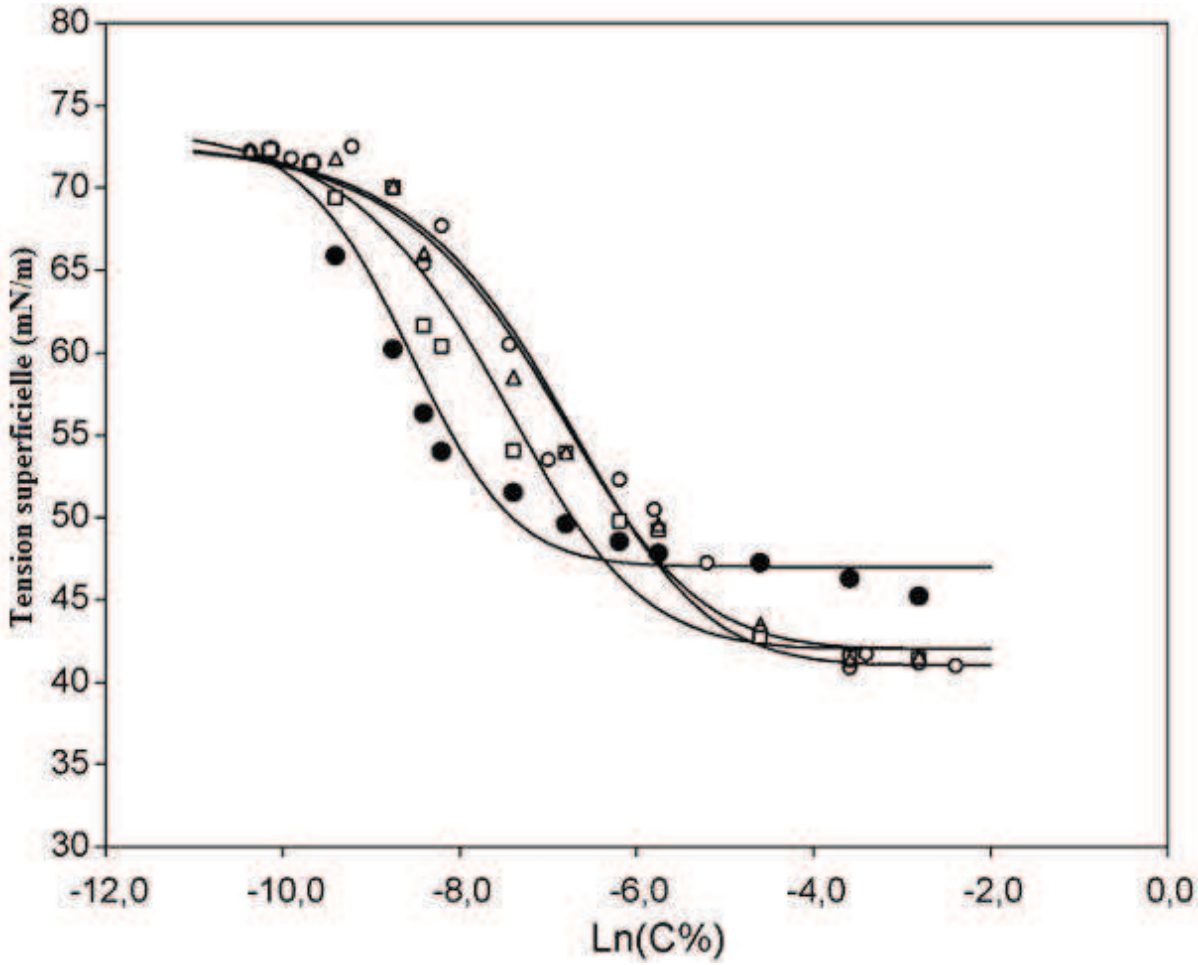


Figure 30. Tensions superficielles mesurées à pH 7 en fonction de la concentration (%, p/v) en hémoglobine (●) et en hydrolysats de D.H. 3 (○), 15 (□) et 23 (Δ) %. Courbes modélisées à l'aide des coefficients du tableau 19.

solution	γ_{lv}^{0} (mNm^{-1}) ± 1	$\gamma_{lv}^{'}$ (mNm^{-1}) ± 1	$\log(C_B^{\pi/2})$ ± 0.3	M (sans dimension) ± 2	$\pi^{max\ (a)}$ (mNm^{-1}) ± 1	$\log(C_B^{max})$ ± 0.3
Hémoglobine	74	47	-8,6	-14	27	-6.8
$Hyd._{D.H.3\%}$	73	41	-6,9	-8	32	-4.6
$Hyd._{D.H.15\%}$	74	42	-7,6	-9	32	-4.8
$Hyd._{D.H.23\%}$	73	42	-7	-8	31	-4.6

Tableau 19. Les paramètres γ_{lv}^{0}, $\gamma_{lv}^{'}$, $\log(C_B^{\pi/2})$, M et $\log(C_B^{max})$ sont obtenus à partir de la modélisation des données expérimentales des tensions superficielles en fonction de la concentration présentées dans la figure 30. C est exprimée en g/100 mL ; Hyd. : hydrolysat peptidique de D.H. de 3%, 15% et 23%.

C_B^{max} est classiquement interprétée comme la valeur de la C.M.C. pour les agents surfactants. Des valeurs de $\ln(C_B^{max})$ plus faibles pour l'hémoglobine (-6,8) que pour les hydrolysats (-4,7) montrent que l'hémoglobine se présente plus rapidement que les

hydrolysats sous forme d'agglomérat micellaire. Par contre l'hydrolyse de l'hémoglobine conduit à produire différentes populations de peptides, en fonction du degré d'hydrolyse, ce qui n'a pas d'influence sur la tension superficielle, les valeurs étant semblables pour les trois hydrolysats étudiés. Les peptides produits sont toutefois responsables d'une diminution significative de γ'_{lv} (γ'_{lv} = 47 mN.m^{-1} pour l'hémoglobine et γ'_{lv} = 42 mN.m^{-1} pour les hydrolysats) ce qui met en évidence leur pouvoir surfactant plus prononcé, probablement du à un accroissement du nombre de charges disponibles en solution, et donc de l'hydrophilie de l'ensemble.

2.2. Choix de la concentration de l'hydrolysat initial

La concentration minimale de l'hydrolysat permettant la production d'une mousse stable a été déterminée en prenant en compte la valeur de C_B^{max} dans la figure 30. Il était important de choisir une concentration supérieure à 0,01 % (p/v) ($Ln(C_B^{max})$=-4.6) dans le but de produire une mousse stable, car en-dessous de cette concentration, la mousse s'effondrait rapidement.

Bien qu'aucune différence dans les courbes γ_{lv} ne soit notable dans la figure 30, l'injection d'air dans l'hydrolysat de D.H. 23 % n'a pas permis d'obtenir une mousse stable, même avec une concentration de 1 % (p/v). Ceci était probablement dû aux faibles poids moléculaires des peptides présents dans l'hydrolysat. Ainsi, bien que ces petits peptides diffusent rapidement et peuvent s'adsorber aux interfaces, ils sont rapidement entraînés par le drainage naturel dans la mousse.

L'utilisation d'hydrolysats fortement concentrés (> 1 %, p/v) pour les D.H. de 3 et 15 %, entraînait un fractionnement de la population peptidique négligeable quelle que soit la hauteur de mousse, le profil chromatographique de la mousse en tête de colonne étant identique à celui de la mousse au pied de celle-ci après drainage. Nous avons ainsi choisi une concentration intermédiaire pour les hydrolysats de 0,1 % (p/v), ce qui nous permettait d'obtenir une mousse stable, dans une gamme de concentration qui nous permettait technologiquement d'en étudier le fractionnement.

2.3. Analyses en C.L.H.P.-P.I.

Le couplage de la C.L.H.P.-P.I. avec l'E.S.I.-S.M. effectué sur les 3 hydrolysats étudiés (Froidevaux *et coll.*, 2000), a permis de caractériser les hydrolysats produits au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine. A partir de ces résultats, un profil de distribution du poids moléculaire des peptides en fonction de leur temps de rétention a été déterminé et est présenté dans la figure 8 (partie **II.2.2.**).

L'hydrolysat de D.H. 3 % contient une fraction peptidique avec des poids moléculaires élevés (3500-7000 Da) pour des temps de rétention compris entre 30 et 35 min. Deux autres fractions peptidiques, avec des poids moléculaires compris entre 2000-3500 Da et 1500-2000

Da pour des temps de rétention respectifs compris entre 25-30 min et 20-25 min, sont également présentes et contiennent des peptides moins hydrophobes que la première fraction.

L'hydrolysat de D.H. 15 % contient une première fraction peptidique comprise entre 25 et 30 min avec des peptides d'un poids moléculaire variant entre 1500 et 2000 Da. Des peptides plus hydrophiles sont ensuite élués entre 20-25 min (1500-2500 Da), 15-20 min (1500-2000 Da), 10-15 min (500-1000 Da) et 5-10 min (500-600 Da).

Pour l'hydrolysat de D.H. 23 %, la première fraction peptidique éluée (500-1500 Da) est observée pour des temps de rétentions entre 20 et 25 min, et 3 autres fractions apparaissent entre 15-20 min (1500-2000 Da), 10-15 min (500-1000 Da) et 5-10 min (500-600 Da). Les peptides apparaissant dans les fractions ayant des temps de rétention compris entre 5 et 20 min sont les mêmes que ceux apparaissant dans l'hydrolysat 15 %. Les peptides produits à un degré d'hydrolyse de 15 % n'étaient donc plus hydrolysés par la pepsine mais s'accumulaient dans le réacteur.

Les résultats montraient que plus le D.H. augmentait, plus des peptides de petit poids moléculaires sont produits. Un fractionnement pouvait ainsi être attendu si un drainage était appliqué à la mousse, la distribution polydisperse des poids moléculaires des peptides induisant une différence d'activité de surface de ces peptides présents dans les hydrolysats.

2.4. Choix du pH de l'hydrolysat initial

Les mesures de tensions superficielles ont été réalisées sur l'hydrolysat D.H. 3 % à différentes concentration, en tampon phosphate 50 mM à pH 3 et pH 7, par la méthode de l'anneau (figure 31).

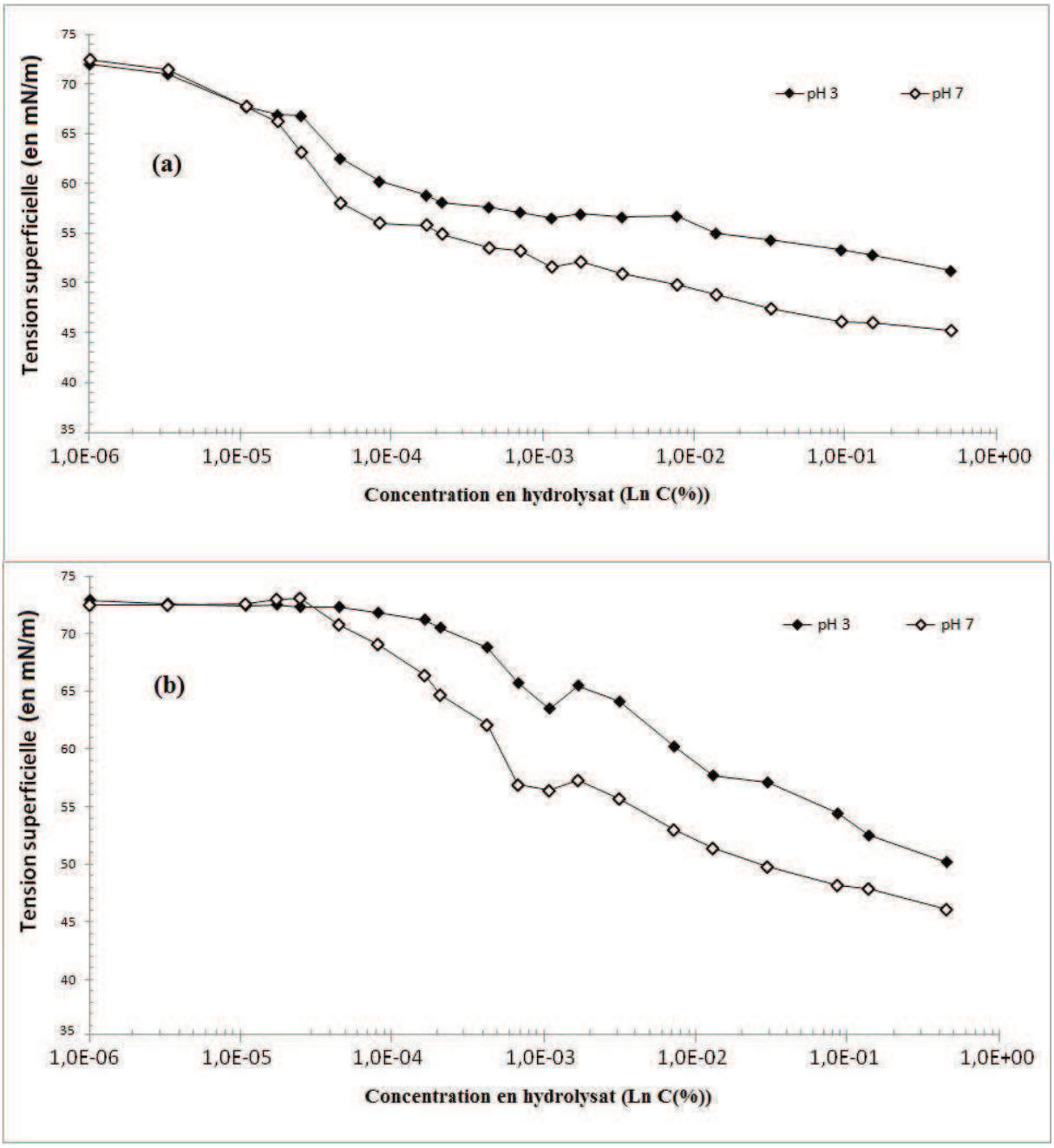


Figure 31. Évolution de la tension superficielle pour les hydrolysats D.H. (a) 3 % et (b) 15 % en fonction de leur concentration dans la solution tampon phosphate (50 mM) et de son pH.

D'après les valeurs de référence pour le tampon seul (72 à 73 mN/m), une chute des tensions superficielles est observée en fonction de la concentration en hydrolysats présents en solution. A une concentration de $3{,}7.10^{-1}$ M, les valeurs de tensions superficielles ont chuté de 23 à 30 mM/m par rapport à la valeur initiale. De plus les valeurs de tensions superficielles sont plus faibles à pH 7 qu'à pH 3. Ceci peut être dû au fait qu'à pH 3 les groupements acides carboxyliques des acides aminés ne sont plus ionisés, ce qui diminue l'hydrophilie générale des peptides tandis qu'à pH 7 ont a la présence chargée des sites carboxyliques et amines.

Ceci va dans le même sens que les résultats de la partie **2.1.** qui montraient qu'une meilleure hydrophilie présentée par la population peptidique permettait un abaissement de la

tension superficielle. Pour favoriser la formation de la mousse et au vu des résultats précédents, la valeur de pH de 7 est retenue pour la suite des expériences.

2.5. Fractionnement des hydrolysats par moussage-drainage

2.5.1. Formation de mousse et volume de drainage

Le protocole de moussage-drainage est appliqué aux trois hydrolysats testés, de D.H. de 3, 15 ou 23 %, afin de mettre en œuvre l'extraction sélective grâce à ce procédé.

Avec l'hydrolysat de D.H. 23 %, la mousse n'a pas atteint la hauteur de 60 cm dans la colonne malgré les propriétés tensioactives démontrées au **III.B.2.1.**. Ceci est probablement du au faible poids moléculaire des peptides présents dans cet hydrolysat (figure 8).

Avec les hydrolysats de D.H. 3 et 15 %, une mousse stable fut obtenue mais les profils peptidiques de la mousse de tête, obtenus par C.L.H.P.-P.I., ne montrent pas de différence de population avec celui de l'hydrolysat initial (figure 32). En effet, tous les peptides de l'hydrolysat étaient adsorbés dans la mousse, en raison des interactions entre les peptides et l'interface air/eau et aux interactions peptides-peptides entre les peptides adsorbés à l'interface et ceux situés dans le liquide interstitiel ente les bulles.

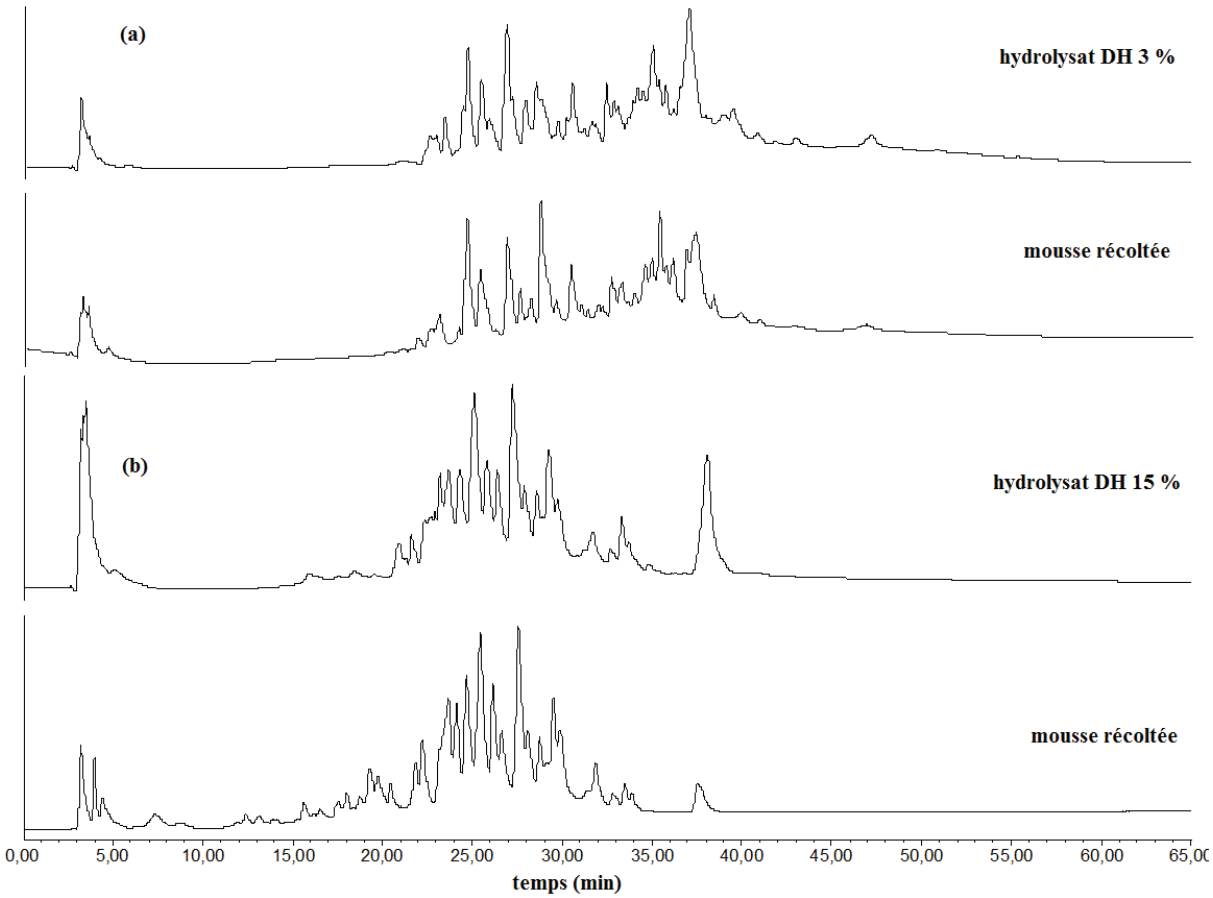


Figure 32. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. des hydrolysats initiaux de D.H. (a) 3 et (b) 15 % et de leurs fractions récoltées en tête de la colonne de mousse respectives.

Un drainage forcé de la mousse, lié au dépôt d'une solution tampon phosphate (pH 7,0) à 50 mM avec un débit continu de 100 mL/min, fut réalisé sur la mousse en tête de colonne dans le but de fractionner les peptides adsorbés. Trois volumes de drainage de 50, 100 et 150 mL furent testés. La figure 33 montre que pour l'hydrolysat de D.H. 15 %, tous les peptides sont progressivement élués de la mousse située en tête de colonne au fur et à mesure que le volume de drainage augmente. Ceci semble indiquer que les forces permettant aux peptides de se maintenir adsorbés à l'interface eau-air seraient trop faibles, probablement en raison de la faible taille moléculaire des peptides (maximum de 3500 Da, voir la figure 8).

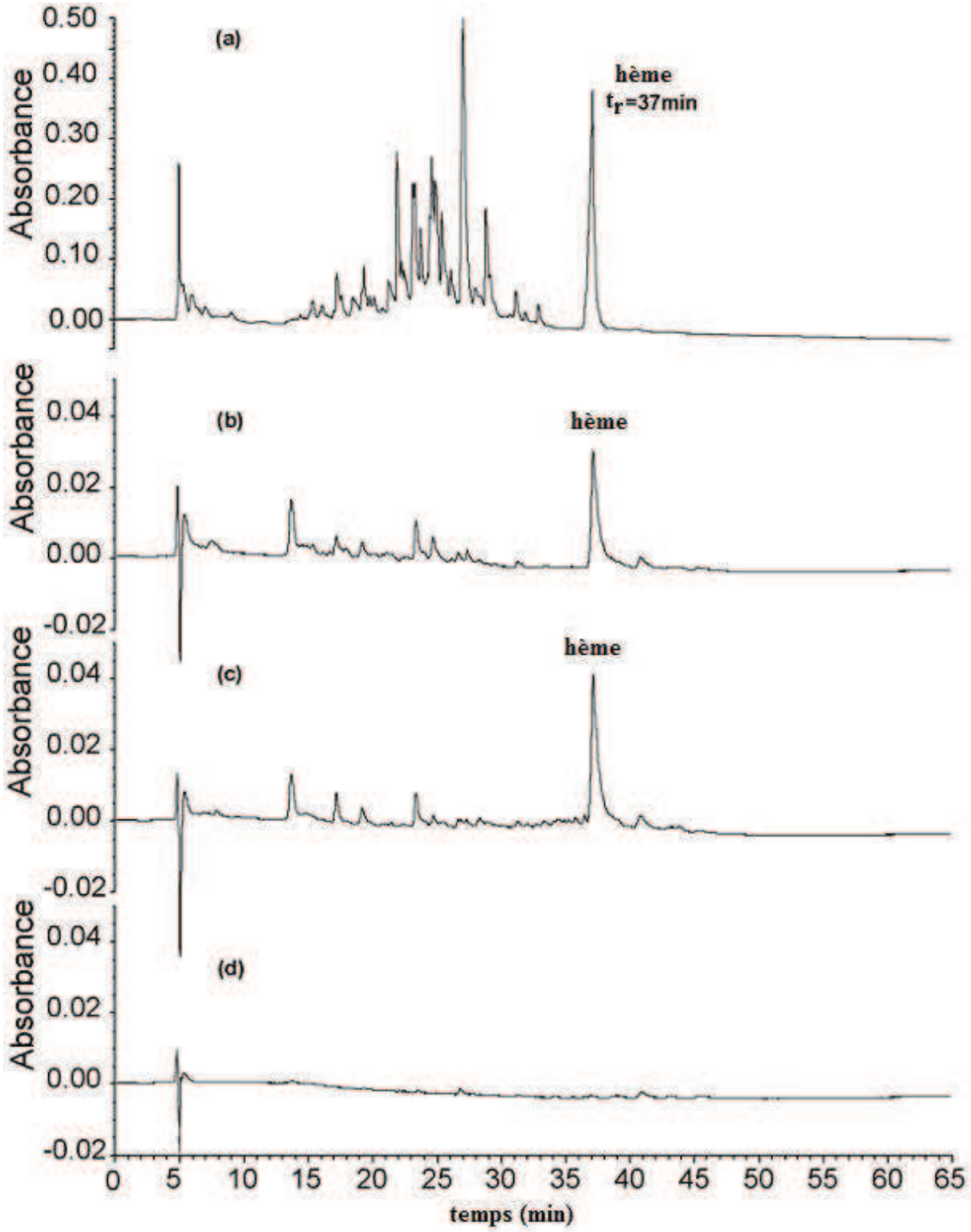


Figure 33. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. de (a) l'hydrolysat de D.H. 15 % et de la mousse après des volumes de drainage de (b) 50, (c) 100 et (d) 150 mL.

Une différence significative est observée avec l'hydrolysat de D.H. 3 %, où la fraction peptidique (3500 < poids moléculaires < 7000 Da) comprise entre les temps de rétention 30 et 35 min reste adsorbée, tandis que les peptides dont le temps de rétention est inférieur à 30 min sont désorbés de la mousse de tête. La figure 34 montre également qu'une augmentation du

volume de drainage de la solution tampon permet une amélioration de la séparation de la fraction peptidique de poids moléculaire élevée : cette fraction reste adsorbée dans la mousse de tête lorsque le volume de drainage varie de 50 à 150 mL.

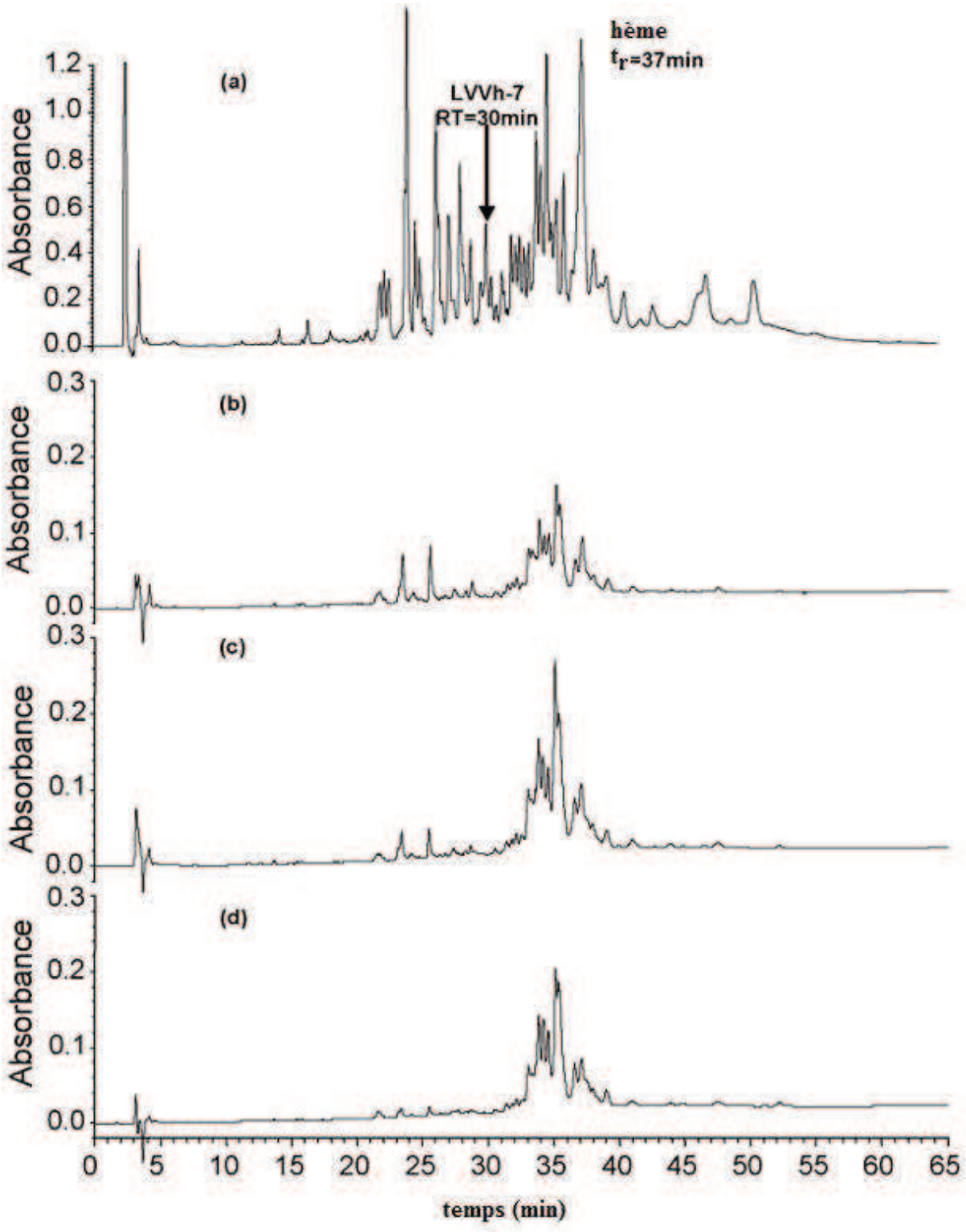


Figure 34. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. de (a) l'hydrolysat de D.H. 3 % et de la mousse après des volumes de drainage de (b) 50, (c) 100 et (d) 150 mL.

La mousse collectée après le traitement de moussage-drainage fut récupérée dans environ 5 mL, ce qui correspond au volume interstitiel présent dans la mousse en tête de colonne. Etant donné que les différents volumes de drainage testés représentent entre 10 et 30 fois ce volume interstitiel, la fraction peptidique retenue dans la mousse de tête, après la phase de drainage forcé, est alors constituée des peptides ayant les meilleures capacités d'adsorption, et par conséquent les meilleures propriétés physico-chimiques pour abaisser les tensions aux interfaces. Ce résultat est lié en partie aux poids moléculaires des peptides, situés entre 3500 et 7000 Da, qui permet une exposition de leur structure aux interfaces eau/air plus importante que les autres peptides présents en solution.

L'hydrophilie, l'hydrophobie et la taille moléculaire des peptides sont des paramètres importants, qui influencent la stabilité de la mousse, telles que l'ont montrées les études des propriétés moussantes des hydrolysats issus du gluten, de la gliadine, de la β-lactoglobuline ou de la caséine par la pepsine (Popineau *et coll.*, 2002 ; Larré *et coll.*, 2006). Nous avons observé dans notre étude qu'une meilleure hydrophilie de l'hydrolysat permettait d'avoir des valeurs de tensions interfaciales plus faibles, ce qui traduisait une meilleure affinité de la population peptidiques pour être à l'interface air/liquide. De plus, les peptides retenus dans la mousse de tête avaient une hydrophobie inférieure à 1000 cal/mol. Certains peptides avec une forte hydrophobie n'étaient donc pas retenus dans la mousse de tête après le drainage forcé : par exemple le peptide LVVh-7, peptide opioïde avec une hydrophobie d'environ 1700 cal/mol selon l'échelle de Bigelow (1967), était élué par le volume de drainage ajouté. Ceci peut être du à son poids moléculaire faible (1308 Da) et/ou de sa relative hydrophobie. Ceci montre que la taille moléculaire des peptides, leur hydrophilie et hydrophobie étaient des paramètres physico-chimiques des plus importants pour le fractionnement peptidique dans ce système de moussage-drainage.

2.5.2. Tests antimicrobiens

Daoud *et coll.* (2005) ont montré que la fraction peptidique éluée entre 30 et 35 min présentait une activité antibactérienne contre différents Gram-négatif et Gram-positif. Nous avons donc testé ces fractions peptidiques dans des boîtes de Petri contre 4 espèces bactériennes : deux Gram-negatifs (*Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis*) et deux Gram-positifs (*Micrococcus luteus* A270 et *Enterococcus faecalis*). L'activité antibactérienne fut mesurée en mesurant le diamètre de la zone claire d'inhibition de croissance (tableau 20).

Souche bactérienne	Diamètre de la zone d'inhibition de la croissance de la fraction extraite (mm)
Escherichia coli (Gram-negative)	33,3
Salmonella enteritidis (Gram-negative)	40,0
Micrococcus luteus (Gram-positive)	16,7
Enterococcus faecalis (Gram-positive)	33,3

Tableau 20. Activité antimicrobienne de la fraction isolée de l'hydrolysat pepsique de l'hémoglobine bovine par le procédé de moussage-drainage.

Les fractions extraites présentaient une activité antibactérienne contre les quatre espèces bactériennes. Le traitement d'extraction par moussage-drainage permet donc d'isoler, tout en conservant les propriétés actives, une fraction peptidique présentant une activité antimicrobienne.

2.5.3. Détermination du pourcentage massique de la fraction peptidique collectée et de la sélectivité de séparation

Le rendement d'extraction et l'enrichissement de la fraction peptidique comprise entre 30 et 35 minutes, contenue dans la mousse issue de l'hydrolysat de D.H. 3 % recueillie en tête de colonne ont été évalué, en comparant les aires des fractions, grâce au logiciel Millenium®, dans les profils chromatographiques des analyses par C.L.H.P.-P.I..

Ainsi le rendement d'extraction de cette fraction peptidique récoltée dans les 5 mL de la mousse en tête de colonne a été estimé à environ 5%. Pour tenter d'améliorer cette quantité de fraction extraite, nous avons essayé d'utiliser un hydrolysat initial plus concentré. Le volume de solution tampon nécessaire pour effectuer une bonne séparation devint alors trop important et non compatible avec la taille de notre colonne.

Le facteur d'enrichissement fut évalué à environ 1,5. La fraction d'intérêt n'est effectivement que partiellement isolée, des traces d'hème et d'autres peptides étant encore observées. L'augmentation du volume de drainage permet d'améliorer l'enrichissement, mais outre les contraintes dimensionnelles évoquées précédemment, on peut craindre une déstabilisation de la mousse, et donc la perte des peptides d'intérêt, si le drainage forcé devait durer.

3. Etude des paramètres influents par des plans d'expériences

Le procédé d'extraction par moussage-drainage est efficace pour isoler une fraction peptidique aux propriétés antibactériennes. Cependant son rendement d'extraction et l'enrichissement sont faibles. Le système est complexe car les paramètres physico-chimiques intervenants tout au long du protocole sont nombreux. Nous avons alors choisi d'utiliser des méthodes d'analyse par plans d'expériences afin de réduire le nombre d'expériences et de cerner au mieux notre environnement d'extraction.

Ainsi un premier plan d'expériences de criblage fut réalisé et mit en évidence quatre paramètres majeurs. Le procédé fut ensuite optimisé grâce à un second plan d'expériences basé plus particulièrement sur ces quatre paramètres.

3.1. Mise en place de plans d'expériences pour un criblage des paramètres

3.1.1. Choix du domaine expérimental

Les paramètres intervenant tout au long du protocole sont nombreux : le débit du gaz d'injection, la concentration en hydrolysat, en sels, le volume de drainage, le pH des solutions, la température, le débit du drainage, la porosité du fritté… Seuls les paramètres décrits ensuite, que nous avons estimés les plus pertinents d'après des études préliminaires ou la littérature, furent étudiés afin de connaître les limites expérimentales de notre système en vue de trouver les bornes supérieures et inférieures des plans d'expériences.

Concentration de l'hydrolysat et volume de drainage

D'après les études menées précédemment (voir **III.B.2.2.**), la limite basse en concentration fixée par notre système est de 0,01 % (p/v) pour pouvoir obtenir une hauteur de mousse d'environ 60 cm. Cependant une telle mousse s'effondre sous le volume de drainage forcé. Nous avons observé qu'une concentration minimale de 0,05 % (p/v) était suffisante pour pouvoir mener le protocole à son terme.

Le critère de choix de la limite haute en concentration est dépendant de plusieurs facteurs. A travers nos différentes expériences de criblage des paramètres, nous observons de manière évidente une relation entre la concentration initiale de l'hydrolysat et le volume de drainage nécessaire pour effectuer la séparation des populations peptidiques. Lorsqu'une forte concentration est employée, beaucoup de peptides sont entrainés lors de la formation de la mousse. Fractionner les peptides en tête de colonne est toujours possible mais le volume de drainage requis pour isoler la fraction d'intérêt est de plus en plus important.

Pour assurer une mousse stable, et dans les limites technologiques de notre montage (un volume de liquide de drainage trop important rempli la colonne de liquide et chasse la mousse), nous avons retenu des concentrations en hydrolysats de 1 et 2 % (p/v) pour des volumes de drainage de 100 et 200 mL.

pH des solutions d'hydrolysat et de drainage

Le pH peut influer sur la manière dont sont chargés les peptides et donc sur leur propriétés tensioactives. Une variation suffisamment importante est donc requise pour observer des différences entre les peptides chargés positivement lorsqu'on se rapproche des pH faibles et négativement aux pH élevés, mais il faut toutefois faire attention à ne pas entrer dans des domaines où l'hydrolyse acide ou basique des peptides pourrait se produire. Nous avons donc fixé des valeurs de pH à 4 et 8.

Débit du gaz

Le débit de gaz peut influer sur la vitesse de formation et donc sur la structure (petites ou grandes bulles) de la mousse. Nous avons retenu des valeurs de 50 et 100 mL/s pour le débit d'air, des débits plus importants entrainant une formation de bulles de très grandes tailles qui n'étaient pas stables durant le drainage et provoquaient l'effondrement de la mousse. La valeur inférieure du débit d'air fut choisie pour permettre à l'air injecté de traverser le fritté poreux recouvert de la solution d'hydrolysat.

Concentration en KCl

La concentration en sel peut intervenir de plusieurs manières au cours du protocole : lors de la formation de la mousse par l'écrantage des charges des peptides (induisant une diminution de l'hydrophilie et modifiant donc l'affinité eau/air des peptides à l'interface) et lors du drainage (réduction de la vitesse de drainage par une augmentation relative de la viscosité dans les films interstitiels). Nous avons fixé les valeurs de concentration en KCl à 0 et 0,5 M.

Six paramètres à deux niveaux sont donc sélectionnés et présentés dans le tableau 21.

Facteur		**niveau**	
		-1	+1
X_1	Débit d'air (mL/s)	50	100
X_2	Concentration en hyd. (%)	1	2
X_3	Volume de drainage (mL)	100	200
X_4	pH de l'hydrolysat	4	8
X_5	pH du drainage	4	8
X_6	Concentration en KCl (M)	0	0.5

Tableau 21. Plan expérimental présentant les six facteurs et les niveaux testés.

La réponse mesurée Y pour évaluer le plan d'expériences est le ratio d'enrichissement (ER) (Eq. 3) qui traduit la purification, ou la sélectivité d'extraction du procédé, calculé sur la

fraction précédemment isolée présentant des propriétés antibactériennes. La figure 35 présente un exemple de profils chromatographiques avec l'ER calculé dans ce cas.

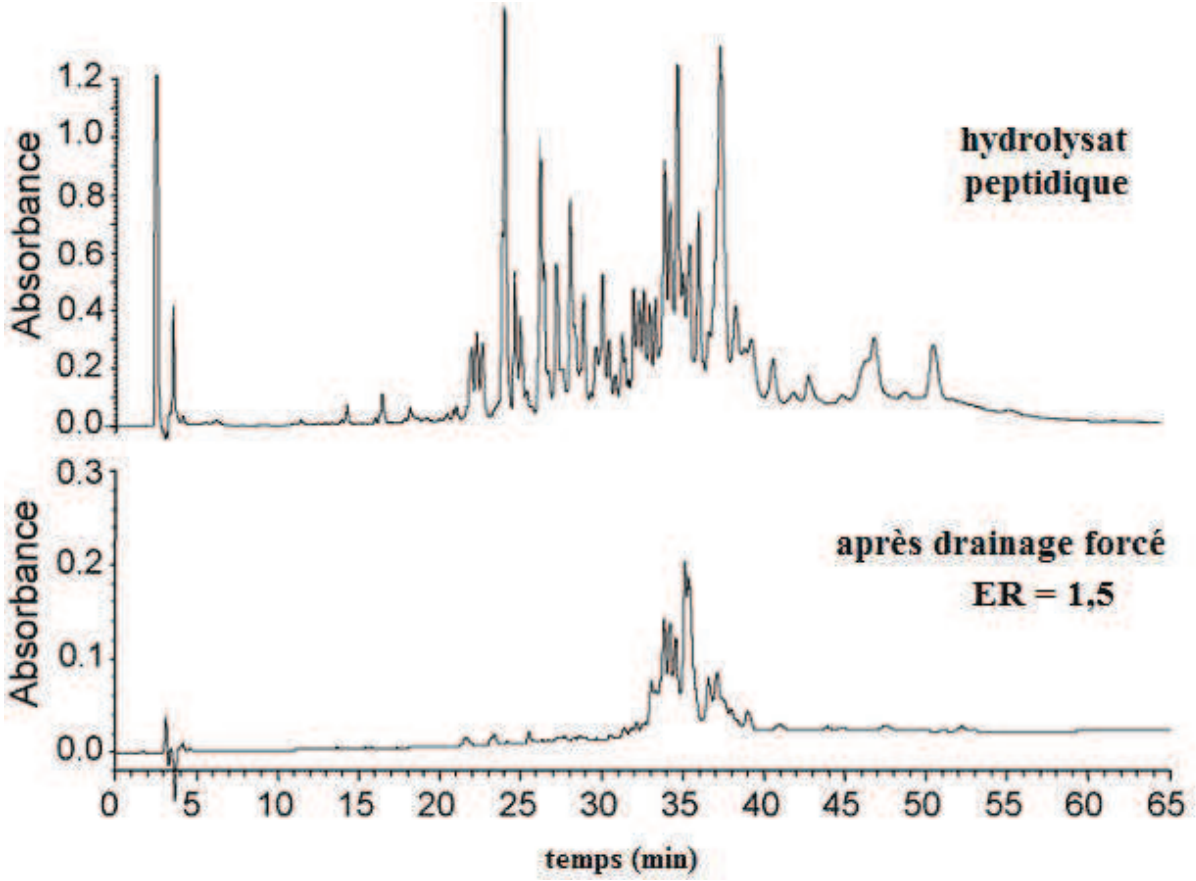


Figure 35. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. de l'hydrolysat de D.H. 3 % et de la mousse après un volume de drainage de 150 mL.

3.2.2. Matrice de criblage

Les huit expériences réalisées, répétées deux fois, et leurs réponses Y, l'enrichissement de la fraction peptidique d'intérêt, sont présentées dans le tableau 22.

N°Exp	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	Y
1	1	1	1	-1	1	-1	1.19 ; 1.10
2	-1	1	1	1	-1	1	1.40 ; 2.47
3	-1	-1	1	1	1	-1	1.37 ; 0.85
4	1	-1	-1	1	1	1	1.78 ; 1.24
5	-1	1	-1	-1	1	1	1.45 ; 1.32
6	1	-1	1	-1	-1	1	2.18 ; 4.29
7	1	1	-1	1	-1	-1	1.56 ; 1.39
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.60 ; 3.39

Tableau 22. Matrice des réponses du plan de criblage.

Le domaine expérimental choisi couvrait un large éventail de réponses, celles-ci variant de 0,85 pour l'expérience 3 à 4,29 pour l'expérience 6. La reproductibilité était meilleure pour des valeurs de réponse basses (inférieures à 1,5).

Après l'élimination de l'expérience 6 qui présentait une différence anormale entre les réponses expérimentale et calculée, les coefficients calculés pour le modèle de l'Eq. 5 sont présentés dans le tableau 23 avec leur indice de confiance.

b_i	Paramètre	Valeur	Indice de confiance
b_0	-	1.9	***
b_1	Debit de gaz	0.17	
b_2	Concentration en hydrolysat	-0.42	*
b_3	Volume de drainage	0.19	
b_4	pH de l'hydrolysat	-0.39	*
b_5	pH du liquide de drainage	-0.61	**
b_6	Concentration en KCl	0.35	*

Tableau 23. Coefficients b_i (Eq. 6) du modèle mathématique (Eq. 5) avec leur indice de confiance (pour 95% et ** pour 99%).*

Ces résultats mettaient en évidence une amélioration de l'enrichissement lorsqu'on avait une concentration plus faible en hydrolysat au départ, des pH d'hydrolysat et de solution de drainage acides et en présence de sels.

La concentration faible en hydrolysat traduit en fait le problème lié à la mise en œuvre soulevé dans la partie précédente. Une forte concentration en hydrolysat permet d'entrainer plus de peptides dans la mousse, mais nécessite un plus grand volume de drainage pour réussir à séparer proprement la fraction d'intérêt. Nous avions donc pris le parti de ne retenir qu'un facteur sur les deux lors de ce plan d'expériences car ils étaient intimement liés. Les résultats indiquent ici que cet ensemble de facteur est important et que pour un volume de drainage fixé à 100 mL, une concentration en hydrolysat de 1 % (p/v) est plus adaptée à un fractionnement efficace.

Le pH influe sur les charges que présentent les peptides à leur environnement, et donc sur leur propriétés tensioactives. Leur affinité pour l'interface eau/air peut donc être modifiée. A pH 8, les groupements acides carboxyliques et amines des peptides sont chargés, les peptides sont alors relativement plus hydrophiles. En abaissant le pH vers les valeurs acides, les groupements acides carboxyliques tendent à devenir non chargés, ne laissant que les charges positives des groupements amines. Il y a donc moins de charges aux pH acides, ce qui entraine une hydrophilie moins marquée. De plus on peut noter que les peptides extraits sont ceux qui sont le plus hydrophobes (temps de rétention plus élevés en C.L.H.P.-P.I.). Une plus

grande hydrophobie favoriserait donc l'adsorption à l'interface, et donc une meilleure extraction.

L'influence du sel peut se marquer de deux manières différentes. Tout d'abord par un phénomène d'écrantage lors de la formation de la mousse. Ce phénomène reprend le même principe qu'expliqué dans le paragraphe précédent : la charge apparente du peptide diminue lorsqu'il est associé à des ions salins, diminuant son hydrophilie relative. Avec moins d'affinité pour la partie aqueuse, il vient s'adsorber à l'interface eau/air générée par la mousse. Ensuite, lors du drainage, plusieurs phénomènes pourraient intervenir. Le liquide présent entre les bulles, le film interstitiel, se réduit au fur et à mesure du drainage. La viscosité peut être affectée par la présence de sels, tout comme le rapprochement des peptides présents aux interfaces de bulles adjacentes… Les phénomènes d'interactions possibles sont nombreux et particulièrement complexes.

3.2. Matrice composite d'optimisation

La matrice de criblage, basée sur la méthode d'Hadamard, a permis de conclure sur l'influence significative des concentrations en sels et en hydrolysat, et du pH des solutions initiales et de drainage sur l'extraction sélective de notre fraction peptidique bioactive. Ces quatre paramètres sont alors étudiés grâce à un plan composite centré pour déterminer les conditions optimales d'extraction suivant un modèle polynomial du second ordre (Eq.7). Le plan matriciel et les données expérimentales relevées sont présentés dans les tableaux 24 et 25. La réponse mesurée Y pour évaluer le plan d'expériences est l'ER (Eq. 3) sur la fraction précédemment isolée présentant des propriétés antibactériennes.

Variables codées	**Variables naturelles**	**niveaux**				
		-2	-1	0	1	2
X_1	Concentration en hyd. (%)	0.1	0.55	1	1.45	1.90
X_2	Concentration en KCl (M)	0	0.5	1	1.5	2
X_3	pH de l'hydrolysat	2	4	6	8	10
X_4	pH de drainage	2	4	6	8	10

Tableau 24. Facteurs expérimentaux et niveaux testés du plan composite centré.

Essai	Variables codées				Variables naturelles				Y
	X_1	X_2	X_3	X_4	U1	U2	U3	U4	
1	-	-	-	-	0.55	0.5	4	4	1.50
2	+	-	-	-	1.45	0.5	4	4	1.22
3	-	+	-	-	0.55	1.5	4	4	2.09
4	+	+	-	-	1.45	1.5	4	4	4.23
5	-	-	+	-	0.55	0.5	8	4	3.07
6	+	-	+	-	1.45	0.5	8	4	0.32
7	-	+	+	-	0.55	1.5	8	4	1.18
8	+	+	+	-	1.45	1.5	8	4	0.34
9	-	-	-	+	0.55	0.5	4	8	1.15
10	+	-	-	+	1.45	0.5	4	8	0.98
11	-	+	-	+	0.55	1.5	4	8	0.004
12	+	+	-	+	1.45	1.5	4	8	0.435
13	-	-	+	+	0.55	0.5	8	8	2.80
14	+	-	+	+	1.45	0.5	8	8	0.257
15	-	+	+	+	0.55	1.5	8	8	0.629
16	+	+	+	+	1.45	1.5	8	8	1.42
17	2	0	0	0	1.9	1	6	6	1.25
18	-2	0	0	0	0.1	1	6	6	0.365
19	0	2	0	0	1	2	6	6	1.20
20	0	-2	0	0	1	0	6	6	0.042
21	0	0	2	0	1	1	10	6	2.38
22	0	0	-2	0	1	1	2	6	0.511
23	0	0	0	2	1	1	6	10	1.41
24	0	0	0	-2	1	1	6	2	1.36
25	0	0	0	0	1	1	6	6	1.74
26	0	0	0	0	1	1	6	6	1.26

Tableau 25. Matrice des réponses du plan de composite centré.

Le plan composite centré fut ajusté avec le modèle polynomial quadratique, les coefficients du modèle polynomial non linéaire (Eq. 7) et les valeurs de p présentés dans le tableau 26, où l'erreur standard est une mesure de variation dans l'estimation des coefficients. Le modèle polynomial fut choisi avec un indice de confiance de 95 % (Eq. 10). Pour arriver à ce résultat, les expériences 11, 12 et 22, pour lesquelles les différences entre les réponses calculées et expérimentales étaient jugées trop importantes, furent éliminées.

$$Y = 1.505 + 0.051\ X_1 + 0.299\ X_2 - 0.491X_3 - 0.014\ X_4 - 0.148X_1^2 - 0.190X_2^2 + 0.514X_3^2 - 0.003X_4^2 + 0.683X_1X_2 - 0.633X_1X_3 + 0.181X_1X_4 - 0.663X_2X_3 + 0.088X_2X_4 + 0.049X_3X_4 \quad \text{(Eq. 10)}$$

Effet	Valeur du coefficient	Erreur standard	P	Intervalle de confiance
b0	1,505	0,2523	0,000335	0,5819
b1	0,05142	0,07825	0,5295	0,1804
b2	0,2999	0,08572	0,008087	0,1976
b3	-0,4911	0,1124	0,002393	0,2594
b4	-0,01471	0,08572	0,8680	0,1976
b11	-0,1488	0,08631	0,1228	0,1990
b22	-0,1962	0,08631	0,05259	0,1990
b33	0,5149	0,1124	0,001807	0,2594
b44	-0,003949	0,08631	0,9646	0,1990
b12	0,6833	0,09898	0,0001240	0,2282
b13	-0,6330	0,09898	0,0002101	0,2282
b14	0,1811	0,09898	0,1046	0,2282
b23	-0,6637	0,1120	0,0003522	0,2583
b24	0,08848	0,1120	0,45246	0,2583
b34	0,04929	0,1120	0,6716	0,2583

Tableau 26. Estimation des coefficients de régression de Y (pureté de la fraction peptidique).

Les résultats expérimentaux et les valeurs prédites par l'équation 10 sont comparés dans la figure 36.

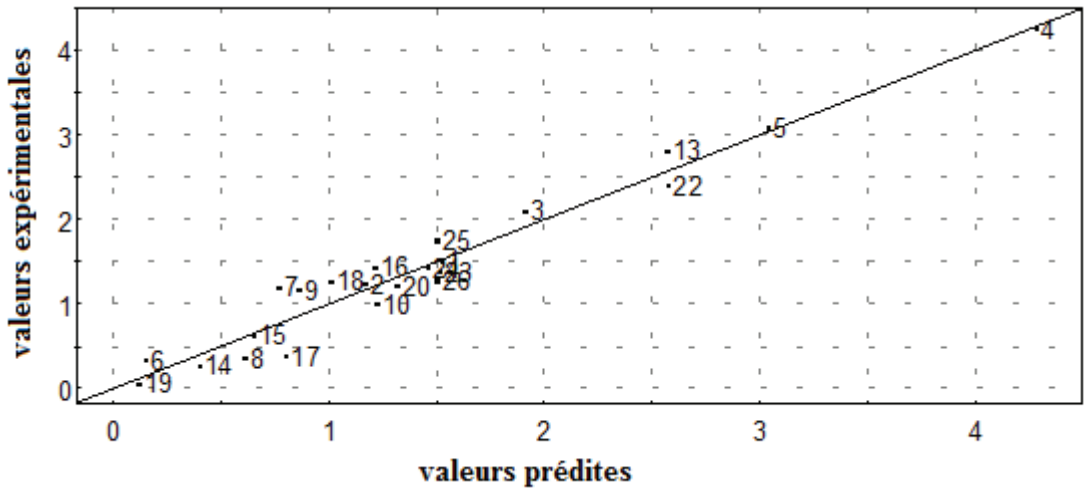


Figure 36. Relation entre les réponses de puretés expérimentales et prédites de la fraction peptidique extraite.

Les valeurs prédites correspondent aux valeurs expérimentales avec un R^2 de 0,953. Ici, cette valeur de R^2 indique que 95,3 % de la variabilité de l'ensemble des réponses peut être expliquée par ce modèle. La validité statistique du modèle fut évaluée par le test F

ANOVA, qui révèle que cette régression était statistiquement significative ($P < 0,0001$) à un indice de confiance de 99 %. Ainsi ce modèle permet de prédire l'ER dans ce domaine expérimental à une valeur de 0,5 près.

Les paramètres significatifs d'après ce modèle sont : la concentration en KCl (facteur X2), le pH de l'hydrolysat (X3) et les interactions X1X2 (concentrations en hydrolysat-KCl), X1X3, X2X3 et X3X3. Le facteur X4, le pH du liquide de drainage, n'avait pas d'influence sur Y dans ce domaine expérimental. Le facteur X1, la concentration en hydrolysat, n'influençait la réponse que par l'intermédiaire d'interactions avec les autres facteurs. La concentration en KCl (X2) et le pH de l'hydrolysat (X3) étaient finalement les paramètres qui gouvernaient le plus la qualité de l'extraction.

Pour mieux observer l'effet de chaque variable, des graphiques en 3 dimensions des réponses prédites par le modèle polynomial furent tracés. Les surfaces de réponses sont présentées dans les figures 37 et 38. Ces figures présentent sur des tracés en 3D les relations entre deux variables et la réponse en enrichissement Y pour des niveaux hauts ou bas des autres variables comme indiqué ensuite.

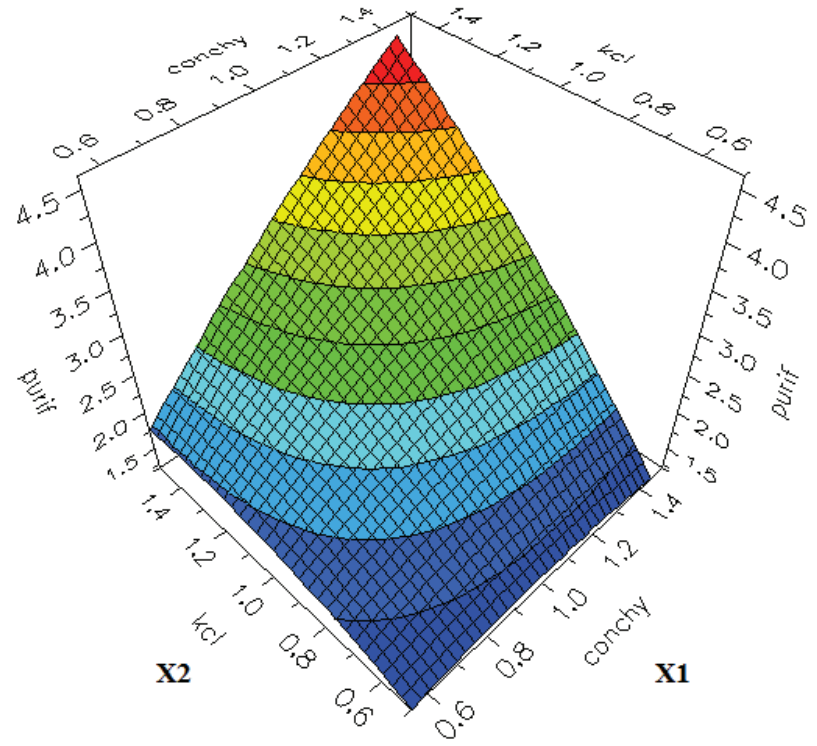


Figure 37. Surface de réponses de la purification pour des variations de concentrations en KCl et en hydrolysat pour des niveaux bas fixés de pH de drainage et d'hydrolysat.

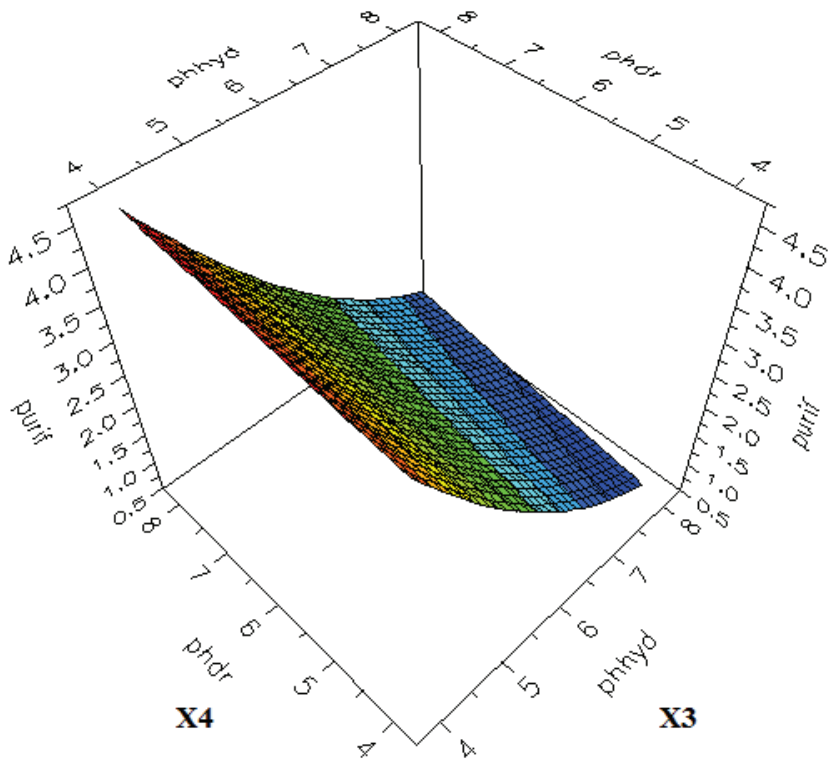


Figure 38. Surface de réponses de la purification pour des variations des pH de drainage et d'hydrolysat pour des niveaux bas fixés de concentrations en KCl et hydrolysat.

La figure 37 indique les effets des concentrations en hydrolysat (X1) et KCl (X2) pour des niveaux bas de pH de drainage et d'hydrolysat. Le maximum de pureté pour la fraction peptidique extraite est obtenu pour de fortes concentrations en KCl et en hydrolysat avec un optimum prédit à 4,5. Ceci est cohérent avec les résultats de la matrice de criblage, notamment la forte concentration en hydrolysat : le maximum est prédit ici pour une concentration en hydrolysat de 1,4 % (p/v), là où un volume de drainage de 100 mL apparait comme suffisant.

La figure 38 indique les effets du pH de l'hydrolysat (X3) et du pH de drainage (X4) sur l'enrichissement de la fraction d'intérêt pour des niveaux hauts en concentration en hydrolysat et en KCl. Bien que les meilleures réponses soient observées pour des pH bas à la fois pour l'hydrolysat et le drainage, l'effet du pH de l'hydrolysat est prédominant. Ceci permettrait de poser l'hypothèse que l'étape d'adsorption des peptides à l'interface eau/air lors de la formation de la mousse est capitale : les peptides retenus resteraient bien adsorbés pendant le drainage qui n'effectuerait, au même pH, pas de sélectivité supplémentaire car les affinités n'étaient pas modifiées. Il remplirait simplement un rôle d'évacuation des peptides non-adsorbés.

Pour confirmer ces résultats d'optimisation, des expériences d'extraction de la fraction peptidique d'intérêt furent réalisées en s'appuyant sur le modèle précédent. Les concentrations en KCl et hydrolysat furent fixées à 1,5 M et 1,45 % (p/v) respectivement, et les pH de drainage et d'hydrolysat étaient fixés à 3. L'enrichissement relevé atteignait alors une valeur de 5,2 (figure 39).

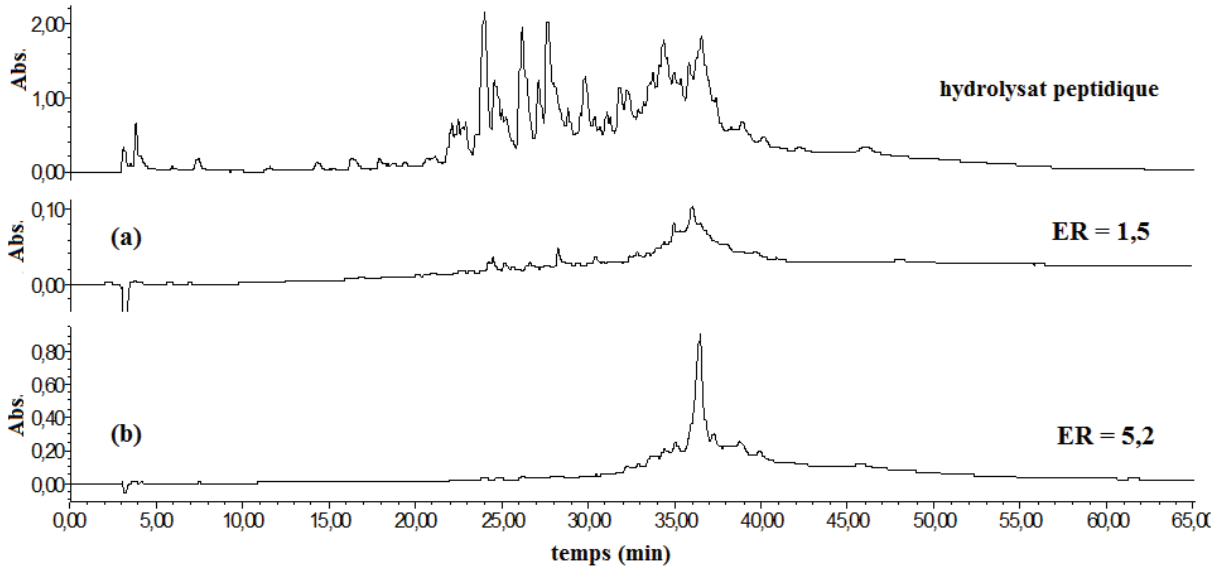


Figure 39. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. de l'hydrolysat de D.H. 3 %, de la mousse (a) après un protocole d'extraction tel qu'à la mise en œuvre du procédé et (b) après optimisation par les plans d'expériences.

Conclusion

Pour la première fois, un procédé d'extraction sélective de peptides grâce à un système de moussage-drainage fut mis en œuvre. Nous avons pu isoler une fraction peptidique aux propriétés antimicrobiennes.

Le plan d'expériences d'Hadamard et la méthode d'optimisation par les surfaces de réponses ont permis une identification rapide des paramètres importants intervenant dans l'extraction par moussage-drainage.

Par optimisation de ces paramètres opératoires (pH de l'hydrolysat et du drainage à 3, concentration en KCl de 1,5 M et en hydrolysat de 1,45 % (p/v)), l'enrichissement de la fraction peptidique bioactive fut amélioré de 1,5 à 5,2.

Le pH des solutions et la concentration en sel mettent en avant l'importance des propriétés tensioactives des peptides ciblés dans leurs capacités d'adsorption à l'interface eau/air. La nature de la fraction extraite traduit également cette affinité pour l'interface des peptides les plus hydrophobes, comprenant les peptides d'une taille moléculaire importante.

M. Vanhoute, R. Froidevaux, C. Pierlot, F. Krier, J.M. Aubry, D. Guillochon, Advancement of foam separation of bioactive peptides using an aeration column with a bubbling-draining method, *Separation and purification technology 63*, 2008, 460-465.

Separation and Purification Technology 63 (2008) 460–465

Contents lists available at ScienceDirect

Separation and Purification Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/seppur

Advancement of foam separation of bioactive peptides using an aeration column with a bubbling-draining method

M. Vanhoute [a], R. Froidevaux [a,*], C. Pierlot [b], F. Krier [a], J.M. Aubry [b], D. Guillochon [a]

[a] ProBioGEM, Equipe "Génie de la Protéolyse et de la Séparation", Polytech'Lille, Bd Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France
[b] LCOM, Equipe "Oxydation et Formulation", UMR CNRS 8009, ENSCL, BP 90 108, F-59652 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 7 January 2008
Received in revised form 29 May 2008
Accepted 4 June 2008

Keywords:
Bovine haemoglobin
Hydrolysate
Peptides
Foam fractionation
Surface tension

ABSTRACT

Peptidic hydrolysates with different degrees of hydrolysis (3, 15 and 23%) has been obtained by hydrolysis of bovine haemoglobin by pepsin. RP-HPLC analysis of these hydrolysates coupled with mass spectroscopy has given information about the retention time and the peptidic size distribution. Pendant-drop tensiometry of aqueous-buffer solutions versus concentration points out differences in the curves superficial tension versus concentration between starting haemoglobin and hydrolysates. The weight percentage of hydrolysates in the bulk C_B^{max} for which stable foam can be obtained has been determined. Foam fractionation was studied by a bubbling-draining method. Collected top foam was analyzed by RP-HPLC and compared to the initial hydrolysate. No stable foam has been obtained with hydrolysate (DH = 23%) and no interesting fractionation can be obtained with hydrolysate (DH = 15%). However, a peptidic fraction (3500–7000 Da), having an antimicrobial activity, with a 5% extraction yield can be separated from hydrolysate (DH = 3%), using a forced draining volume of 100 or 150 mL.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Enzymic hydrolysis of proteins is widely used in the food industry to improve functional properties such as solubility, emulsification, gelation and taste, or to prepare extensively hydrolyzed proteins for hypoallergenic infant diets and nutritional therapy [1]. More recently the pharmaceutical and food industries have shown increasing interest in peptides derived from protein hydrolysates as components of functional foods [2]. Much research has focused on the isolation of peptides derived from various protein sources (milk, soya, fish, etc.). Numerous biologically active peptides (antihypertensive, opioid, antibacterial, etc.) have already been obtained by hydrolysis of casein, soya proteins, gluten, tuna myoglobin and others [3]. The preparation of such peptides or peptide-containing fractions generally required laborious chromatographic steps including pre-fractionation methods as gel filtration and reverse phase liquid chromatography. Therefore, replacement of even one column chromatographic operation by a simple, yet effective, separation step in an overall purification scheme could significantly reduce the expense of producing peptides of interest. Moreover, development of processes to prepare pure active peptides or enriched active peptide fractions is very difficult because these peptides are in a very complex mixture, i.e. an hydrolysate containing hundreds of different peptides.

An alternative method for preparing bioactive peptides or bioactive peptide-containing fractions would be to adsorb hydrolysates at air/water interfaces in foams and to drain the foam in order to separate adsorbed peptides. The basis of separation by foam fractionation is the difference in surface activity of peptides in a complex mixture coupled with a very high surface/volume ratio of a foam. Up to now, foam fractionation has mainly been used to concentrate proteins from diluted solutions or to separate protein mixture [4–8]. However, the application of foam fractionation on peptidic hydrolysate, issued from protein enzymatic hydrolysis, was not studied. Therefore, the present work was undertaken to exploit the potential of foam fractionation on peptidic hydrolysates by a forced foam draining, where a continuous flow rate of liquid was applied on the foam. Therefore, the studies of the surface tensions and draining volume effect on the peptidic separation, in an aeration column with a bubbling-draining method, has allowed to choose separation conditions, based upon foam stability and peptide separation selectivity.

2. Materials and methods

2.1. Hydrolysate preparation

Bovine haemoglobin hydrolysis by pepsin was performed at 23 °C at pH 3 with a pH-stat. Haemoglobin solution (1%, w/v)

* Corresponding author. Tel.: +33 3 28 76 73 90; fax: +33 3 28 76 73 81.
E-mail address: renato.froidevaux@univ-lille1.fr (R. Froidevaux).

1383-5866/$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.seppur.2008.06.008

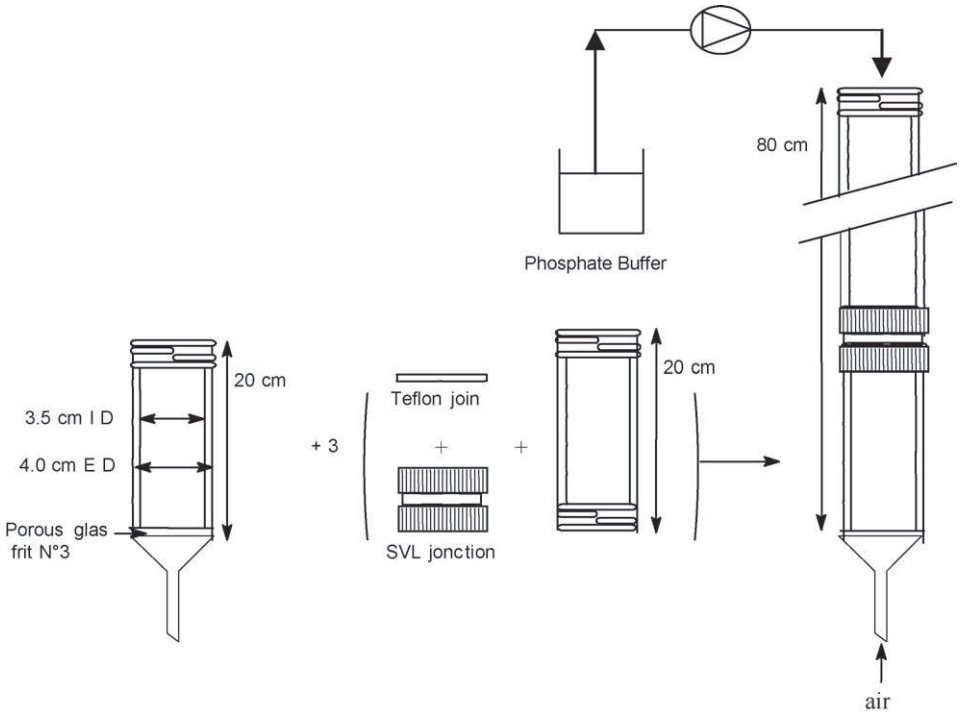


Fig. 1. Scheme and experimental apparatus for the foaming-draining system used to fractionate peptidic hydrolysates of bovine haemoglobin. The apparatus consisted of a glass column with an internal diameter of 3.5 cm and a 80 cm height, composed by four glass muffs of 20 cm. The muffs were connected with a SLV junction and a Teflon joint. Draining volumes of 50 mM phosphate buffer pH 7.0 were applied to the top foam at a flow rate of 100 mL/min.

was incubated with pig pepsin (E.C. 3.4.23.1; 3450 UAE/mg solid; E/S = 2%, w/w) for 2.5 min, 10 h and 120 h. Reaction was stopped by inactivating pepsin by increasing the pH to 10 with 5 M NaOH.

2.2. Determination of haemoglobin degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH) was defined as the ratio of the number of peptide bonds cleft to the total number of peptide bonds in haemoglobin determined by the trinitrobenzene sulphonate method [9]. 2.5 min, 10 h and 120 h of hydrolysis by pepsin correspond to DH of 3, 15 and 23% respectively.

2.3. Foam fraction column

Fig. 1 shows the apparatus used to fractionate the peptidic hydrolysate. The foaming-draining system was composed of a glass column with an internal diameter of 3.5 cm and a 80 cm height, consisted by four glass muffs of 20 cm. These muffs were connected with a SLV junction and a Teflon joint. Finally, the glass column was closed at one extremity by a porous glass frit no. 3. Hundred milliliters of peptidic hydrolysate (0.1%, w/v) solutions in 100 mM pH 7.0 phosphate buffer solution was placed at the bottom of the column and held at 25 °C. Compressed air (50 mL/s) was introduced into the solution through the porous glass frit, which induced foam formation. After reaching a foam height of 60 cm, gas flow was stopped. Different draining volumes (50, 100, 150 mL) of 50 mM phosphate buffer pH 7.0 were applied to the top foam at a flow rate of 100 mL/min. After draining for 30 min, top foam, which corresponded to about 1–3 cm foam height, was collected and liquid was recovered and directly analyzed by RP-HPLC.

2.4. RP-HPLC analysis

HPLC apparatus consisted of a Waters 600^{E} automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 17 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC Image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyze chromatographic data. All the chromatographic process was performed with a Vydac C4 column (250 mm × 4.6 mm internal diameter). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:1 by volume) as eluent B. The flow rate was 1 mL/min. The gradient applied was 0–67% (v/v) B over 30 min then 67–87% (v/v) B over 35 min. Chromatograms were performed at 226 nm for analysis.

2.5. Coupling of RP-HPLC and ESI-MS

All mass spectrometry measurements of hydrolysates were carried out in the positive ion mode on a Quattro II triple quadrupole instrument (Micromass, Altrincham, UK) equipped with an electrospray ion source. Experimental procedure of peptidic hydrolysates coupled RP-HPLC-MS was performed according to the literature [10].

2.6. Determination of the weight percentage of collected peptic fraction

The yield of the extraction of the peptidic fraction (PF) between 30 and 35 min, at the top of the foam issued from DH 3% hydrolysate, was evaluated, by making comparison of RP-HPLC areas between starting hydrolysate and the top foam. Therefore, yield of PF extraction was estimated at about 5%.

2.7. Bacteria and antimicrobial assays

The antibacterial activity was determined by the method of Parish et al. [3]. Four bacterial species were used as test micro-organisms for determination of antibacterial activity: two

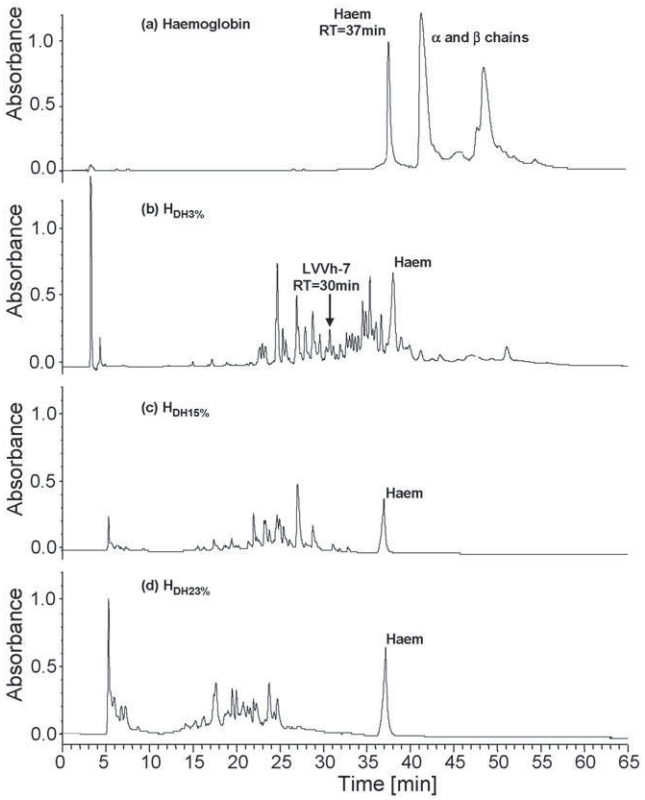


Fig. 2. RP-HPLC profiles of intact haemoglobin and peptidic hydrolysates. Fifty microliters of solution (1%, w/v) were fractionated on C4 column.

Gram-negative (*Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*) and two Gram-positive (*M. luteus* A270 and *Enterococcus faecalis*). Top foam recovered in the foaming/draining procedure was purified by RP-HPLC in order to eliminate haem molecule. After solvent evaporation, about 0.5 mg of peptidic fraction was obtained. This quantity was resuspended in 100 μL of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. Twenty microliters of peptide solution were then transferred to 5 mm diameters wells punched in the agarose (1%) layer containing 107 bacterial cells. To allow the diffusion of the peptides, Petri dishes were first incubated in a humidified closed container for 3 h at 4 °C for *M. luteus* A270 and at 37 °C for other strains. Following this diffusion period, 10 mL of Muller–Hinton medium twice concentrated (42 g/L) containing 1% agar were added as a top layer and plates were incubated 24 h at 37 °C. The antibacterial activity was measured as the bacterial growth inhibition zone by comparison to a positive control which was chloramphenicol (1 mg/mL), and to a negative control, sodium phosphate buffer (50 mM, pH 6.5).

2.8. Liquid–vapor interfacial tension measurements

Haemoglobin and hydrolysates were diluted in 100 mM phosphate buffer solution pH 7.0 and liquid–vapor interfacial tension measurements were measured by pendant-drop tensiometry using Kruss DSA-10 apparatus, after stabilisation (35–45 min).

3. Results and discussion

Fig. 2a shows chromatographic profile of intact haemoglobin used to produce the peptidic hydrolysates studied. It is noted the presence of haem molecule at a retention time of 37 min and α and β chains at retention times between 40 and 50 min. Fig. 2b–d shows chromatographic profiles of peptic hydrolysates of bovine

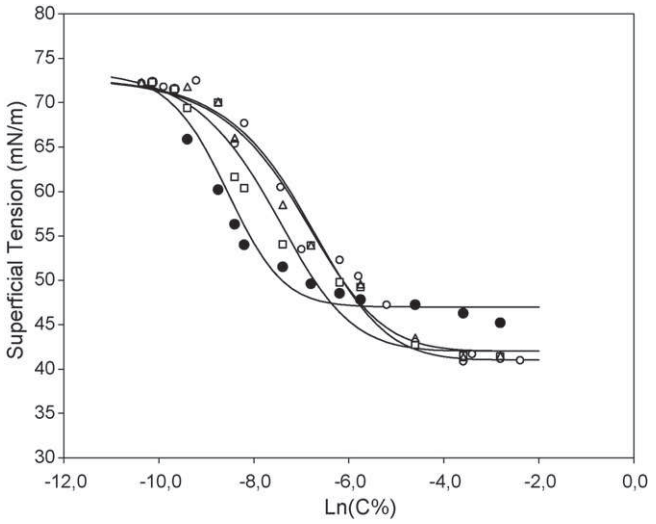


Fig. 3. Experimental surface tension as a function of the concentration (%, w/v) at pH7 for haemoglobin (●), hydrolysate: 3% (○), 15% (□) and 23% (Δ). Line represents the modelisation with coefficients in Table 1.

haemoglobin at respectively 3, 15 and 23% degrees of hydrolysis, which were used in our bubbling-draining system. Haem is always eluted with a RT of about 37 min because it was not degraded by pepsin. However, haemoglobin chains were hydrolyzed to produce peptidic hydrolysates containing peptides which differ from the initial protein by their molecular size, number of ionizable groups and surface hydrophobicity. Generally, the longer the hydrolysis the more hydrophilic is the hydrolysate, due to the presence of numerous small peptides and therefore more ionizable groups.

3.1. Tension surfaces and HPLC analysis

3.1.1. Concentration-dependent liquid–vapor interfacial tension

Interfacial tension measurements (γ_{lv}) were made using pendant-drop tensiometry as described in Section 2. Fig. 3 compares results for haemoglobin, and hydrolysates at 3, 15 and 23% of DH. Due to the polydispersed distribution of peptides size of each hydrolysate, the concentration in the bulk is expressed in g/100 mL. It was observed that these γ_{lv} curves were generally sigmoidal in shape and can be fitted using following mathematical model Eq. (1) [11,12] and Table 1.

$$\gamma_{lv} = \left[\frac{(\gamma_{lv}^{0} - \gamma_{lv}')}{(1 + (\ln(C_B^{\pi/2})/\ln(C_B)))^{M}} \right] + \gamma_{lv}' \quad (1)$$

where γ_{lv}^{0} and γ_{lv}' are the well-defined low-concentration limits and high-concentration asymptotes, respectively. C_B is the bulk-solution concentration, $\ln(C_B^{\pi/2})$ is parameter measuring concentration at half-maximal change in interfacial activity, with $\pi/2 = (1/2)\pi^{max}$ and $\pi^{max} = \gamma_{lv}^{0} - \gamma_{lv}'$, and M measured the steepness of the sigmoidal curve. For haemoglobin, a value of $\gamma_{lv}' = 47\ mN\ m^{-1}$ is proposed, but it should be rather considered a continuous slow decrease of γ_{lv}' for concentration higher than C_B^{max}. This decrease indicates that different adsorption mechanisms occur at the liquid–air interface for high concentration of starting protein.

Fig. 3 and Table 1 acknowledge a bulk-phase concentration at which further increase in solute concentration did not significantly change γ_{lv}. Bearing in mind that $25\ mN\ m^{-1} < \pi^{max} < 50\ mN\ m^{-1}$ is a typical range of ordinary fatty acids soaps and surfactants it can be observed that aqueous-haemoglobin solutions and hydrolysates are poor surfactant system. However for our experimental appli-

Table 1
γ_{lv}^{0}, g'_{lv}, $\log(C_B^{\pi/2})$, M, π^{max} and $\ln(C_B^{max})$ parameters obtained from modelisation of experimental curves superficial tension versus concentration plotted in Fig. 3

Sample	$\gamma_{lv}^{0} \pm 1$ (mN m^{-1})	$\gamma'_{lv} \pm 1$ (mN m^{-1})	$\ln(C_B^{\pi/2}) \pm 0.3$	$M \pm 2$	$\pi^{max} \pm 1$ (mN m^{-1})	$\ln(C_B^{max}) \pm 0.3$
HB	73	47	−8.6	−14	27	−6.8
$H_{DH3\%}$	73	41	−6.9	−8	32	−4.6
$H_{DH15\%}$	73	42	−7.6	−9	32	−4.8
$H_{DH23\%}$	73	42	−7	−8	31	−4.6

C_B is expressed in g/100 mL; Hb: haemoglobin; H: peptic hydrolysate of DH of 3, 15 and 23%.

cation, their surfactant properties are sufficient to generate foam.

C_B^{max} is typically interpreted as the critical micelle concentration (cmc) for surfactants. $\ln(C_B^{max})$ for haemoglobin (−6.8) that is smaller than those for hydrolysates (−4.7) indicate that haemoglobin hydrolysis leads to a part of peptides which has no effect on the superficial tension. On the other hand some of the produced peptides are responsible for the significant decrease of γ'_{lv} ($\gamma'_{lv} = 47$ mN m^{-1} for HB and $\gamma'_{lv} = 42$ mN m^{-1} for hydrolysates).

3.1.2. Choice of the starting hydrolysate concentration

In the future, the objective will be to build an apparatus allowing foam fractionation by continuous incorporation of hydrolysate, and thus continuous removing of top foam. The aim of this work was to find the best experimental conditions to obtain a static process giving a stable foam during the process allowing to find experimental conditions for purifying peptidic fraction.

Minimum concentration of starting hydrolysate to produce foam, had to be chosen taking into account the C_B^{max} value in Fig. 3. It was important to choose a concentration superior to 0.01% (w/v) ($\ln(C_B^{max}) = -4.6$) in order to produce a stable foam because below this concentration, the foam collapsed rapidly.

Although no difference in the γ_{lv} curves between the three hydrolysates can be shown in Fig. 3, bubbling air into DH 23% hydrolysate did not permit to obtain stable foam, even for a 1% (w/v) concentration. This result was probably due to the low molecular weights of the peptides present in the hydrolysate. Although these small peptides diffuse rapidly and adsorb at the interface, they are quickly removed from the interface with the natural draining.

Moreover, the use of concentrated hydrolysate (>1%, w/v) for DH 3 and 15%, leads unfortunately to poor peptides separation (head foam fraction is relatively similar to the bottom foam). Therefore, we selected a 0.1% (w/v) concentration for the hydrolysates which is ten times as high as C_B^{max} (0.01%, w/v) to carry out the experiments.

3.1.3. HPLC analysis

Coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry, carried out on the three hydrolysates studied [10], allowed to characterize the hydrolysates produced in the course of bovine haemoglobin hydrolysis by pepsin. From these results, a molecular weight distribution profile of peptides, as a function of their retention times, was determined and presented in Fig. 4.

Hydrolysate at DH 3% contains a peptide fraction with high molecular weights (3500–7000 Da), between the retention times of 30 and 35 min. Then, two other fractions, with molecular weights between 2000–3500 and 1500–2000 Da and retention times respectively between 25–30 and 20–25 min, contain peptides which are less hydrophobic than the precedent fraction.

Hydrolysate at 15% of DH contains a first peptide fraction between 25 and 30 min with peptides whose molecular weights are situated between 1500 and 2000 Da. Then, more hydrophilic fractions are eluted at 20–25 min (1500–2500 Da), 15–20 min (1500–2000 Da), 10–15 min (500–1000 Da) and 5–10 min (500–600 Da).

For hydrolysate at 23%, the first eluted peptide fraction (500–1500 Da) is observed with a retention time of 20–25 min, and three other fractions appear between 15 and 20 min (1500–2000 Da), 10–15 min (500–1000 Da) and 5–10 min (500–600 Da). Peptides eluted with RT situated between 5 and 20 min were similar to those appeared in the hydrolysate at DH of 15%. Therefore, peptides produced at a DH of 15%, are not yet hydrolyzed by pepsin and accumulate in the reactor [10].

These results showed that the more the degree of hydrolysis increased, the more the small peptides were produced and it was expected that a fractionation could be obtained when a drainage occurred in the foam, due to the polydispersed distribution of peptides molecular weights and the difference of surface activity of these peptides present in the hydrolysates.

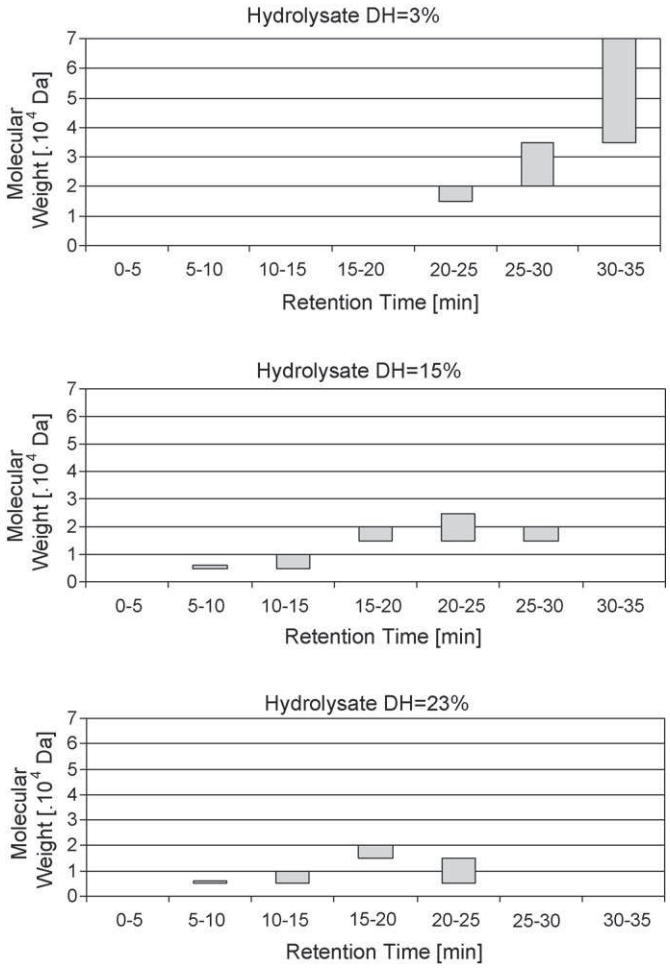


Fig. 4. Molecular weight distribution profiles of peptides in the hydrolysates as a function of their retention time in HPLC at 3, 15 and 23% of DH.

3.2. Foam formation and draining volume

Air at a flow rate of 50 mL/s was introduced through a porous glass frit into 100 mL of hydrolysates 0.1% (w/v) until obtention of a 60 cm height foam. Without any forced draining volume, and after waiting time of 30 min, top foam was collected and liquid was recovered and analyzed by RP-HPLC.

With the DH of 23% foam could not reach the height of 60 cm, due to the low molecular weights of the peptides present in the hydrolysate.

For DH of 3 and 15%, stable foam can be obtained but RP-HPLC profiles showed no difference with the starting hydrolysate. The fact that all peptides were retained in the foam probably resulted from interactions between peptides and the air/water interface or peptide–peptide interactions between peptides adsorbed in the foam or peptides situated in the interstitial liquid between the bubbles.

We can consider in a first attempt that the concentration of fractionated peptides due to foaming is given by

$$C = C_b \left(1 + \frac{6\gamma_{lv}}{dC_b}\right) \quad (2)$$

where C is the final peptide concentration, C_b is the bulk concentration of interstitial liquid, d is the bubble size and γ_{lv} is the surface concentration of peptide at the air–liquid interface. Stable foam for static experiment requires at relatively high concentration around 0.1%. Such concentrations are unfortunately around the CMC of hydrolysate, thus according to Eq. (2), it can be explained a poor fractionation in the top foam. Reducing the size of the bubbles (d) has been carried out using filter with smaller porosity, but in the tested experimental conditions, no amelioration was obtained. To obtain a difference of concentration between C and C_b, we decided to dilute the interstitial liquid by addition of different buffer volume on the top foam.

Thus, a forced foam draining, with continuous flow rate of 100 mL/min of 50 mM phosphate buffer solution (pH 7.0) was injected in the top foam, in order to obtain a fractionation of adsorbed peptides and a rapid draining of the peptides present in the interstices. Three draining volumes of 50, 100 and 150 mL were tested. Fig. 5 shows that for the 15% hydrolysate, all the peptides are progressively desorbed from the top foam when the forced draining volume increased. This seems to indicate that peptides with molecular weight inferior to 3500 Da (Fig. 4) present in the 15% hydrolysate are too small to remain at the interface after forced draining.

An important difference is observed with the 3% hydrolysate where peptidic fraction (3500 Da < Mw < 7000 Da) between 30 and 35 min can be separated (Fig. 6), whereas the peptidic fractions whose retention time is lower than 30 min have been removed from the top foam. Fig. 6 shows also that an increase of the forced draining volume of buffer solution has allowed an improvement of the higher molecular mass peptidic fraction extraction. This higher molecular mass fraction was maintained adsorbed in the top foam when the draining volume varied from 50 to 150 mL. Daoud et al. have shown that peptides eluted in the fraction between 30 and 35 min exhibited antibacterial activity against different Gram-negative and Gram-positive [3]. We have also tested the extracted peptidic fraction in Petri plates against four bacterial species: two Gram-negative (*E. coli* and *S. enteritidis*) and two Gram-positive (*M. luteus* A270 and *E. faecalis*). The antibacterial activity was measured as the diameter of clear zone of growth inhibition. The extracted fraction exhibited an antibacterial activity towards the four bacterial species (Table 2). Active fraction is also analyzed to characterize the antibacterial peptide(s) present in it and to determine their minimum inhibitory concentration.

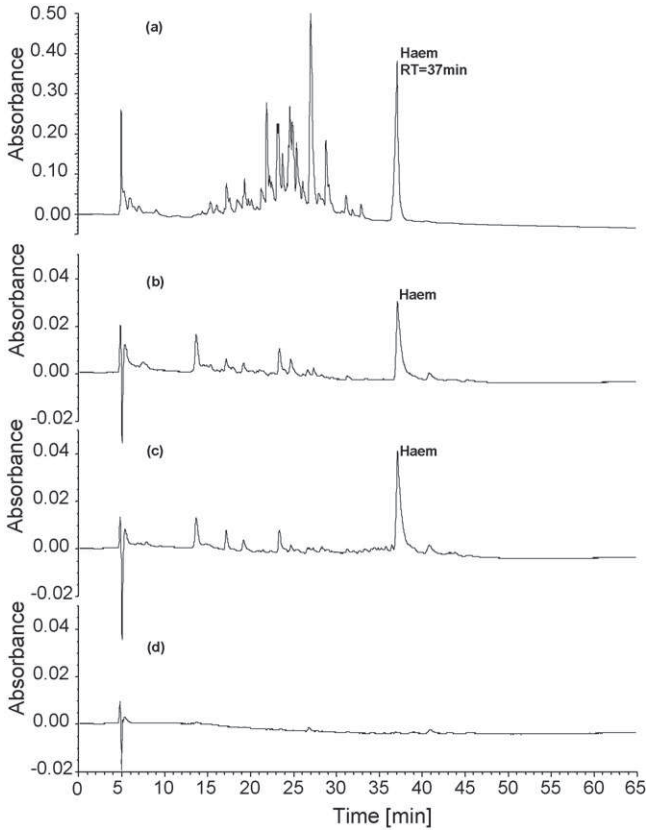


Fig. 5. RP-HPLC profiles of the peptidic hydrolysate 3% (a) and the foam after draining volumes of 50 mL (b), 100 mL (c) and 150 mL (d). Hydrolysate volume: 100 mL (0.1%, w/v); air flow rate: 50 mL/s; foam height: 60 cm.

The foam collected after the foaming-draining operation was recovered in about 5 mL, which corresponded to the interstitial volume present in the top foam. As the different draining volumes tested represented 10–30 folds this interstitial volume, the peptidic fraction retained in the top foam, after the forced draining phase, was also constituted by peptides having the best adsorption capacity and so the best efficient in reduction of the surface tension. This was due to the molecular mass of the peptides, situated between 3500 and 7000 Da, whose the exposure to the air/water interface was more important than the other peptides present in the solution. Literature has showed that peptide hydrophobicity was an important parameter which influenced the foam stability, in the case of foaming property studies of peptidic hydrolysates issued from gluten, gliadin, β-lactoglobulin or casein hydrolysis by pepsin [13,14]. However, the peptide hydrophobicity efficiency was not studied in the situation of foam forced draining. In our study, it was observed that peptides with high hydrophobicity were not retained in the top foam after the forced draining. For example, peptide LVV-haemorphin-7, which is an opioid peptide (retention time of 30 min in the hydrolysate 3%) with an hydrophobicity of

Table 2
Antibacterial activity of the fraction obtained by bubbling-draining method on haemoglobin peptic hydrolysate

Bacterial species	Diameter of inhibition zone by the extracted fraction (mm)
E. coli (Gram-negative)	33.3
S. enteritidis (Gram-negative)	40.0
M. luteus (Gram-positive)	16.7
E. faecalis (Gram-positive)	33.3

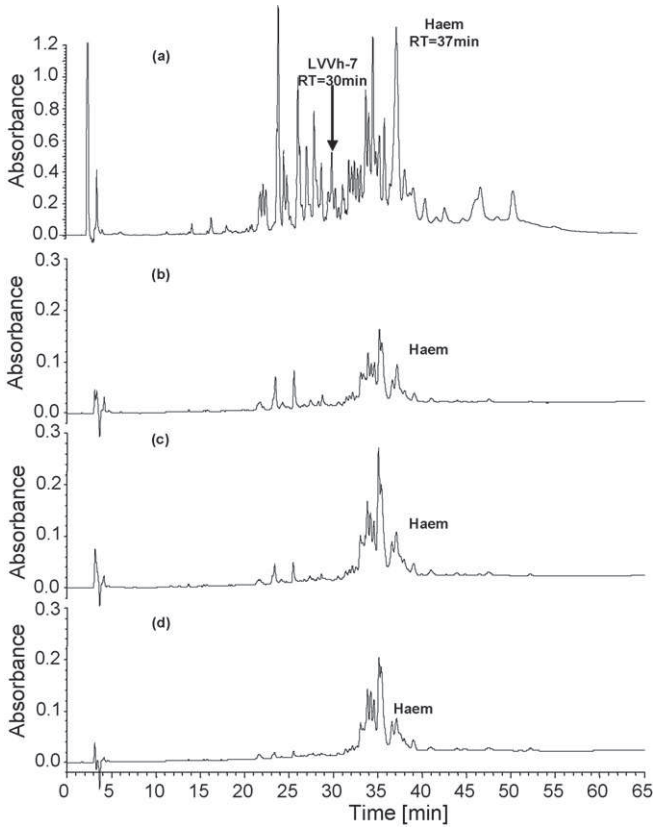


Fig. 6. RP-HPLC profiles of the peptidic hydrolysate 15% (a) and the foam after draining volumes 50 mL (b), 100 mL (c) and 150 mL (d). Hydrolysate volume: 100 mL (0.1%, w/v); air flow rate: 50 mL/s; foam height: 60 cm.

1700 cal mol^{-1} as Bigelow scale [15], was not retained in the top foam due to its small molecular mass (1308 Da). Moreover, the peptides retained in the top foam had a hydrophobicity inferior to 1000 cal mol^{-1} [10]. Therefore, these facts show that peptide molecular size was the most important physico-chemical factor which governs the peptidic fractionation in this bubbling-draining system.

Using HPLC area, we have estimated a 5% (w/w) extraction yield of the higher molecular mass peptidic fraction collected in 5 mL of the top foam. In order to increase the quantity of this interesting fraction, we have tried to use more concentrated starting hydrolysate. In this case, necessary draining volume to obtain a fractionation was important and was not compatible with the size of the column.

4. Conclusion

Bubbling-draining method has allowed to fractionate complex peptidic hydrolysates (DH = 3, 15 and 23%) issued from hydrolysis of bovine haemoglobin by pepsin. Firstly, no foam was obtained with the hydrolysate 23% at a 0.1% concentration whereas stable foam was obtained for hydrolysates 3 and 15% for the same concentration, but no separation was obtained without forced draining volume. When 100 or 150 mL draining volume is used on hydrolysate 15%, all peptides were desorbed from air/water interface in the top foam, whereas a peptidic fraction between 3500 Da < Mw < 7000 Da was retained with the hydrolysate 3%. Fractionation depended on the relative molecular weight of peptides as well as the draining rate of the foam liquid fraction.

This bubbling-draining method also appears as a rapid and simple method to fractionate complex peptidic hydrolysate containing large peptides. Moreover, foam fractionation of bioactive peptides has the potential to replace commonly applied methods, as chromatographic methods which are expensive and often require several fractionation steps to produce peptides of interest. Therefore, bubbling-draining method appears as an economic and ecologic method because it can replace cost and ecologic disadvantageous processes as commonly applied purification processes.

To date, other parameters as pH, air flow rate, draining buffer ionic strength have been studied in an experimental design. Responses were active fraction enrichment and recovery yield in the top foam. This screening has showed a significative effect of draining buffer pH, ionic strength and volume. Then, we investigate the optimization of these three parameters on the fractionation process.

Acknowledgements

We would like to thank Mrs. Christine Vanuxem for English manuscript reviewing. This work was supported by grants of Nord-Pas-de-Calais Region.

References

[1] R. Jost, J.C. Monti, J.J. Pahud, Whey protein allergenicity and its reduction by technological means, Food Technol. 41 (1987) 118–121.
[2] H. Meisel, E. Schlimme, Bioactive peptides derived from molk proteins—ingredients for functional foods? Kieler Milchw. Forsch. 48 (1996) 343–357.
[3] C.A. Parish, H. Jiang, Y. Tokiwa, N. Berova, K. Nakanishi, D. Mc Cabe, et al., Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin, Bioorg. Med. Chem. 9 (2001) 377–382.
[4] P. Bhattacharya, S.K. Ghosal, K. Sen, Effect of physicochemical parameters on the separation of proteins from human placental extract by using a continuous foam fractionating column, Sep. Sci. Technol. 26 (1991) 1279–1293.
[5] S. Bhattacharjee, R. Kumar, K.S. Gandhi, Modelling of protein mixture separation in a batch foam column, Chem. Eng. Sci. 56 (2001) 5499–5510.
[6] S. Sarker, P. Bhattacharya, R.N. Mukherjea, M. Mukherjea, Isolation and purification of protease from human placenta by foam fractionation, Biotechnol. Bioeng. 29 (1987) 934–940.
[7] S. Bhattacharjee, R. Kumar, K.S. Gandhi, Modeling of protein mixture separation in a batch foam column, Chem. Eng. Sci. 52 (1997) 4625–4636.
[8] Z. Liu, Z. Liu, Z. Shen, F. Ding, N. Yuan, Foam separation of proteins in a loop bubble column, Bioseparation 6 (1996) 353–359.
[9] J. Adler-Nissen, Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, J. Agric. Food Chem. 27 (1978) 1256–1262.
[10] R. Froidevaux, B. Lignot, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, B. Coddeville, G. Ricart, Kinetics of appearance of hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by a direct coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry, J. Chromatogr. A 873 (2000) 185–194.
[11] A. Krishnan, C.A. Siedlecki, E.A. Vogler, Traube-rule interpretation of protein adsorption at the liquid–vapor interface, Langmuir 19 (2003) 10342–10352.
[12] E.A. Vogler, Donnan effects in the steady-state diffusion of metal ions through charged thin films, Langmuir 8 (2005) 10342–10350.
[13] Y. Popineau, B. Huchet, C. Larré, S. Bérot, Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration, J. Cereal Sci. 35 (2002) 327–335.
[14] C. Larré, W. Mulder, R. Sanchez-Vioque, J. Lazko, S. Bérot, J. Guéguen, Y. Popineau, Characterisation and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate, Colloids Surf. B: Biointerf. 49 (2006) 40–52.
[15] C.C. Bigelow, On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure, J. Theor. Biol. 16 (1967) 187–211.

C. Extraction de peptides par électrodialyse associée à des membranes d'ultrafiltration

Le but de cette troisième section est l'extraction de peptides grâce à un procédé innovant se basant sur une ultrafiltration où la seule force motrice est un gradient électrique (EDUF).

Les peptides présents dans l'hydrolysat sont attirés vers la cathode ou l'anode, en fonction de leur charge globale. Des compartiments de récupération, séparés par une membrane d'ultrafiltration, permettent d'isoler simultanément les différentes populations peptidiques. Ainsi la charge du peptide, mais aussi l'interface membranaire (seuil de coupure, charge de la membrane) interviennent dans la sélectivité de l'extraction.

Dans un premier temps, deux hydrolysats de D.H. 15 %, l'un brut et l'autre décoloré (sans hème) furent soumis trois fois au traitement d'EDUF pour d'une part fractionner la population peptidique, mais également pour observer le comportement des membranes à l'encrassement. Le suivi de la conductivité durant le procédé, et des analyses par un dosage à l'aide de réactifs BCA, C.L.H.P.-P.I. et E.S.I.-S.M. permirent d'évaluer la migration des peptides dans chaque cas.

L'encrassement des membranes fut ensuite évalué grâce à une mesure physique de l'épaisseur et grâce à la mesure du potentiel d'écoulement des membranes. Ces analyses furent effectuées après le troisième protocole d'extraction et après un protocole de désorption pour pouvoir comparer l'intégrité de toutes les membranes d'ultrafiltration, vers l'anode et vers la cathode.

1. Matériels et méthodes spécifiques

1.1. Configuration des cellules d'électrodialyse

1.1.1. Cellule d'extraction

La cellule d'électrodialyse utilisée pour ces expériences était une cellule de type MP (surface effective de 100 cm²) (ElectroCell AB, Täby, Suède) avec une membrane cationique Neosepta CMX-SB (Tokuyama Soda Ltd., Tokyo, Japon), une membrane anionique Neosepta AMX-SB (Tokuyama Soda Ltd., Tokyo, Japon) et deux membranes en ester de cellulose avec un seuil de coupure de 20 kDa (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, Etats-Unis). La configuration de la cellule, présentée dans la figure 40, montre quatre boucles de circulation (pour les compartiments de KCl 1 et KCl 2, de NaCl et d'hydrolysat). Chaque boucle fermée était connectée à un réservoir extérieur pour permettre une recirculation des solutions. Les solutions circulaient à l'aide de quatre pompes centrifuges et les débits étaient contrôlés à l'aide de débitmètres. L'anode (D.S.A.) et la cathode (électrode en acier inoxydable de type 316) étaient fournies avec la cellule MP. La différence de voltage était maintenue constante grâce à un générateur de tension variable de 0 à 100V. Le système n'était pas équipé pour maintenir les solutions à température constante.

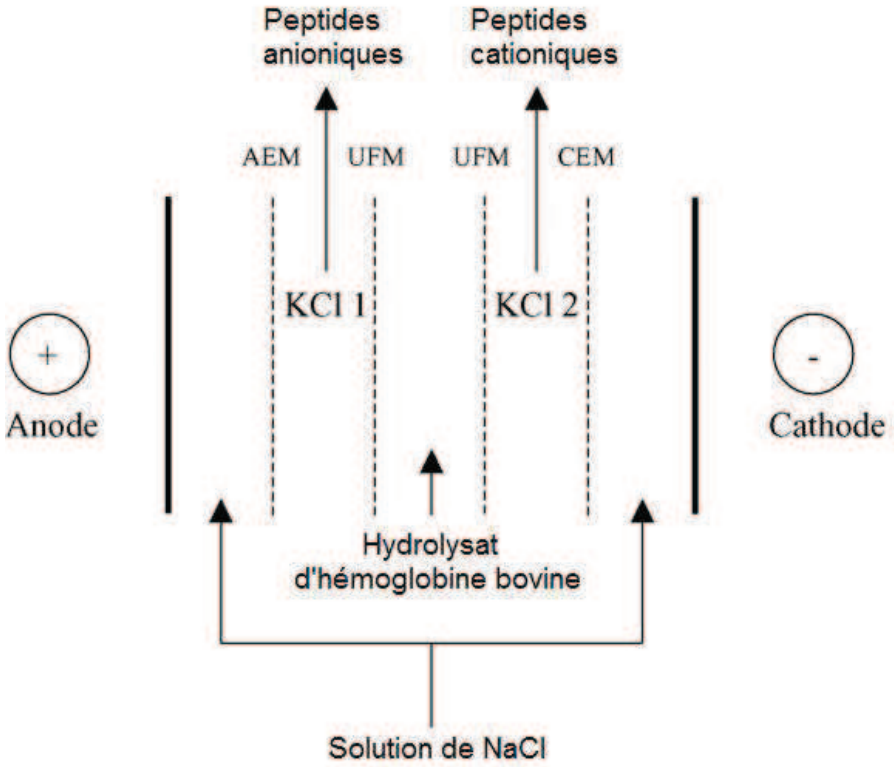


Figure 40. Configuration du module d'électrodialyse avec deux membranes d'ultrafiltration pour la séparation simultanée des peptides anioniques et cationiques d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (D.H. 15%). UFM : membrane d'ultrafiltration. A.E.M. : membrane échangeuse d'anions. C.E.M. : membrane échangeuse de cations.

1.1.2. Cellule de désorption

Une cellule d'électrodialyse de type MicroFlow (ElectroCell, Täby, Suède) d'une surface effective de 10 cm² était utilisée dans ce procédé. Les configurations de la cellule, présentées en figure 41, définissent 3 boucles de circulation. Chacun des liquides des trois compartiments recirculait à l'aide de pompes centrifuges, en boucle fermée, connectés à des réservoirs extérieurs. Les débits étaient contrôlés grâce à des débitmètres. L'anode et la cathode étaient de même type que celles utilisées dans le premier montage en extraction. La différence de voltage était maintenue constante grâce à un générateur de tension variable (HPD 30-10SX, Xantrex, Burnaby, BC, Canada) de 0 à 30V.

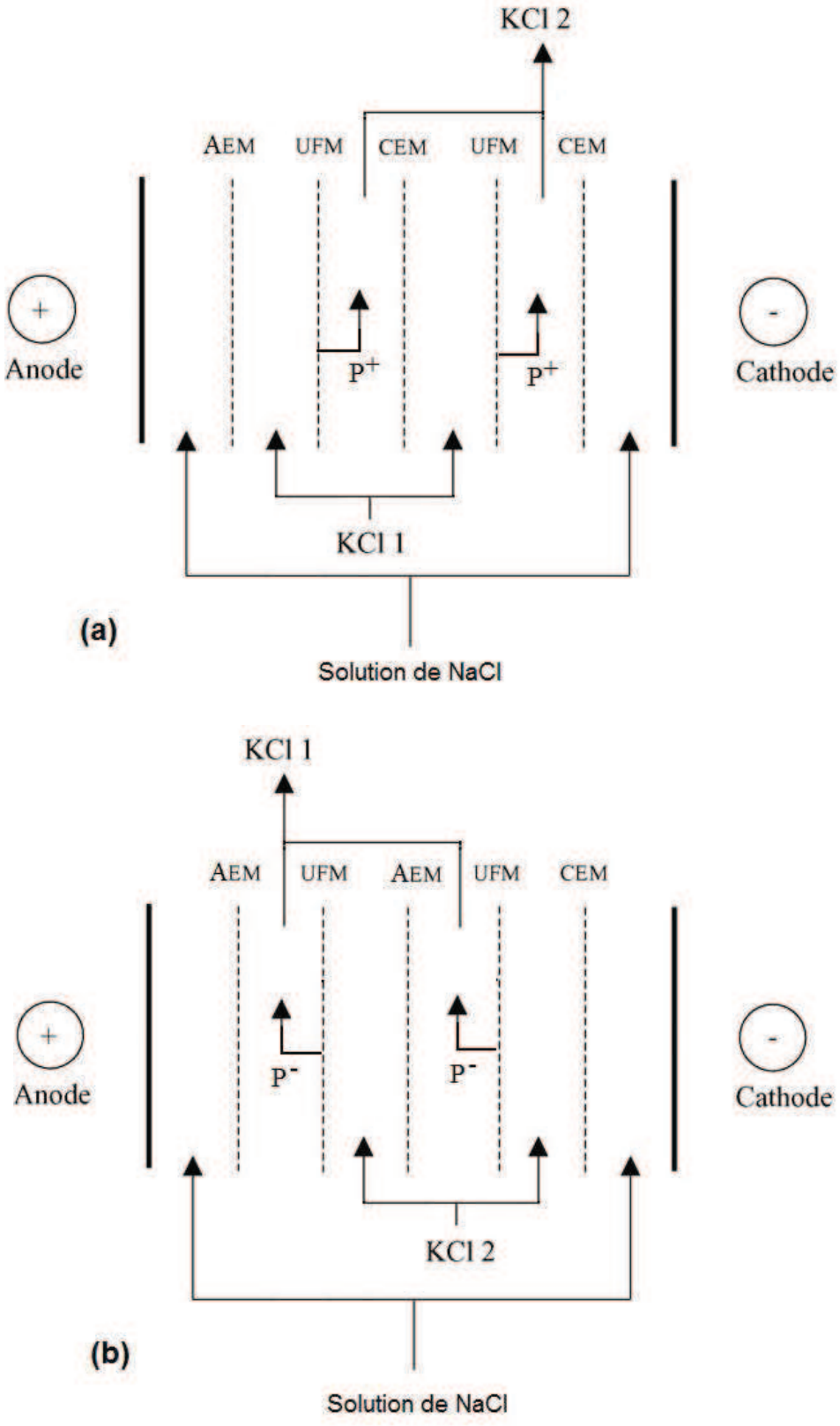


Figure 41. Configuration du module d'électrodialyse avec deux membranes d'ultrafiltration issues des extractions menées sur les hydrolysats d'hémoglobine bovine (D.H. 15%) pour la désorption des peptides (a) cationiques et (b) anioniques. UFM : membrane d'ultrafiltration. A.E.M. : membrane échangeuse d'anions. C.E.M. : membrane échangeuse de cations.

1.2. Protocole expérimental

1.2.1. Protocole d'extraction

Dans cette expérience, la configuration d'EDUF développée par Poulin *et coll.* (2006) a été utilisée dans le but de séparer simultanément les peptides chargés positivement et négativement présents initialement dans les hydrolysats d'hémoglobine bovine. L'extraction était effectuée à un voltage constant de 8 V, choisi grâce à la détermination du courant limite (Cowan et Brown, 1959). Le traitement a duré 2 heures. Les compartiments d'alimentation de l'électrode, des solutions de perméats (KCl1 vers l'anode, KCl2 vers la cathode) et de l'hydrolysat contenaient respectivement, une solution de NaCl à 20 g/L (5L), une solution de KCl à 2 g/L (2,5 L) et une solution aqueuse d'hydrolysat d'hémoglobine bovine à 0,5 % (p/v) (2,5 L). Les débits étaient de 2,5 L/min pour les solutions de KCl et d'hydrolysat, et de 5 L/min pour la solution de NaCl au contact des électrodes. Le pH était maintenu constant à pH 7,0 par l'addition dans chaque compartiment de HCl ou de NaOH (0,01 M) afin de compenser les variations de pH dues aux migrations des différents ions et peptides. Le pH était choisi pour avoir à la fois dans la solution d'hydrolysat d'hémoglobine bovine des peptides chargés positivement et négativement. Trois répétitions furent menées avec les mêmes membranes pour l'hydrolysat brut, et de nouvelles membranes furent utilisées pour trois répétitions avec l'hydrolysat décoloré. 10 mL d'hydrolysat et des solutions de KCl furent prélevés avant d'appliquer le voltage, puis toutes les 30 minutes. Le profil peptidique des solutions d'hydrolysats et de KCl furent ensuite déterminés par analyses en C.L.H.P.-P.I.. La concentration en peptides fut déterminée par un dosage à l'aide des réactifs d'essai BCA (Pierce, Rockford, IL, Etats-Unis) en prenant l'hydrolysat d'hémoglobine bovine comme standard pour la courbe d'étalonnage. À la fin des trois extractions d'ÉDUF, deux morceaux de chaque membrane d'UF de 3 cm x 4 cm ont été découpés afin de mesurer le potentiel d'écoulement des membranes. De mêmes des photographies numériques de chacune des membranes d'UF ont été prises lors du démontage final de la cellule.

1.2.2. Protocole de désorption

La cellule de désorption a été configurée sur les mêmes bases que la cellule d'extraction, pour permettre aux peptides de poursuivre leur migration dans le même sens à travers la membrane UF. Pour la désorption, deux autres morceaux (30 x 35 mm) de la membrane UF 100 cm² précédemment utilisés pour le protocole d'extraction des peptides ont été coupés et placés dans une petite cellule ED (surface effective = 10 cm²). L'électroséparation a été réalisée en utilisant une différence constante de tension anode/cathode de 8V. Un protocole de désorption fut appliqué pour chaque morceau de membrane UF et avait une durée de 30 minutes. Le premier compartiment comprenait une solution aqueuse de NaCl (20 g/L, 150 mL) comme solution de rinçage de l'électrode. Le deuxième et le troisième compartiment comprenaient des solutions aqueuses de KCl (2 g/L, 150 mL). Le débit des solutions de KCl était de 100 mL/min tandis que le débit de la solution de l'électrode a été de 200 mL/min. Le pH fut maintenu constant à 7 dans chaque compartiment par ajout de solutions de HCl ou de NaOH (0.01M). Les analyses à l'aide des

réactifs BCA et par C.L.H.P.-P.I. ont été effectuées sur les solutions finales. Les membranes d'UF furent analysées à la fin des traitements par la mesure de leur potentiel d'écoulement.

1.3. Conductivité

Un conductimètre YSI, modèle 3100, a été utilisé avec un modèleYSI 3252 à sonde immergée, d'une constante de cellule K = 1 cm^{-1} (Yellow Springs Instrument Co., Yellowsprings, OH, Etats-Unis).

1.4. Détermination de la densité limite de courant

La densité limite de courant a été déterminée, selon la méthode de Cowan et Brown (1959), en augmentant rapidement la tension par incréments de 0.5 V de 1.0 à 30.0 V, tout en notant la valeur d'intensité correspondant à chaque valeur de tension. Ensuite, la résistance du système apparente (R = U/I) fut tracée contre l'inverse de l'intensité. Le point d'inflexion sur ce graphique indiquait la densité limite de courant.

1.5. Dosage total en protéines

La concentration totale en peptides a été déterminée en utilisant des réactifs de dosage de protéines BCA (Pierce, Rockford, IL, USA). Les analyses ont été réalisées sur des microplaques en mélangeant 25 µL de l'échantillon avec 200 µL du réactif de travail, le tout mis en incubation à 37 °C pendant 30 min. La microplaque était ensuite refroidie à température ambiante pendant 15 min et l'absorbance était lue à 562 nm sur un lecteur de microplaques. La concentration a été calculée (en mg/mL) grâce à une courbe d'étalonnage en utilisant l'hydrolysat d'hémoglobine bovine comme standard.

1.6. Mesure de l'épaisseur des membranes

L'épaisseur des membranes fut mesurée grâce à un indicateur Mitutoyo Corp. (modèle ID-110 ME, Japon) et un mini-processeur (modèle DP-1HS, Japon), destinés spécialement à la mesure de l'épaisseur de films plastiques. La résolution était de 1 µm pour une valeur maximum de 10 mm. La valeur d'épaisseur de membrane fut moyennée sur 6 à 10 mesures réalisées à différents endroits de la membrane.

1.7. Potentiel d'écoulement

La cellule dédiée à la mesure du potentiel d'écoulement est constituée de deux plaques en plexiglas, la partie inférieure contenant deux électrodes en platine. Entre ces deux électrodes sont placés 2 échantillons de la même membrane (les couches actives sont face à face) séparés par un canal en téflon. Deux manomètres sont placés à l'entrée et à la sortie de la cellule permettant la lecture visuelle des pressions appliquées. La circulation des solutions est assurée à l'aide d'une pompe centrifuge (Baldor Electric Co., Forth Smith, ARK, Etats-Unis). Les mesures sont effectuées avec des solutions de KCl 10^{-3} M dans une gamme de pH

de 4 à 9 et une gamme de pression allant de 0,60 à 1,80 bar avec un incrément de 0,2 bar. Pour l'ensemble des expériences, la température est maintenue constante à 25 °C. Chaque expérience est réalisée en triplicata.

2. Paramètres d'électrodialyse

L'hydrolysat de D.H. 15 % alimente le procédé d'EDUF sur 3 répétitions successives d'extraction avec les mêmes membranes d'UF. Dans un premier temps, le suivi des conductivités des solutions de chaque compartiment permit de suivre la migration des ions et molécules chargés. Ensuite le calcul de la résistance globale du système au début de chaque répétition permit de suivre l'évolution de l'encrassement des membranes au cours du temps.

2.1. Conductivité

La conductivité des solutions d'hydrolysat et de récupération KCl 1 et KCl 2 fut suivie durant tout le procédé d'extraction. La conductivité des solutions décroit linéairement dans tous les compartiments sauf pour les compartiments de NaCl et pour l'hydrolysat décoloré qui augmentent linéairement (Tableau 27).

	Conductivité initiale (µS/cm)	**Conductivité finale (µS/cm)**	**% minéralisation**	**pente (µS/cm.min)**	**R^2**
KCl2 (hydrolysat brut)	3343±74	3219±71	-3,71	-1,059	0,8593
KCl1 (hydrolysat brut)	3183±139	2712±191	-14,80	-4,076	0,9596
NaCl (hydrolysat brut)	31494±473	33362±433	5,93	6,633	0,9361
hydrolysat brut	1504±4	1372±40	-8,78	-1,315	0,7430
KCl2 (hydrolysat décoloré)	3304±72	2672±12	-19,13	-5,267	0,9987
KCl1 (hydrolysat décoloré)	3185±53	2755±61	-13,50	-3,594	0,9956
NaCl (hydrolysat décoloré)	31478±1103	32340±1036	2,74	15,11	0,9770
hydrolysat décoloré	1902±65	2307±36	21,29	3,233	0,9870

Tableau 27. Conductivités moyennes des différents compartiments au début et à la fin des protocoles d'EDUF.

La déminéralisation des solutions de KCl est cohérente avec la configuration de la cellule d'extraction : les ions K^+ et Cl^- migrent des compartiments de solutions KCl vers ceux de NaCl et d'hydrolysat respectivement.

La conductivité de l'hydrolysat décoloré se comporte de manière opposée aux solutions de KCl : sa conductivité augmente alors qu'en théorie des peptides et des sels doivent en être extraits. Ceci doit être dû à la migration des ions K^+ et Cl^-, provenant respectivement des solutions KCl 1 et KCl 2 en direction de l'hydrolysat. Ces ions

migreraient vers leur électrode respective (K^+ vers la cathode et Cl^- vers l'anode) en traversant la solution d'hydrolysat ce qui en augmenterait sa conductivité. Cependant le même phénomène devrait être observé avec l'hydrolysat brut mais sa conductivité décroit légèrement. Ceci doit être dû à l'encrassement observé sur la membrane d'UF du compartiment KCl2 avec l'hydrolysat brut (photographies montrées dans la figure 42) qui ralentirait la migration des ions. Ces résultats, exceptés pour le cas du compartiment avec l'hydrolysat brut, sont cohérents avec ceux de Poulin *et coll*. (2006).

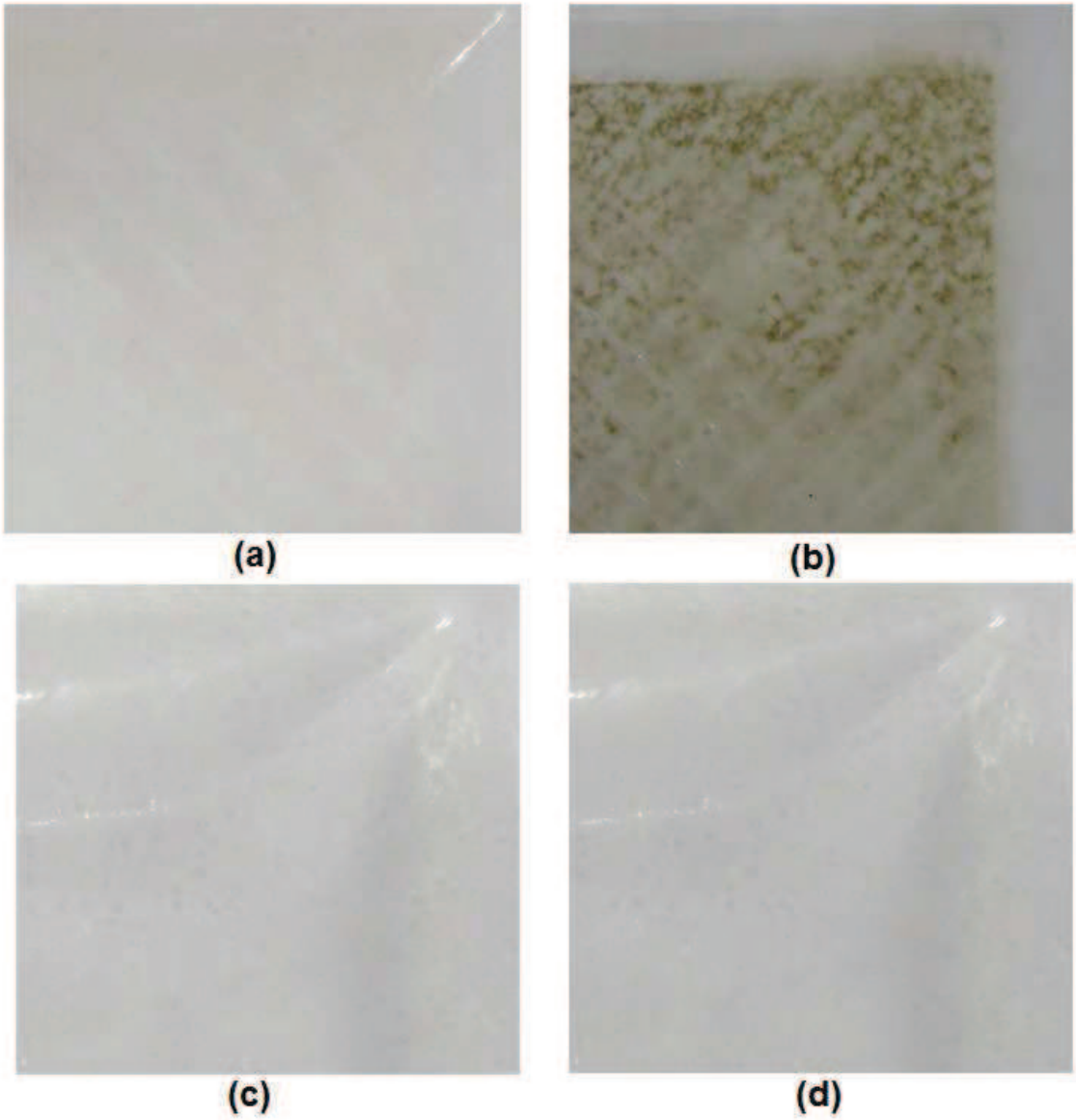


Figure 42. Photographies des membranes d'UF après le troisième protocole d'extraction pour l'hydrolysat brut vers (a) l'anode et (b) la cathode, et pour l'hydrolysat décoloré vers (c) l'anode et (d) la cathode.

2.2. Résistance apparente du système

La résistance apparente du système fut évaluée au début de chaque traitement d'extraction. Pour l'hydrolysat brut, la résistance du système augmente de 22,86 Ω au début du premier traitement jusqu'à 29,74 Ω au début du troisième, ce qui correspond à un accroissement de la résistance globale du système de 30 % tandis que pour l'hydrolysat décoloré, elle reste relativement constante, de 31,88 Ω au début du premier traitement à 32,08 Ω au début du troisième traitement. La résistance pour l'hydrolysat brut augmente en fonction du nombre de traitements à cause de la présence de l'hème qui encrasse la membrane d'UF. L'encrassement de la membrane est probablement causé par des agrégats peptides-hème ou peptides-peptides, déjà mis en évidence par Lebrun *et coll*. (1998) lors des études d'ultrafiltration d'un hydrolysat de D.H. 11 % sur une membrane en PES de seuil de coupure de 10 kDa où les peptides les plus hydrophobes étaient agrégé à l'hème, ce qui formait de larges complexes hydrophobes qui ne pouvaient traverser la membrane, pendant que les peptides les plus hydrophiles étaient libres de passer celle-ci. Le traitement de décoloration par ultrafiltration éliminant l'hème et potentiellement les peptides de plus grande taille, le risque d'encrassement de la membrane d'UF avec l'hydrolysat décoloré est alors réduit. Ces résultats confirment les observations précédentes faites sur les photographies de la figure 42 où on peut effectivement observer un encrassement par l'hème, et donc des peptides agrégés, sur la membrane coté cathode avec l'hydrolysat brut. Encrassement qu'on n'observe pas dans le même cas avec l'hydrolysat décoloré.

3. Migration peptidique

3.1. Migration peptidique totale

La migration des peptides à partir des hydrolysats d'hémoglobine bovine vers les compartiments KCl 1 (pour les peptides chargés négativement) ou KCl 2 (pour les peptides chargés positivement) sont présentés dans la figure 43.

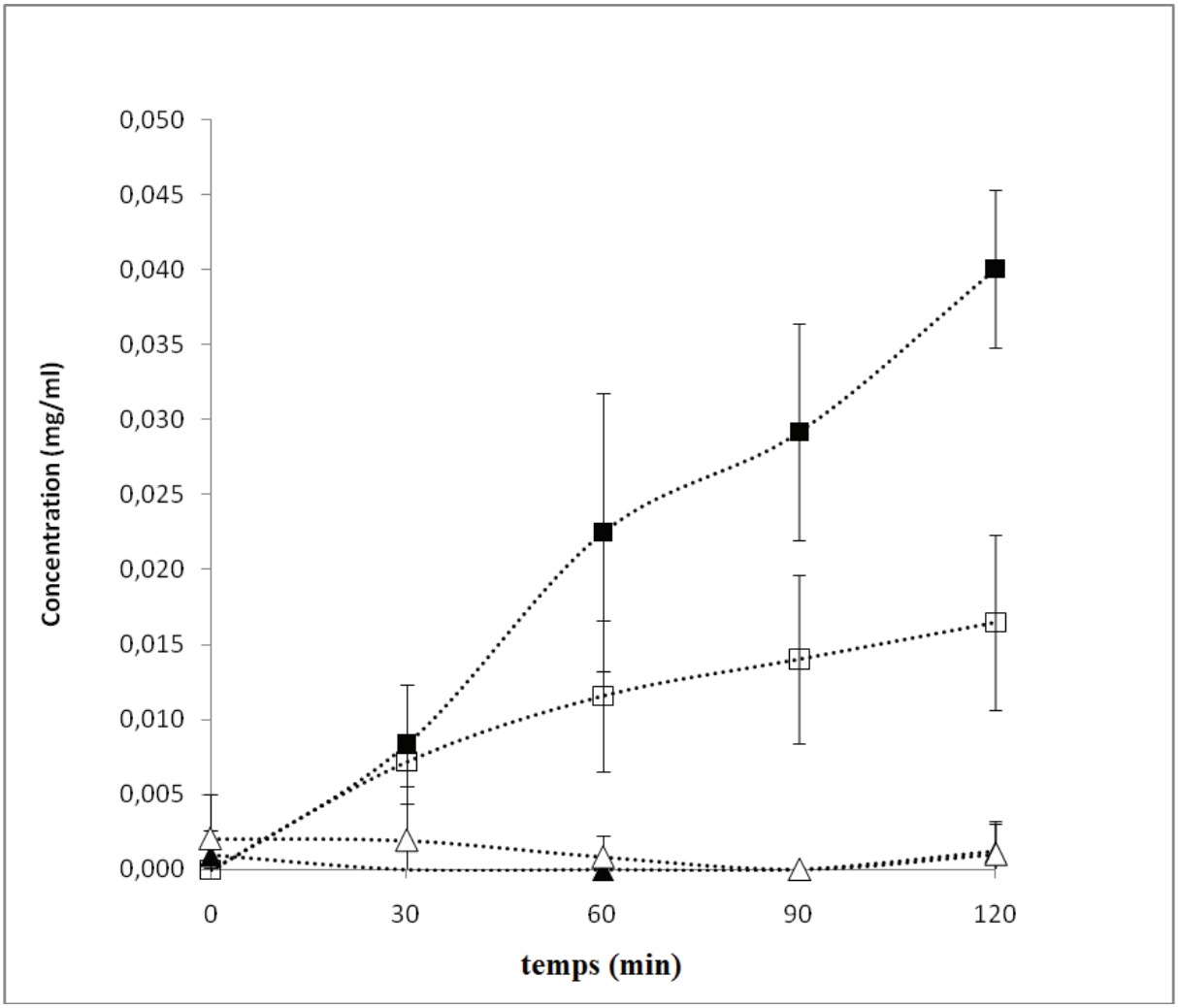


Figure 43. Evolution de la concentration totale en peptides en fonction du temps d'EDUF dans les solutions KCl 1 pour les hydrolysats brut (Δ) et décoloré (▲), et dans les solutions KCl 2 pour les hydrolysats brut (□) et décoloré (■).

Grâce au maintien du pH des solutions à 7, une migration simultanée des peptides anioniques et cationiques était attendue. Cependant les peptides n'ont migré que dans le compartiment KCl 2 et étaient absents du compartiment KCl 1 quelque soit l'hydrolysat. Les courbes montrent une migration linéaire vers le compartiment KCl 2 pour l'hydrolysat décoloré ($R^2 > 0,991$, pente : $3,374.10^{-4}$ mg/mL.min) et pour l'hydrolysat brut ($R^2 > 0,940$, pente : $1,325.10^{-4}$ mg/mL.min). Les concentrations finales dans le compartiment KCl 2 après

les 2 heures d'extraction étaient de 0,016 mg/mL (rendement en fin d'expérience de 0,43 %) et 0,040 mg/mL (rendement en fin d'expérience de 1,19 %) pour l'hydrolysat brut et l'hydrolysat décoloré respectivement. Les vitesses de migration dans les compartiments KCl 2 étaient de 5,061 g/h.m² et 1,988 g/h.m² pour l'hydrolysat décoloré et l'hydrolysat brut respectivement. Cette différence peut être expliquée par l'encrassement observé dans le cas de l'hydrolysat brut, qui ralentit probablement l'extraction des peptides. La vitesse de migration dans le cas de l'hydrolysat décoloré est cohérente avec la gamme de vitesses de migration observée dans des études précédentes par Poulin *et coll*. (2006) qui ont travaillé sur une cellule semblable mais à partir d'un hydrolysat de β-lactoglobuline, et qui avaient des valeurs de vitesse de transfert comprises entre 7,8 et 10,2 g/h.m² sans encrassement majeur (comme dans notre cas avec l'hydrolysat brut). L'absence d'extraction dans le comportement KCl 1 peut être due à un temps de migration trop court, dépendant d'un fort ratio masse/charges, ou à une interaction des peptides anioniques avec la membrane. Des encrassements liés à des interactions entre des peptides et la membrane avaient déjà observés dans des études précédentes comme celles de Lapointe *et coll*., 2005 où un hydrolysat de β-lactoglobuline était électro-nanofiltré : le peptide β-Lg(15-20) était mis en évidence comme un peptide directement impliqué de l'encrassement de la membrane via des interactions hydrophobes avec celle-ci.

3.2. Profils C.L.H.P.-P.I.

Les profils chromatographiques des hydrolysats peptidiques et des fractions extraites des compartiments KCl 1 et KCl 2 sont présentés dans la figure 44.

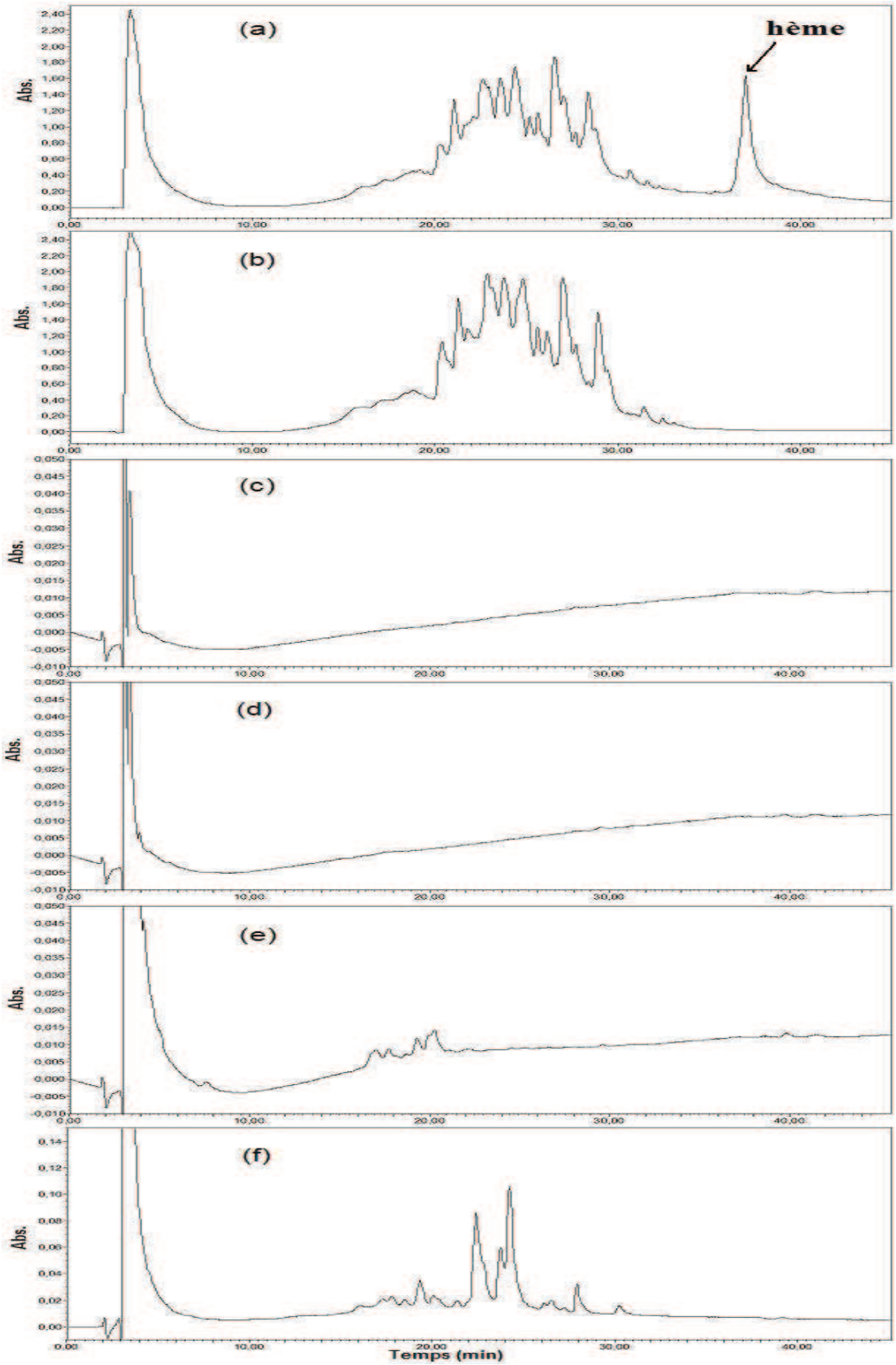


Figure 44. Profils chromatographiques de C.L.H.P.-P.I. des hydrolysats brut (a) et décoloré (b), des solutions de KCl 1 pour les hydrolysats brut (c) et décoloré (d), des solutions de KCl 2 pour les hydrolysats brut (e) et décoloré (f) après le troisième traitement de 2 h d'EDUF.

Le premier grand pic observé à 3 min correspond au volume mort où les sels sont expulsés. L'hème est effectivement éliminé du profil initial de l'hydrolysat décoloré. L'absence de peptides dans les compartiments KCl 1 est observée alors qu'ils sont présents dans les compartiments KCl 2.

En comparant les profils chromatographiques des hydrolysats bruts et décolorés dans le compartiment KCl 2, il est mis en évidence que les pics sont d'une intensité plus faible avec l'hydrolysat brut, ce qui corrobore nos résultats précédents obtenus avec l'analyse BCA (figure 45). Par ailleurs, la population des peptides ayant migrés dans les compartiments KCl 2 semble différente pour l'hydrolysat brut et l'hydrolysat décoloré. Cette différence peut être expliquée par la présence ou l'absence d'hème : dans l'hydrolysat brut, l'hème peut s'agréger à de nombreux peptides hydrophobes (peptides possédant un temps de rétention plus élevé en C.L.H.P.-P.I.), ce qui diminue logiquement la capacité de migration dans notre système, en augmentant leur masse moléculaire globale (agrégats) et en masquant des charges (neutralisation de charges des peptides par celles de l'hème agrégé). L'hème est maintenu en solution par ses interactions hydrophobes avec les peptides (Lebrun *et coll*., 1998). Mais l'hème est aussi chargé négativement, à cause de deux groupements acides carboxyliques, et peut ainsi être associé à des peptides chargés majoritairement de manière positive, ces peptides étant eux-mêmes attirés pas la cathode. Ceci confirme les résultats précédents concernant l'encrassement probablement dû à des agrégats hème-peptides ou peptides-peptides sur la membrane d'ultrafiltration du côté cathode avec l'hydrolysat brut, aboutissant à une plus faible migration des peptides.

3.3. Résultats E.S.I.-S.M.

Les solutions des compartiments KCl 2 pour les hydrolysats brut et décoloré furent analysées par E.S.I.-S.M.. Les peptides présents dans ces fractions ont un temps de rétention compris entre 10 min et 35 min comme le montre le profil chromatographique présenté en figure 45.

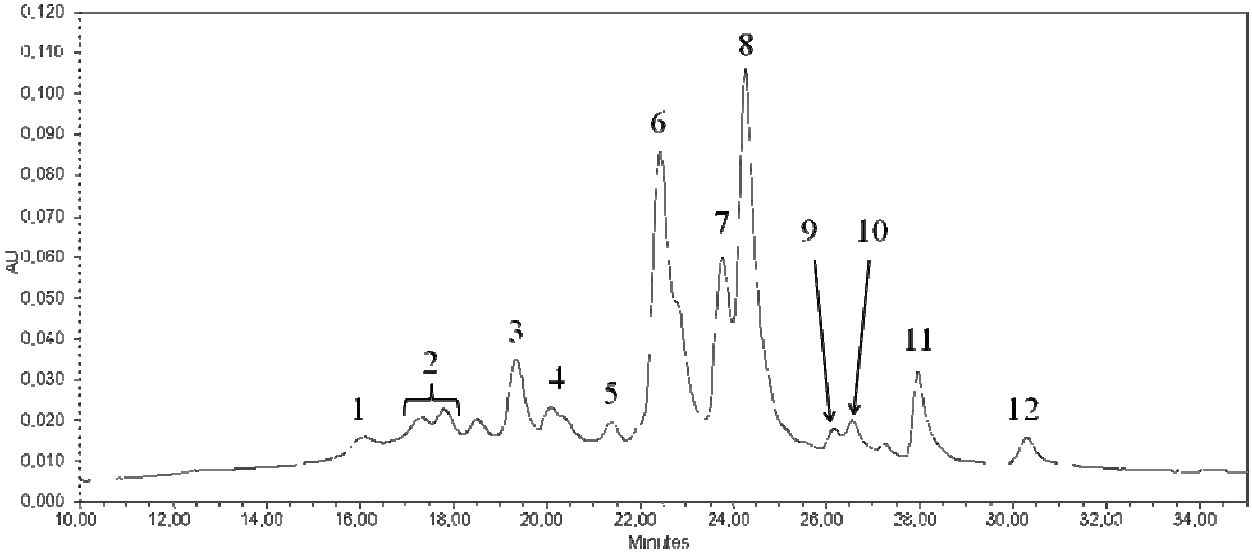


Figure 45. Profil chromatographique de C.L.H.P.-P.I. analysé par E.S.I.-S.M. de la solution du compartiment KCl 2 issue du traitement par EDUF de l'hydrolysat décoloré.

Le tableau 28 présente les résultats de l'analyse en spectrométrie de masse pour la fraction KCl 2 de l'hydrolysat décoloré.

Pic n°	Poids moléculaire (Da)	Séquence peptidique	Séquence en acides aminés
1	1803	α(47-65)	DLSHGSAQVKGHGAKVAAA
2	706	β(7-13)	KAAVTAF
2	2051	β(51-69)	DAVMDDPKVKAHGKKVLDS
3	1285	α(87-97)	HAHKLRVDPVN
4	2235	α(1-23)	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAE
4	1305	β(91-101)	HCDKLHVDPEN
5	1432	α(87-98)	HAHKLRVDPVNF
6	909	α(99-106)	KLLSHSLL
7	1378	β(113-124) ou β(114-125)	LARNFGKFFTPV ou ARNFGKFFTPVL
8	1238	α(36-45) ou α(37-46)	FPTTKTYFPH ou PTTKTYFPHF
9	1806	α(66-82) ou α(67-83)	LTKAVEHLDDLPGALSE ou TKAVEHLDDLPGALSEL
10	1585	α(33-45) ou α(34-46)	FLSFPTTKTYFPH ou LSFPTTKTYFPHF
11	?		
12	?		

Tableau 28. Tableau de correspondance des analyses en E.S.I.-S.M. des peptides isolés dans la solution du compartiment KCl 2 présentés dans la figure 45.

La solution issue du compartiment KCl 2 pour l'hydrolysat décoloré présente des concentrations trop faibles pour être correctement analysées, même après un traitement de concentration par évaporation : l'intensité des pics des peptides se mêlaient à ceux du bruit de fond. Cependant, par comparaison des temps de rétention avec les profils chromatographiques

précédents (figure 44), seuls les pics numérotés de 1 à 5, d'après le tableau 28, étaient extraits dans la solution du compartiment KCl 2 pour l'hydrolysat brut. Les pics 11 et 12 se confondaient avec le bruit de fond de l'E.S.I.-S.M. et ne furent pas identifiables. De plus, la C.L.H.P.-S.M. avait une résolution moins bonne que la C.L.H.P.-P.I. seule. Ceci cause des incertitudes sur le positionnement de peptides sur quelques pics. Les peptides identifiés pour les solutions de KCl 2 comprennent des peptides de masse moléculaires comprises entre 706 Da et 2973 Da. Les solutions issues des compartiments KCl 1 ne furent pas analysées, les résultats précédents ne montrant aucune extraction de peptides.

D'après Froidevaux *et coll.* (2000), les séquences peptidiques furent identifiées d'après leur poids moléculaire. D'après les séquences en acides aminés, les peptides extraits dans le compartiment KCl 2 possédaient, à pH 7 lors de l'extraction, à la fois des acides aminés chargés positivement et négativement. Cependant, leur charge globale était positive. Leur extraction était cohérente avec la configuration de la cellule : les peptides chargés majoritairement positivement étaient attirés par la cathode. Parmi ces peptides extraits, plusieurs furent déjà référencés pour leurs propriétés antimicrobiennes, α(1-23), α(36-45) ou α(33-45) notamment (Froidevaux *et coll.*, 2001 ; Nedjar-Arroume *et coll.*, 2008).

D'autres peptides étaient attendus pour extraction dans la solution KCl 2, tels que les séquences α(33-66) ou β(32-40) par exemple, toutes deux issues de l'hémoglobine bovine hydrolysée avec un degré d'hydrolyse de 15 % (Froidevaux *et coll.*, 2000), car ils étaient également chargés majoritairement positivement. Cependant, ces peptides présentaient soit un poids moléculaire important (3632 Da pour α(33-66)), soit une hydrophobie élevée (1661 cal/mol pour β(32-40) d'après l'échelle de Bigelow (1967)). L'absence de ces peptides dans la solution issue du compartiment KCl 2 tend à confirmer la présence d'agrégats hème-peptides ou peptides-peptides, qui les empêcheraient de traverser la membrane d'ultrafiltration.

4. Evaluation de l'encrassement

4.1. Evaluation de l'épaisseur des membranes

L'épaisseur d'une membrane neuve était de 305±6µm. L'épaisseur des membranes fut également mesurée après les traitements d'extraction : pour l'hydrolysat brut, les épaisseurs de membrane étaient de 305±5µm et de 314±5µm pour le coté anode et le coté cathode respectivement, et était pour l'hydrolysat décoloré de 310±4µm et 308±6µm pour le coté anode et le coté cathode respectivement. Des études précédentes (Bazinet *et coll.*, 2007) ont montré qu'un encrassement de 5-10 µm était détectable, la mesure étant précise à 1 µm près. Les différences lors de nos expériences étaient faibles mais montraient qu'un léger encrassement existait bien. La plus haute valeur pour une épaisseur de membrane est apparue pour la membrane côté cathode pour l'hydrolysat brut, ce qui montre qu'un encrassement par des agrégats hème-peptides est effectivement plus fort que par des peptides seuls.

4.2. Potentiels d'écoulement après extraction

Les potentiels d'écoulement des membranes d'ultrafiltration furent mesurés après les traitements d'extraction en EDUF (figure 46).

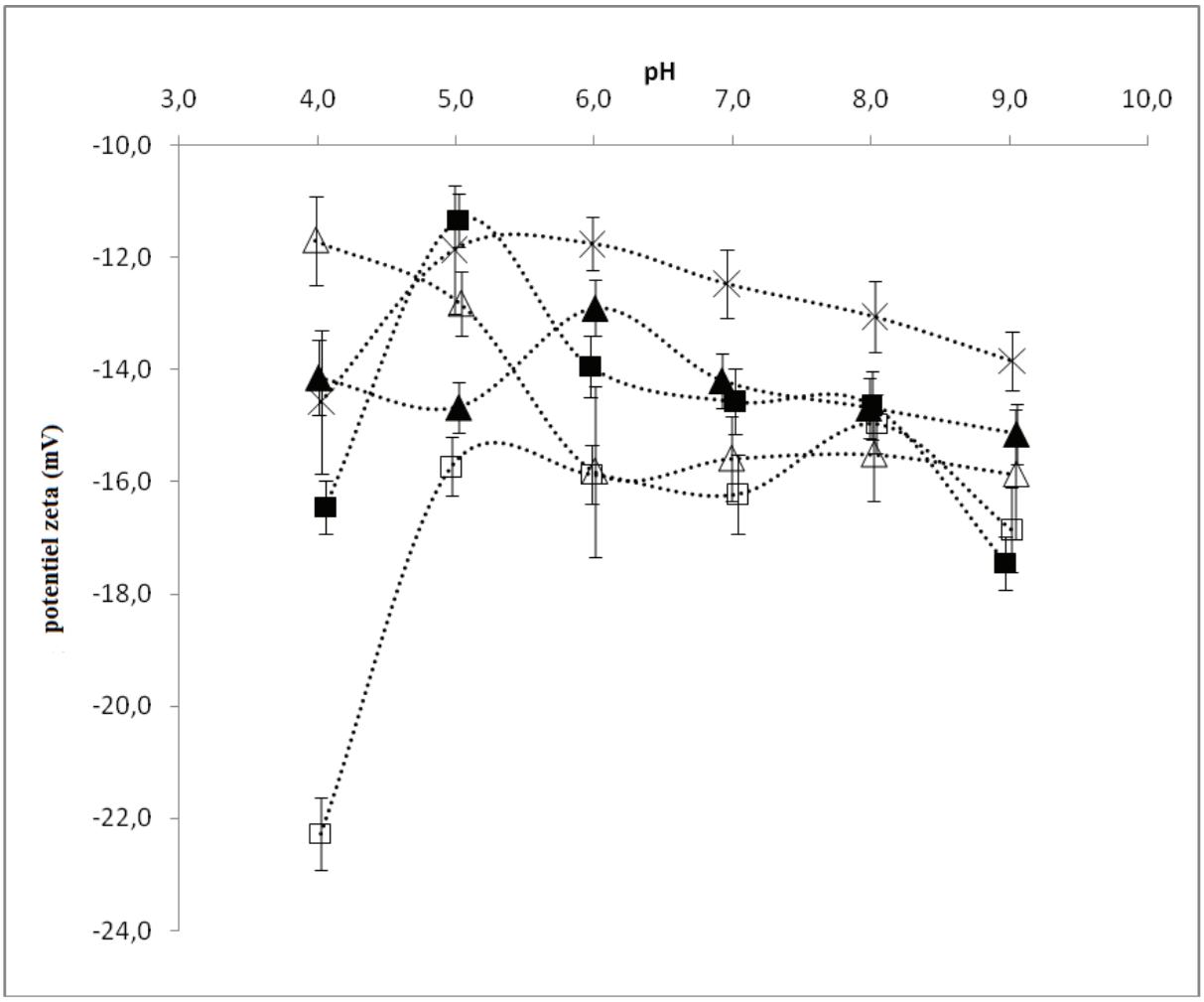


Figure 46. Evolution du potentiel d'écoulement en fonction du pH pour les membranes d'ultrafiltration après 3 extractions par EDUF avec les hydrolysats d'hémoglobine bovine de D.H. 15 % : la membrane témoin (×), les membranes coté cathode pour les hydrolysats brut (Δ) et décoloré (▲), et les membranes coté anode pour les hydrolysats brut (□) et décoloré (■).

La membrane témoin non traitée présente une charge globale négative sur la gamme de pH allant de 4 à 9, avec des valeurs de potentiel zeta comprise entre -15 mV et -11 mV. Les membranes d'UF, après traitement avec l'hydrolysat décoloré, présentent des charges semblables quelque soit leur position (anode ou cathode). Ceci confirme le fait que l'encrassement est léger ou absent. Les membranes d'UF du côté anode pour les deux hydrolysats ont le même profil général que celui de la membrane témoin, avec une baisse du potentiel zeta à pH 4. Cependant, de fortes variations sur les charges de la membrane d'UF furent observées pour l'hydrolysat brut, avec une différence allant jusqu'à 10 mV pour la membrane d'UF du côté anode à pH 4, démontrant un encrassement plus important sur cette membrane en particulier. La membrane d'UF utilisée côté cathode pour la séparation de l'hydrolysat décoloré présente des valeurs de potentiel zeta relativement stables quelque soit le pH étudié, avec des valeurs comprises entre -13 mV et – 15 mV, ne montrant pas de chute significative à pH 4. Ce type de profil est caractéristique d'un comportement intermédiaire où

la membrane serait légèrement encrassée. Au contraire, la membrane d'UF côté cathode pour l'hydrolysat brut présente un accroissement de son potentiel zeta de pH 6 à 4. Cette différence pour la membrane d'UF utilisée durant le traitement de l'hydrolysat brut, côté cathode, serait due à la présence d'hème à sa surface. Aux pH plus élevés, les groupements acides carboxyliques de l'hème sont chargés négativement, et lorsque le pH décroit, ces groupements deviennent neutres. Les agrégats hème-peptides perdent ainsi quelques charges négatives, et puisqu'ils sont encrassés dans la membrane, la charge globale de la membrane augmente.

De manière générale, toutes les membranes avaient un potentiel zeta plus faible ou proche de celui de la membrane témoin non traitée, et les profils des valeurs de potentiel zeta relevés étaient cohérents entre les membranes aux mêmes positions (cathode ou anode) dans la cellule. Les membranes UF côté anode étaient encrassées par les peptides chargés de manière négative et par conséquent attirés par la cathode. Ainsi, un accroissement des charges négatives sur la membrane entraînait une baisse du potentiel zeta. De plus, les membranes d'UF côté cathode étaient encrassées par des agrégats hème-peptides ou par des peptides chargés majoritairement de manière positive (dans le cas d'absence d'hème) qui sont attirés par la cathode. A pH 7, où l'hydrolysat fut traité, l'hème est légèrement chargé négativement à cause de ses groupements acides carboxyliques, mais migrait vers la cathode telle une molécule chargée positivement puisque que seule la membrane UF côté cathode était encrassée par l'hème. Ce comportement particulier serait dû à son affinité avec les peptides chargés positivement, essentiellement à cause d'interactions hydrophobes (Lebrun *et coll*., 1998).

En outre, comme la membrane d'UF témoin présente une charge négative, on peut s'attendre à un effet de répulsion de charges pour les peptides chargés négativement qui sont attirés vers l'anode. Cette hypothèse peut expliquer l'absence de peptides dans le compartiment KCl 1 comme montrées par les analyses BCA et C.L.H.P.-P.I.. Les variations dans les valeurs du potentiel d'écoulement des membranes d'UF montrent que les peptides ont effectivement migrés à travers les membranes, mais que le temps du traitement était trop court, ajouté à l'effet de répulsion, pour nous permettre de récupérer des peptides dans le compartiment KCl 1. Des études précédentes ont montré que l'extraction simultanée des peptides anioniques et cationiques était possible (Poulin *et coll*., 2006) mais que cette séparation était dépendante de la masse et de la nature des peptides présents dans la solution d'alimentation initiale.

4.3. Potentiel d'écoulement après désorption

Les potentiels d'écoulement des membranes d'UF étaient à nouveau mesurés après un traitement de désorption par EDUF. Ces résultats sont présentés dans la figure 47.

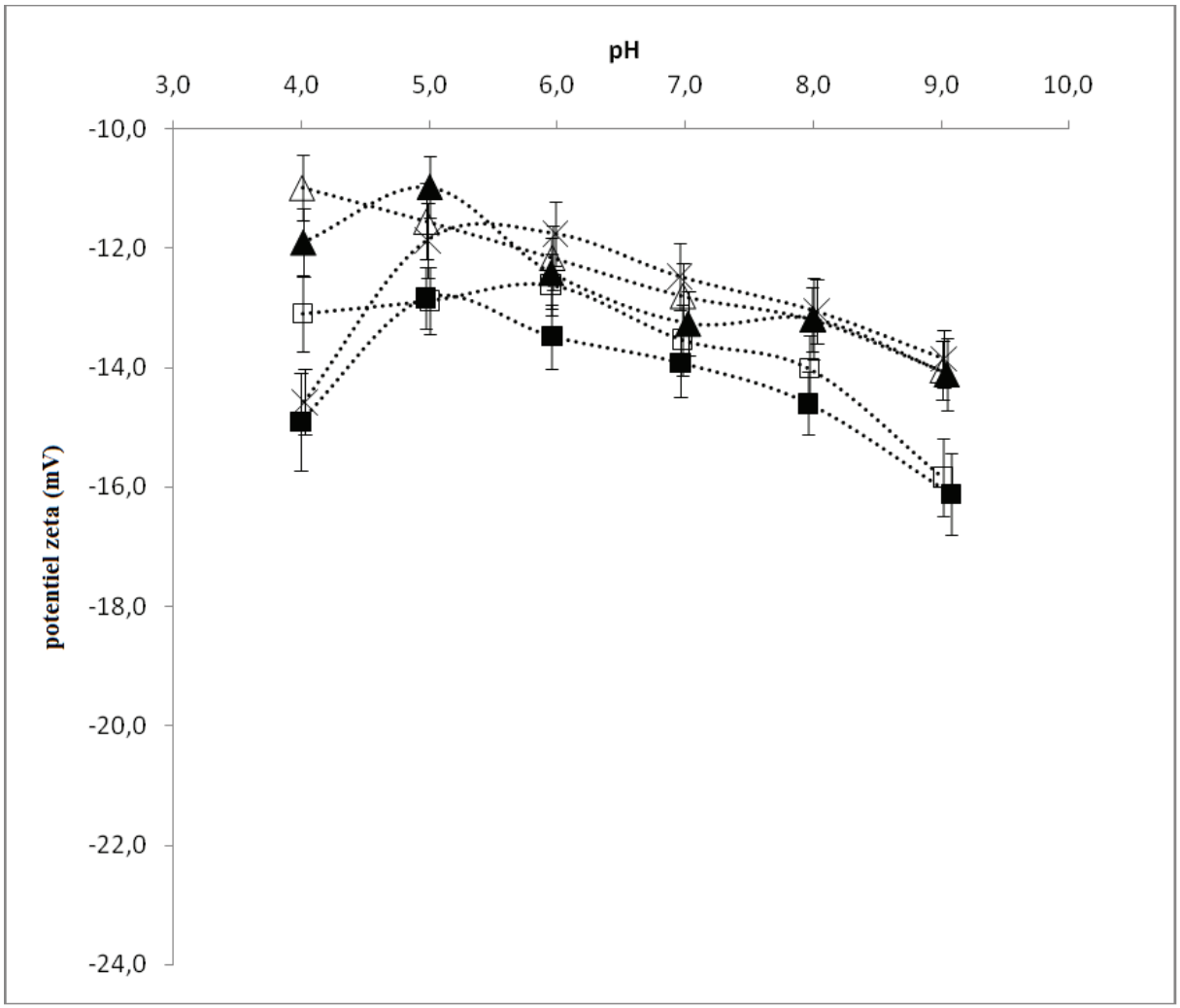


Figure 47. Evolution du potentiel d'écoulement en fonction du pH pour les membranes d'ultrafiltration après désorption par EDUF : la membrane témoin (×), les membranes coté cathode pour les hydrolysats brut (Δ) et décoloré (▲), et les membranes coté anode pour les hydrolysats brut (□) et décoloré (■).

Toutes les membranes d'UF étaient globalement chargées de la même manière, avec un profil similaire à celui de la membrane témoin, pour des potentiels zeta compris entre -11 mV et -17 mV, sauf pour la membrane d'UF côté cathode pour l'hydrolysat brut, qui montre un accroissement constant depuis les pH élevés jusqu'aux pH les plus faibles. Ainsi, les peptides qui étaient conservés à l'intérieur des membranes après les traitements d'extraction étaient sortis des membranes après le traitement de désorption. Cette méthode de désorption est donc efficace pour nettoyer les membranes des peptides issus de l'hydrolysat d'hémoglobine bovine (D.H. 15%). Le comportement différent pour la membrane d'UF côté

cathode pour l'hydrolysat brut est probablement dû au fait que de l'hème est toujours observé à la surface de cette membrane. Ceci peut être dû à une plus grande affinité de l'hème pour la membrane, et ainsi donné lieu à une absorption définitive, ou à un encrassement de surface des agrégats hème-peptides qui ont un poids moléculaire trop important pour pouvoir traverser la membrane dans notre configuration. Dans le cas de cette dernière hypothèse, un protocole de désorption avec une orientation inversée de la membrane pourrait être efficace.

4.4. La migration peptidique au cours de la désorption

Les analyses par BCA et C.L.H.P.-P.I. ont été effectuées sur les solutions de récupération de KCl après chaque traitement de désorption. Ces solutions furent lyophilisées pour les concentrer. Des peptides furent détectés par BCA et C.L.H.P.-P.I. dans les solutions de récupération, mais les quantités extraites durant ces traitements étaient trop faibles pour être exploités.

Conclusion

L'application du procédé innovant qu'est l'EDUF à notre hydrolysat modèle d'hémoglobine bovine nous a permis d'isoler une fraction peptidique cationique contenant des peptides aux propriétés antimicrobiennes.

Le premier critère de sélection était donc la charge des peptides. D'autant plus quand un phénomène de répulsion de charges fut constaté à l'interface avec la membrane d'UF chargée négativement pour les peptides anioniques. Le poids moléculaire des peptides influait également car les plus gros peptides, ainsi que des agrégats par associations hydrophobes formés avec l'hème, ne purent franchir les membranes d'un seuil de coupure de 20 kDa.

De meilleures vitesses de transfert furent observées en absence d'hème. L'étude du comportement en encrassement des membranes permit de constater qu'une population peptidique associée à l'hème restait adsorbée à sa surface, mais que la majorité des peptides était en transfert ou pouvait être désorbée.

M. Vanhoute, L. Firdaous, L. Bazinet, R. Froidevaux, D. Lecouturier, D. Guillochon and P. Dhulster, Effect of haem on the fractionation of bovine haemoglobin peptic hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Journal of Membrane Science 365 (1-2)*, 2010, 16-24

Journal of Membrane Science 365 (2010) 16–24

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Membrane Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/memsci

Effect of haem on the fractionation of bovine haemoglobin peptic hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes

M. Vanhoute[a,b], L. Firdaous[a,b], L. Bazinet[b,*], R. Froidevaux[a], D. Lecouturier[a], D. Guillochon[a], P. Dhulster[a]

[a] ProBioGEM, Polytech'Lille, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX, France
[b] Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Centre de Recherche en Science et Technologies du Lait (STELA), Département des sciences des aliments et de nutrition, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 May 2010
Received in revised form 30 July 2010
Accepted 2 August 2010
Available online 7 August 2010

Keywords:
Electrodialysis
Ultrafiltration
Peptides
Extraction
Fouling

ABSTRACT

The objective of this work was to fractionate a bovine haemoglobin peptic hydrolysate mixture by electrodialysis with ultrafiltration membranes (EDUF) to increase the value of slaughterhouse by-products such as blood protein. A raw hydrolysate and a discolored hydrolysate (from which the haem was previously removed by ultrafiltration) were treated by EDUF. EDUF appeared to be a very selective separation method and due to the nature and concentration of peptides present in the hydrolysates, migration of cationic peptides was favoured. However, the migration rates were higher for the discolored hydrolysate, with a peptide migration quite doubled in comparison with the raw hydrolysate: the raw hydrolysate contains haem, which severely decreased the peptide migration by fouling the membrane. This demonstrated that pre-treatment of the hydrolysate by ultrafiltration to remove molecules with high molecular weights, could be a good alternative to preserve EDUF permselectivity all along the treatment and during consecutive runs.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bovine blood is a by-product of the meat industry produced during slaughter. For economic and environmental reasons, it is necessary to find new ways to obtain increased value of slaughterhouse by-products such as blood protein [1,2]. Enzymatic hydrolysis of proteins is widely used in the food industry to improve functional properties such as solubility, emulsification, gelation and taste, or to prepare extensively hydrolysed proteins for hypoallergenic infant diets and nutritional therapy [3,4]. In 1998, haem-ion enriched haemoglobin hydrolysates, which could be useful in a treatment of nutritional anemia, were produced from slaughterhouse by-products by Lebrun et al. [5]. This ultrafiltration process also allowed to decolorize globin hydrolysates for food industries. More recently, bovine haemoglobin has been described as a source of endogenous peptides demonstrating different bioactivities: opioid [6,7], antibacterial [8,9], coronaro-constrictory [10] and bradykinin-potentiating [7,11]. However these peptides have to be isolated to obtain purified fractions with higher bio-functionality [12].

For the isolation of active peptides from complex mixtures containing various hydrolyzed protein fractions of similar size, membrane filtration has too low selectivity whereas laborious chromatographic steps including pre-fractionation methods as gel filtration and reverse phase liquid chromatography are too expansive [13,14]. Electrodialysis is an electrochemical separation process by which ionic (electrically charged) species are transported from one solution to another by crossing one or more selective permeability membranes, under the influence of an electrical current [15]. Recently, electrofiltration, a process combining a pressure gradient and an electrical potential gradient as driving forces was used for separation of bioactive peptides [16]. A membrane filtration module was used to produce pressure gradient. However, pressure gradient leads to the accumulation of molecules on the nearby membrane surface and then modification of the membrane transport selectivity [17]. Bazinet et al. [18] used an ED cell in which ultrafiltration and ion-exchange membranes are stacked and the electrical field is the sole driving force to perform the simultaneous separation of negatively and positively charged peptides into different electrolyte compartments.

The aim of the present study was to evaluate the haem impact on the fractionation of peptidic hydrolysates from bovine

* Corresponding author at: Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Sciences des Aliments et Nutrition/Food and Nutrition Sciences, Pavillon Paul-Comtois, 2425 Rue de l'Agriculture, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6. Tel.: +1 418 656 2131x7445; fax: +1 418 656 3353.
E-mail address: laurent.bazinet@fsaa.ulaval.ca (L. Bazinet).

0376-7388/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.memsci.2010.08.003

haemoglobin using ultrafiltration membranes stacked in an electrodialysis cell (EDUF), during a batch recirculation process as used commonly in the industry for conventional electrodialysis. The objectives of the present paper were (1) to separate simultaneously acid and basic peptides by using a two UF and three compartments ED configuration, (2) to study the effect of haem on the fouling of UF membranes in the previous EDUF configurations and (3) to test the impact of a desorption treatment on UF membrane fouling.

2. Materials and methods

2.1. Materials

NaCl and KCl were obtained from Laboratoire MAT (Québec, QC, Canada). HCl and NaOH 1.0 M solutions were obtained from Fisher Scientific (Montréal, Canada).

2.2. Hydrolysate preparations

Bovine haemoglobin hydrolysis by pepsin was performed at 23 °C and maintained at pH 3 by addition of HCl 1 M. Haemoglobin solution (1%, w/v) was incubated with pig pepsin (E.C. 3.4.23.1; 3450 UAE/mg solid; E/S = 2.5%, w/w) for 10 h. The pepsin reaction was stopped by increasing the pH to 10 with 5 M NaOH. This first procedure was conducted for the production of the raw hydrolysate. To produce a discolored hydrolysate, the haem was removed by ultrafiltration [19].

2.3. Electrodialysis cells and configurations

2.3.1. Extraction cell

The electrodialysis cell used for the experiments was a MP type cell (effective area of 100 cm^2) (ElectroCell AB, Täby, Sweden) with one Neosepta CMX-SB cationic membrane (Tokuyama Soda Ltd., Tokyo, Japan), one Neosepta AMX-SB anionic membrane (Tokuyama Soda Ltd., Tokyo, Japan) and two cellulose ester ultrafiltration membranes with MWCO of 20 kDa (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA). The configuration of the cell, presented in Fig. 1, defined four closed loops. Each closed loop was connected to a separate external reservoir to allow continual recirculation of the solutions. The solutions were circulated using four centrifugal pumps and the flow rates were controlled using flowmeters. The anode, a dimensionally stable electrode (DSA), and the cathode, a 316 stainless steel electrode, were supplied with the MP type cell. The anode/cathode voltage difference was supplied by a variable 0–100 V power source. The system was not equipped to maintain constant the temperature of the solutions.

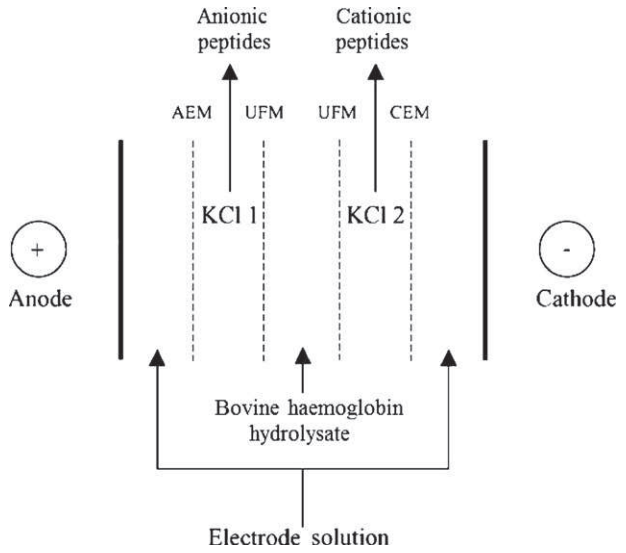


Fig. 1. Configuration of the electrodialysis module using two ultrafiltration membranes for the simultaneous electroseparation of cationic and anionic peptides from bovine hemoglobin hydrolysate (DH 15%). UFM, ultrafiltration membrane; AEM, anion-exchange membrane; CEM, cation-exchange membrane.

2.3.2. Desorption cell

A MicroFlow type electrodialysis cell (ElectroCell AB, Täby, Sweden) with an effective area of 10 cm^2 was used. The configurations of the cell, presented in Fig. 2, define three closed compartments. Each compartment was connected to a separate external reservoir to allow recirculation of the solution. The solutions were circulated using three centrifugal pumps and the flow rates in each compartment were controlled by flow meters. The anode was an oxygen dimensionally stable electrode (DSA) and the cathode was a 316 stainless steel electrode. For all experiments, the anode/cathode voltage difference was supplied by a variable 0–30 V power source (HPD 30-10SX, Xantrex, Burnaby, BC, Canada).

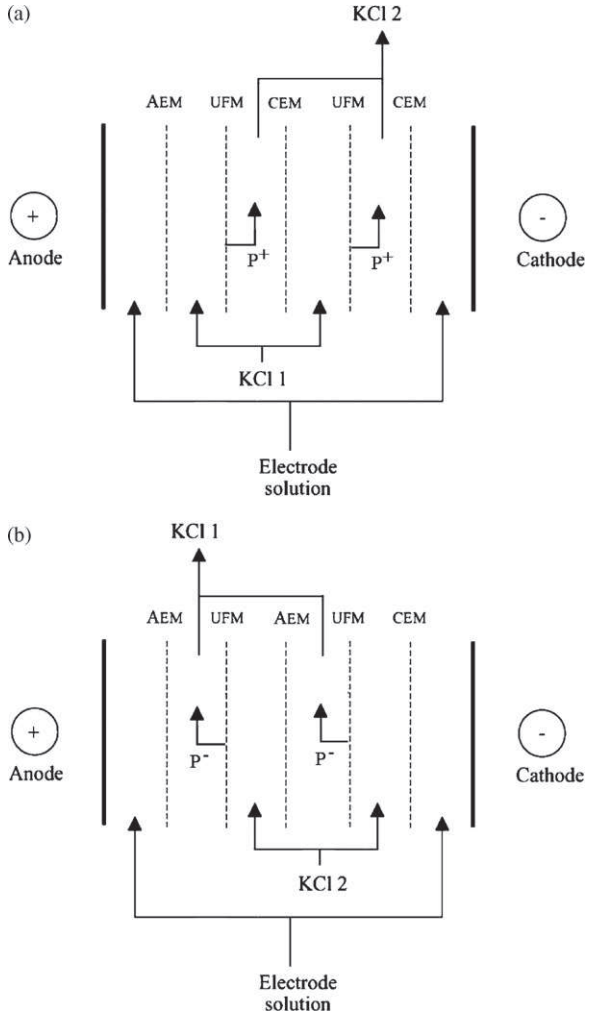


Fig. 2. Configurations of the electrodialysis module for the electrodesorption of cationic (a) and anionic (b) peptides from the ultrafiltration membranes used previously during bovine hemoglobin hydrolysate (DH 15%) EDUF extraction runs. UFM, ultrafiltration membrane; AEM, anion-exchange membrane, CEM, cation-exchange membrane.

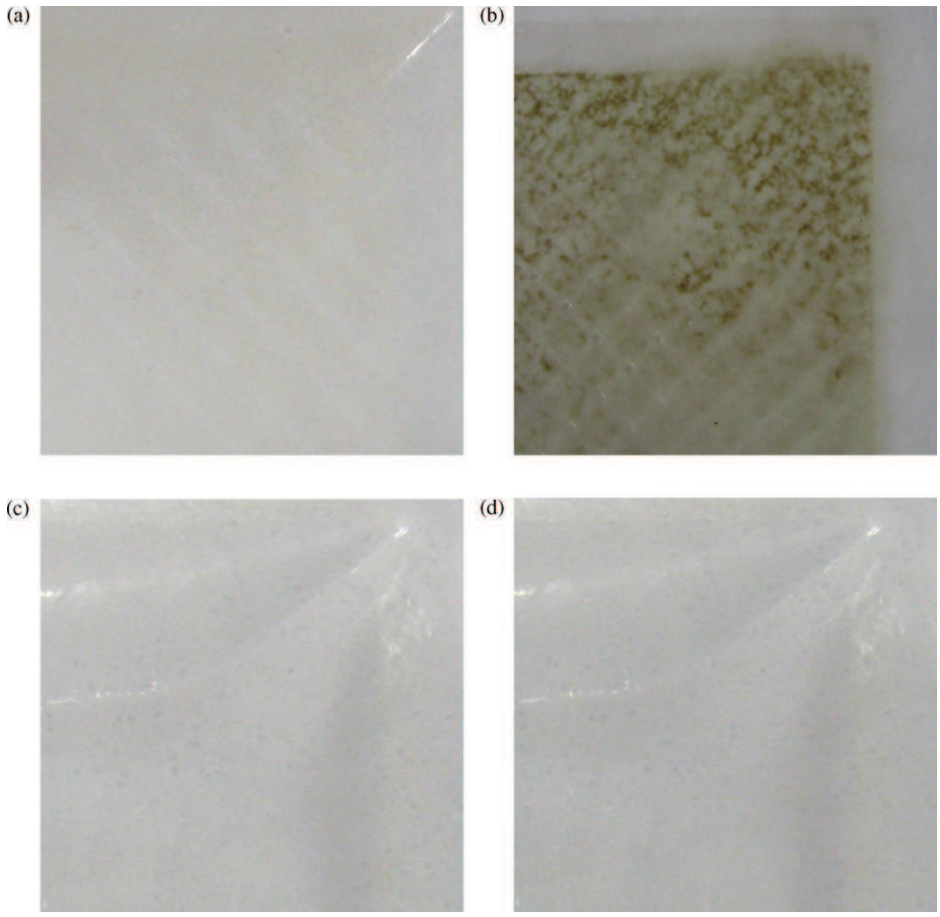


Fig. 3. Photographs of the UF membranes after the third extraction run for the raw hydrolysate towards the anode (a) and the cathode (b) and for the discolored hydrolysate towards the anode (c) and the cathode (d).

2.4. Experimental protocols

2.4.1. Extraction protocol

In this experiment, the special cell configuration of electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) developed by Poulin et al. [20] was used in order to separate simultaneously acid and basic peptides from the feed solution. Electroseparation was performed using a constant 8 V anode/cathode voltage difference. The duration of the treatment was 2 h. The electrode, permeate (KCl1 towards the anode and KCl2 towards the cathode) and feed compartments contained, respectively, a 20 g/L NaCl aqueous solution (5 L), a 2 g/L KCl aqueous solution (2.5 L) and a 0.5% (w/v) bovine haemoglobin hydrolysate aqueous solution (2.5 L). The flow rates of the permeate and feed solutions were 2 L/min while the flow rate of the electrode solution was 5 L/min. The pH was kept constant at 7 in each compartment by addition of HCl or NaOH solutions (0.01 M) to have in solution during the whole process the presence of both positively and negatively charged peptides. Three repetitions were carried-out with the same membranes for the raw hydrolysate and a set of new membranes was used for the three treatments performed with the discolored hydrolysate. Ten-milliliter samples of the hydrolysate and KCl solutions were taken before applying voltage and every half an hour during the treatment. The molecular profile of permeate and feed solutions samples was determined by RP-HPLC. The protein content of the permeate samples was also determined with a BCA protein assay kit. The voltage and the intensity were recorded at the beginning of each run while conductivity and pH of the permeate and feed solutions were recorded throughout the process. After each 3 extractions treatment, two pieces (30 mm × 35 mm) of each ultrafiltration membrane were cut to determine the streaming potential of membranes. Pictures of each ultrafiltration membrane were taken after final experiments.

2.4.2. Desorption protocol

The desorption cell was configured on the same basis as the extraction cell one, allowing the peptides to continue their migra-

Table 1
Average conductivities of the different compartments at the beginning and the end of the EDUF runs.

	Initial conductivity (μS/cm)	Final conductivity (μS/cm)	% mineralisation	Slope (μS/cm min)	R^2
KCl2 (raw hydrolysate)	3343 ± 74	3219 ± 71	−3.71	−1.059	0.8593
KCl1 (raw hydrolysate)	3183 ± 139	2712 ± 191	−14.80	−4.076	0.9596
NaCl (raw hydrolysate)	31494 ± 473	33362 ± 433	5.93	6.633	0.9361
Raw hydrolysate	1504 ± 4	1372 ± 40	−8.78	−1.315	0.7430
KCl2 (discolored hydrolysate)	3304 ± 72	2672 ± 12	−19.13	−5.267	0.9987
KCl1 (discolored hydrolysate)	3185 ± 53	2755 ± 61	−13.50	−3.594	0.9956
NaCl (discolored hydrolysate)	31478 ± 1103	32340 ± 1036	2.74	15.11	0.9770
Discolored hydrolysate	1902 ± 65	2307 ± 36	21.29	3.233	0.9870

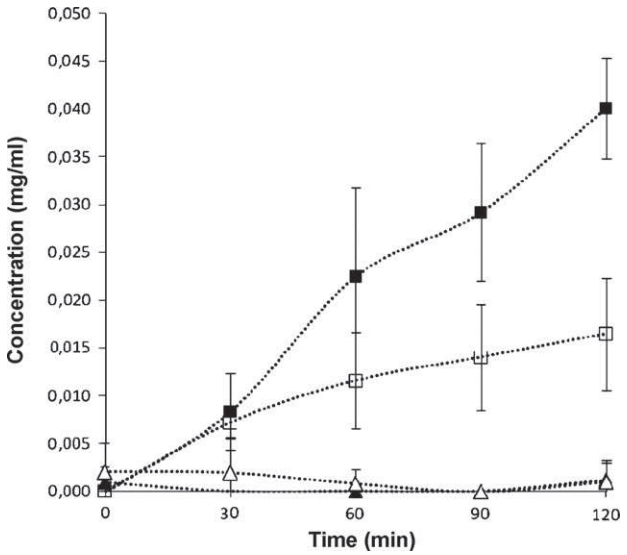


Fig. 4. Evolution of the peptide concentration as a function of time during electrodialysis in the KCl1 solutions for the raw hydrolysate (△) and the discolored hydrolysate (▲), and in the KCl2 solutions for the raw hydrolysate (□) and the discolored hydrolysate (■).

tion in the same way through the UF membrane. For the desorption, two other pieces (30 mm × 35 mm) of the 100 cm^2 UF membrane used previously for the peptide extraction were cut and stacked in the small ED cell (effective area = 10 cm^2). Electrodesorption was performed, as previously for extraction, using a constant 8 V anode/cathode voltage difference. One 30-min. desorption run was performed for each two pieces of the same UF membrane. The first compartment was for NaCl aqueous solution (20 g/L, 150 mL) as electrode rinse solution. The second and the third one were for KCl aqueous solutions (2 g/L, 150 mL). The flow rates of the permeate solutions were 100 mL/min while the flow rate of the electrode solution was 200 mL/min. The pH was kept constant at 7 in each compartment by addition of HCl or NaOH solutions (0.01 M). BCA and RP-HPLC were performed on the final solutions while the UF membrane streaming potential was measured at the end of the treatments.

2.5. Analysis

2.5.1. pH

A pH-meter model SP20 (Thermo Orion, West Chester, PA, USA) was used with a VWR Symphony epoxy gel combination pH electrode (Montréal, Canada).

2.5.2. Conductivity

A YSI conductivity meter, Model 3100, was used with a YSI immersion probe model 3252, cell constant $K = 1\ cm^{-1}$ (Yellow Springs Instrument Co., Yellowsprings, OH, USA).

2.5.3. Total protein determination

The protein concentration was determined using BCA protein assay reagents (Pierce, Rockford, IL, USA). Assays were conducted on microplates by mixing 25 μL of the sample with 200 μL of the working reagent and incubating at 37 °C for 30 min. The microplate was then cooled to room temperature for 15 min and the absorbance was read at 562 nm on a microplate reader. Concentration was calculated (in μg/mL) with a calibration curve using the bovine haemoglobin hydrolysate as a standard. These calculated concentrations allowed to evaluate the peptide transport rates and extraction yields through the ultrafiltration membranes.

2.5.4. RP-HPLC analysis

HPLC apparatus consisted of a Waters 600E (Waters Corporation, Saint-Quentin, France) automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 17 automatic sampling device (Waters Corporation, Saint-Quentin, France) and a Waters 996 photodiode array detector (Waters Corporation, Saint-Quentin, France). Spectral and chromatographic data were stored on a NEC Image 466 computer (TSB Computer, Lille, France). Millennium software (Millenium 4.00, 2001, Waters Corporation) was used to plot, acquire and analyze chromatographic data. All the chromatographic analyses were performed with a Vydac C4 column (250 mm × 4.6 mm internal diameter) (Hesperia, CA, USA). The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (1000:1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (600:400:1 v/v/v) as eluent B. The flowrate was 1 mL/min. The gradient applied was 0–67% (v/v) B over 30 min then 67–87% (v/v) B over 35 min. Chromatograms were performed at 215 nm for analysis.

2.5.5. Coupling of RP-HPLC and ESI-MS

All mass spectrometry measurements of hydrolysates were carried-out in the positive ion mode on a Quattro II triple quadrupole instrument (Micromass, Altrincham, UK) equipped with an electrospray ion source. Experimental procedure of peptidic hydrolysates coupled RP-HPLC–MS was performed according to Froidevaux et al. [21].

2.5.6. Streaming potential

Streaming potential measurements were carried out as described by Firdaous et al. [22]. The cell dedicated to the measure of the streaming potential was constituted by two plates in plexiglas, the bottom containing two platinum electrodes. Two samples of the same membrane (the active layers are face to face) separated by a channel in teflon were placed between these two electrodes. Two manometers were placed at the inlet and outlet of the cell allowing a visual reading of the applied pressures. The solutions were circulated by centrifugal pumps (Baldor Electric Co., Fort Smith, ARK, USA). The measures were performed with solutions of KCl 10^{-3} M in a pH range between 4 and 9 and at a pressure range between 0.60 bar and 1.80 bar with an increment of 0.2 bar. For all the experiments, the temperature was maintained constant at 25 °C. Each experiment was repeated three times.

3. Results and discussion

3.1. Electrodialysis parameters: conductivity and system resistance

3.1.1. Conductivity

Conductivity of feed and permeate solutions was monitored over the duration of the process (data not shown). The conductivity of solutions decreased linearly for all compartments except for the NaCl compartments and the discolored hydrolysate compartment which increased linearly according to Table 1.

Demineralization of the permeate solutions is in accordance with the cell configuration: the K^+ and the Cl^- ions migrate from the KCl to the NaCl electrolyte solution and the hydrolysate solutions, respectively. On the other hand, the conductivity of the discolored hydrolysate behaved in the opposite way of the permeate solutions. This could be due to the migration of K^+ and Cl^- ions, respectively from the KCl1 and KCl2 solutions, to the hydrolysate solution. These ions would migrate towards their respective electrode (K^+ towards the cathode and Cl^- towards the anode) to the hydrolysate solution and then increasing its conductivity. However the same phenomena should be observed with the raw hydrolysate but its conductivity decrease lightly. This may be due to a fouling observed only on the UF membrane of the KCl2 compartment with

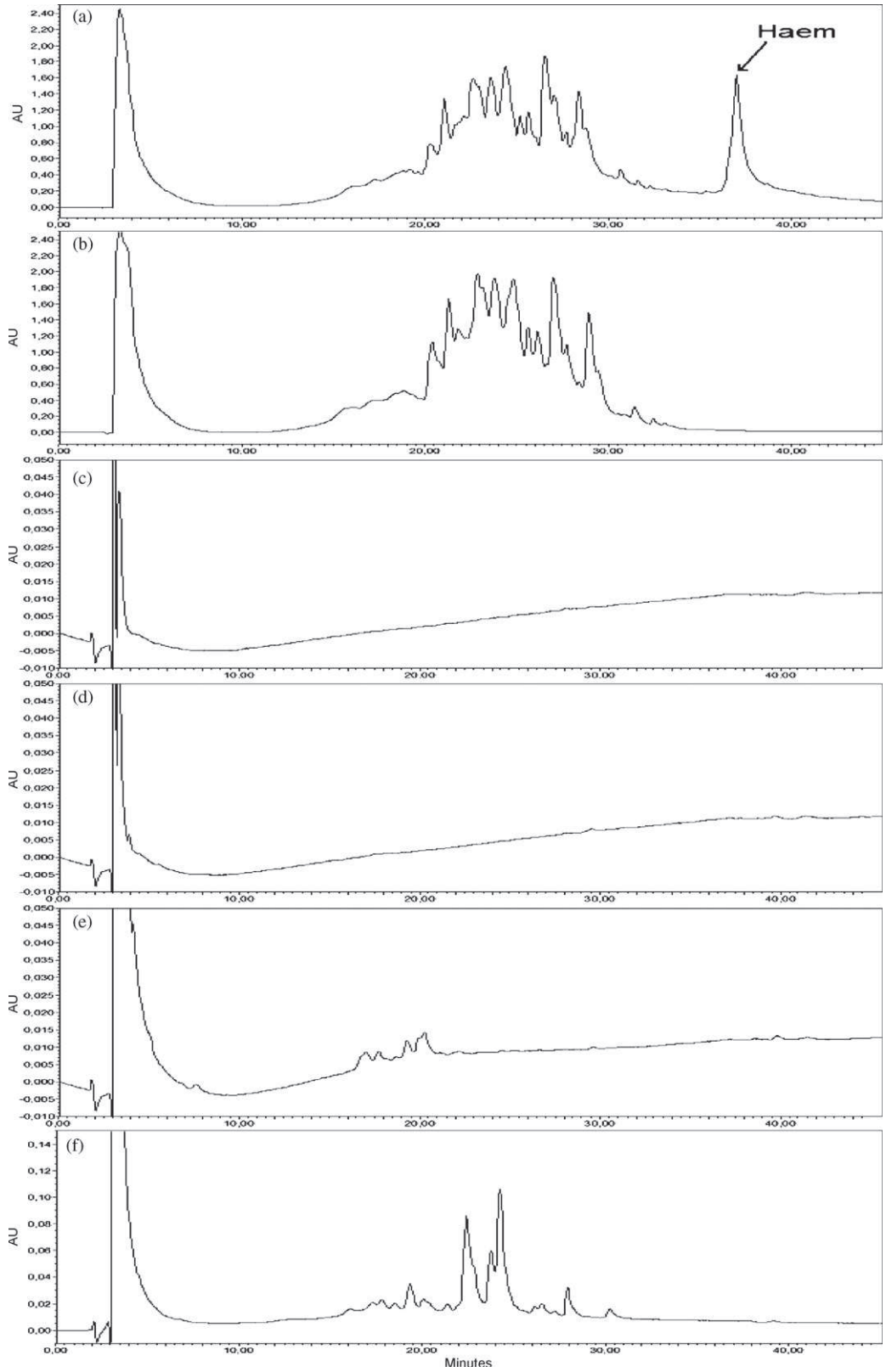


Fig. 5. RP-HPLC profiles of raw hydrolysate (a), discolored hydrolysates (b), KCl1 solution for raw (c) and discolored (d) hydrolysates and KCl2 solution for raw (e) and discolored (f) hydrolysates after 2 h-EDUF treatment.

the raw hydrolysate (pictures shown in Fig. 3) which could decrease the ion migration or due to haem–peptides association, as shown by Lebrun et al. [5], haem charges being able to screen peptide charges. These results, except for the raw hydrolysate compartment, are in accordance with those of Poulin et al. [20].

3.1.2. Apparent system resistance

The overall apparent system resistance was evaluated according to Ohm's law at the beginning of each run. For the raw hydrolysate, the system resistance increased from 22.86 Ω at the beginning of the first run to 29.74 Ω at the beginning of the third one, which

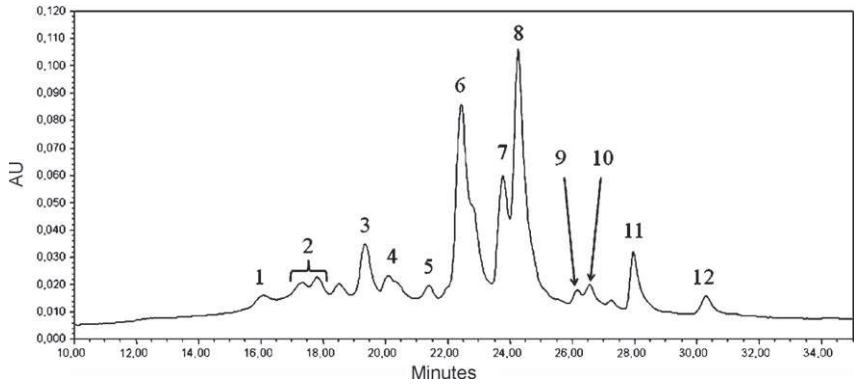


Fig. 6. RP-HPLC profile of KCl2 compartment solution from discolored hydrolysate after 2 h-EDUF treatment analysed by ESI-MS.

corresponds to a resistance increase of 30%, while for the discolored hydrolysate it was quite constant, from 31.88 Ω for the first run to 32.08 Ω at the beginning of the third one. The resistance of the raw hydrolysate increased as a function of extraction runs due to the presence of haem which would be able to foul the ultrafiltration membrane. The membrane fouling would probably be caused by haem–peptide or peptide–peptide aggregate formation as demonstrated by Lebrun et al. [5]. The discoloration treatment by ultrafiltration which discards the haem, would reduce the risk of membrane fouling during EDUF. This result confirmed the previous observations shown on photographs (Fig. 3).

3.2. Peptidic migration during extraction

3.2.1. Total peptidic migration

The migration of peptides from the bovine haemoglobin hydrolysates to KCl1 (towards the anode for peptides negatively charged) and KCl2 (towards the cathode for peptides positively charged) compartments is shown in Fig. 4. Due to the solution pH value of 7, a simultaneous migration of cationic and anionic peptides was expected. However peptides migrated only into the KCl2 compartment and were absent from the KCl1 compartment whatever the hydrolysate. The curves show a linear migration into the KCl2 compartment for the discolored hydrolysate ($R^2 > 0.991$, slope: 3.374×10^{-4} mg/mL min) and for the raw hydrolysate ($R^2 > 0.940$, slope: 1.325×10^{-4} mg/mL min). The final concentrations in the KCl2 compartment after the 2 h extraction were 0.016 mg/mL (extraction yield of 0.43%) and 0.040 mg/mL (extraction yield of 1.19%), respectively, for the raw hydrolysate and discolored hydrolysates. The transport rates into the KCl2 compartments were 5.061 g h^{-1} m^{-2} and 1.988 g h^{-1} m^{-2}, respectively for the discolored hydrolysate and the raw hydrolysate. This difference can be explained by the fouling observed with the raw hydrolysate, which probably slowed down the peptides extraction. The transport rate in the case of the discolored hydrolysate is in accordance with the transport rate ranges observed in previous studies [20,23–25]. The absence of extraction in the KCl1 compartment could be the result of a too long migration time of peptides due to the high ratio mass over charge or of interactions of anionic peptides with the membrane as previously observed by Lapointe et al. [17] on a β-lactoglobulin hydrolysate during its separation by nanofiltration, a pressure-driven filtration technology.

3.2.2. Chromatographic profiles

Chromatograms of peptidic hydrolysates and extracted fractions from KCl1 and KCl2 compartments are shown in Fig. 5. The first major peak observed at 3 min corresponded to the column dead volume where salts are expulsed. Haem was effectively removed from the initial profile of the discolored hydrolysate. Furthermore, the absence of peptides was observed in KCl1 compartment and the presence of peptides in KCl2 compartments.

It appeared from the comparison of raw and discolored hydrolysate KCl2 compartments that the peak intensities were lower for raw hydrolysate confirming previous results obtained by BCA analysis. Furthermore the population of peptides migrated in KCl2 compartment would be different for both hydrolysate. The difference in the peptide population extracted from the raw hydrolysate and the discolored hydrolysate could be explained by the presence or absence of haem: in fact, in the raw hydrolysate, haem would have aggregated with more hydrophobic peptides (with a higher retention time in RP-HPLC) to be kept in solution [5], consequently decreasing their ability to migrate in our system by increasing their global molecular weight and hiding some charges. But haem is also slightly negatively charged due to two carboxyl acid groups and so it is generally associated to peptides mainly positively charged, themselves attracted by the cathode. This con-

Table 2
Corresponding table of ESI-MS analysed peptides from KCl2 compartment solution from discolored hydrolysate after 2 h-EDUF treatment.

Peak number	MW (Da)	Peptidic sequence	Amino acid sequence	Charge at pH 7
1	1803	α(47–65)	DLSHGSAQVKGHGAKVAAA	+1.18
2	706	β(7–13)	KAAVTAF	+0.99
2	2051	β(51–69)	DAVMDDPKVKAHGKKVLDS	+0.09
3	1285	α(87–97)	HAHKLRVDPVN	+1.18
4	2235	α(1–23)	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAE	+1.09
4	1305	β(91–101)	HCDKLHVDPEN	−1.88
5	1432	α(87–98)	HAHKLRVDPVNF	+1.18
6	909	α(99–106)	KLLSHSLL	+1.08
7	1378	β(113–124) or β(114–125)	LARNFGKFFTPV or ARNFGKFFTPVL	+2.00
8	1238	α(36–45) or α(37–46)	FPTTKTYFPH or PTTKTYFPHF	+1.08
9	1806	α(66–82) or α(67–83)	LTKAVEHLDDLPGALSE or TKAVEHLDDLPGALSEL	−2.91
10	1585	α(33–45) or α(34–46)	FLSFPTTKTYFPH or LSFPTTKTYFPHF	+1.09
11	?			
12	?			

firms our previous results about fouling due to haem–peptides or peptide–peptide aggregates on the UF membrane on the cathode side leading to a lower migration of peptides.

3.2.3. HPLC–MS results

KCl2 compartment solutions for the raw and the discolored hydrolysates were analysed in ESI-MS. KCl1 compartment solutions were not analysed because BCA and HPLC analyses showed no peptide extraction. Peptides present in KCL2 fractions had retention times between 10 min and 35 min on the RP-HPLC profiles, as shown in Fig. 6 for the discolored hydrolysate. Table 2 presents the ESI-MS results and the charge of identified peptides at pH 7 only for the KCl2 discolored fraction. KCl2 solution for the raw hydrolysate had a too low concentration to be properly analysed by HPLC–MS, even after concentration by lyophilisation treatment: its peptide peak intensities still merging with the background noise. However, by comparison with the retention time of previous RP-HPLC chromatograms (Fig. 5), only peaks no. 1–5, according to Table 2, were extracted in the KCl2 solution for the raw hydrolysate. Peaks 11 and 12 merged with the ESI-MS background noise and so were not identified. Identified peptides in both KCl2 solutions have molecular weights in the range 706 Da and 2973 Da.

Peptide sequences were identified from their molecular weights according to Froidevaux et al. [21]. According to their amino acid sequences, peptides which are extracted in KCl2 compartment included, at the extraction pH of 7, both positively and negatively charged amino acid. However their global charge was positive except for two of them. The extraction was in accordance with the cell configuration: mainly positively charged peptides were attracted by the cathode. Among these extracted peptides, α(1–23), α(36–45) and α(33–45) were already identified as peptides with antibacterial activity [8,9]. The negatively charged peptides could have been extracted in the KCl2 solution thanks to peptide–peptide association. Other referenced peptides were expected to be extracted in the KCl2 solutions such as, for example, the α(33–66) or the β(32–40) fragments of hydrolysed bovine hemoglobin (DH 15%) [21] since they were also mainly positively charged. However this peptide population had high molecular weights (3632 Da for α(33–66)) or were highly hydrophobic (1661 cal/mol for β(32–40) according to the Bigelow scale [26]). This tends to confirm the haem–peptide and peptide–peptide aggregates presence which could not pass through the UF membranes.

3.3. Fouling evaluation

3.3.1. Streaming potential after extraction

The streaming potential analysis allowed to measure the charge of each ultrafiltration membrane, to evaluate the impact of peptides, themselves charged, on it. The streaming potentials of ultrafiltration membranes after the EDUF extraction runs are shown in Fig. 7. The control non-treated membrane showed a negative global charge from pH 4 to 9, with zeta potential values ranging between −15 mV and −11 mV. The UF membranes after treatment of the discolored hydrolysate were charged almost the same way whatever their position (cathode or anode). This confirms that the fouling was low or absent. The UF membranes on the anode side for both hydrolysates have the same general zeta potential profile than a control membrane, with zeta potential decreasing at pH 4. However, higher variations in the UF membrane charges were observed for the raw hydrolysate with a difference up to 10 mV for the anode UF membrane at pH 4, demonstrating a more important fouling of this specific UF membrane. The UF membrane used on the cathode side for the separation of the discolored hydrolysate presented zeta potential values quite stable on the whole range of pH with zeta potential values between −13 mV and −15 mV,

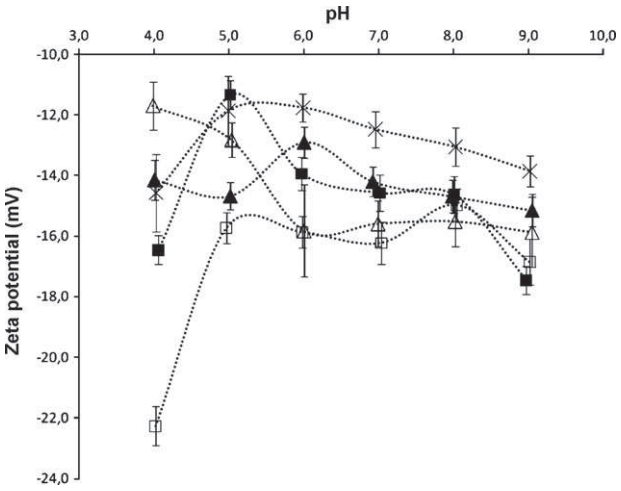


Fig. 7. Evolution of the streaming potential as a function of pH for ultrafiltration membranes after 3 EDUF runs with bovine haemoglobin hydrolysates (DH 15%): control membrane (×), UF membranes orientated towards the cathode (for the raw (△) and the discolored (▲) hydrolysates) and membranes orientated towards the anode (for the raw (□) and the discolored (■) hydrolysates).

showing no decrease or increase at pH 4. This profile was characteristic of an intermediary behaviour where the UF membrane would be slightly fouled. In the contrary, the UF membrane on the cathode side for the raw hydrolysate showed an increase in its zeta potential values from pH 6 to 4. This difference of profile for the UF membrane used on the cathode side during the treatment of the raw hydrolysate would be due to the presence of haem on the membrane surface. At higher pH, the carboxyl acid groups of haem are negatively charged and when the pH decreased, the carboxylic functions become neutral. Haem–peptide aggregates lose some negative charges and since they are fouled on the membrane, the global charge of the membrane increased.

In a global way, all the UF membranes had a lower or quite similar zeta potential in comparison with the control non-treated membrane, and the values of zeta potential were also correlated with the position of the UF membrane in the cell stack. The UF membranes on the anode side were fouled by the peptides mainly negatively charged attracted by the anode: an increase in negative charges led to a lower zeta potential. On the other hand, the UF membranes on the cathode side were fouled by the haem–peptides aggregates or by mainly positively charged peptides (when haem was discarded) which are attracted by the cathode. At pH 7.0, pH of the working hydrolysate, haem is slightly negatively charged due to its carboxylic functions, but was demonstrated to migrate towards the cathode as a positively charged molecule since only the UF membrane on the cathode side was fouled by the haem. This special behaviour would be due to its affinity with other positively peptides essentially by the way of hydrophobic interactions [5].

Furthermore, as the control ultrafiltration membrane showed a negative charge, one could expect charge repulsion for negatively charged peptides attracted towards the anode. This assumption could explain the absence of peptides in the KCl1 compartment as shown by the BCA results and chromatographic profiles. Variations in the streaming potential values of the ultrafiltration membrane showed that peptides migrated effectively to the membrane but the extraction run duration was probably too short, adding to the charge repulsion effect, to allow us to recover peptides in the KCl1 compartment. Previous studies showed that simultaneous extraction was possible [20] but this simultaneous separation is the function of the nature and mass of the peptides present in the feed solution. To increase the quantity of negatively charged pep-

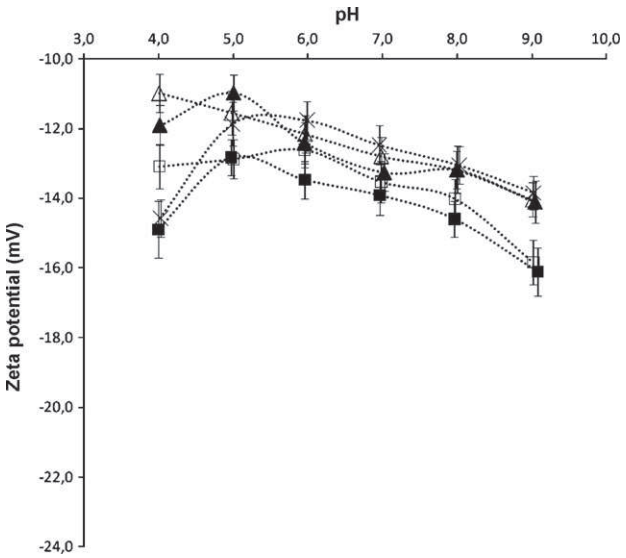


Fig. 8. Evolution of the streaming potential as a function of pH for ultrafiltration membranes after desorption: control membrane (×), membranes orientated towards the cathode (for the raw (Δ) and the discolored (▲) hydrolysates) and membranes orientated towards the anode (for the raw (□) and the discolored (■) hydrolysates).

tides, four main ways are possible, (1) to increase the extraction run duration, (2) to increase the electric field strength, (3) to change the charge of the ultrafiltration membrane to limit the charge repulsion effect or (4) a combination of all these parameters.

3.3.2. Streaming potential after desorption

The streaming potentials of UF membranes were measured again after an EDUF desorption run (Fig. 8). All UF membranes were globally charged the same way, following the control membrane's curve with zeta potentials ranging between −11 mV and −17 mV except for the raw hydrolysate's UF membrane on the cathode side which kept a constant increase from high to low pH. Thus peptides which were kept inside the membrane after their extraction runs were out after the desorption run. This desorption method is efficient to clean the UF membranes from the bovine haemoglobin hydrolysate peptides. The different behaviour of the raw hydrolysate's UF membrane on the cathode side is probably due to the fact that haem is still observed (pictures not shown) on it. This may be due to either a better affinity of haem for the membrane and so leading to a definitive adsorption or a surface fouling by the haem–peptides aggregates which have a too high molecular weight to go through the UF membranes in our configuration. In this last case, a desorption protocol with a reverse orientation of the UF membrane could be effective.

3.3.3. Peptide migration during desorption

BCA and HPLC analysis was performed on KCl1 and KCl2 recovering solutions after each desorption run. KCl solutions were lyophilized in order to concentrate them. Peptides were detected with BCA and HPLC analysis in the recovering KCl solutions but extracted quantities of peptides during the desorption runs were too low to be properly used and to identify possible peptide aggregation.

4. Conclusion

Although the process was not optimized, EDUF appeared as a very selective method of separation for peptides present in bovine haemoglobin peptic hydrolysates since only few of them were extracted in the KCl compartments. However the separation was not simultaneous as expected: mainly positively charged peptides were recovered in the KCl2 solutions whereas mainly negatively charged peptides were still in migration in the ultrafiltration membrane on the anode side. Haem had a high influence on the peptide migration towards the KCl2 compartment. Indeed, a low migration rate with the raw hydrolysate due to a fouling on the UF membrane on the cathode side was obtained while a migration rate twice higher was allowed with the discolored hydrolysate. According to the streaming potential measurements, it appeared that the integrity of the UF membrane was kept and that EDUF would minimize the fouling of UF membrane. It was also demonstrated in this study that a pre-treatment of a hydrolysate, by the way of a coupling with pressure-driven conventional filtration technology to remove certain molecule with high molecular weights, could be a good alternative to preserve EDUF permselectivity all along the treatment and during consecutive runs.

Acknowledgements

The authors would wish to thank Ms. Monica Araya-Farias, research professional at Laval University, for her technical assistance. Authors would also like to thank the "61ème session de la commission permanente de coopération franco-québécoise (CPCFQ), projet de coopération de recherche scientifique et technologique" for the financial assistance.

References

[1] C.-K. Hyun, H.-K. Shin, Utilization of bovine blood plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics, J. Ferment. Bioeng. 86 (1998) 34–37.
[2] S. Darine, C. Vial, G. Djelveh, Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: influence of operating conditions on functional properties, Meat Sci. 79 (2008) 640–647.
[3] H. Meisel, E. Schlimme, Bioactive peptides derived from milk proteins-ingredients for functional foods, Kieler Milchw. Forsch. 48 (1996) 343–357.
[4] H. Meisel, Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications, Livest. Prod. Sci. 50 (1997) 125–138.
[5] F. Lebrun, A. Bazus, P. Dhulster, D. Guillochon, Influence of molecular interaction of bovine haemoglobin hydrolysate with an organic membrane, J. Membr. Sci. 146 (1998) 113–124.
[6] V. Brantl, C. Gramsch, F. Lottspeich, R. Mertz, K.H. Jaeger, A. Herz, Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins, Eur. J. Pharmacol. 125 (1986) 309–310.
[7] J.M. Piot, Q. Zhao, D. Guillochon, G. Ricart, D. Thomas, Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide from a bovine peptide haemoglobin hydrolysate, Biochem. Biophys. Res. Commun. 189 (1992) 101–110.
[8] R. Froidevaux, F. Krier, N. Nedjar-Arroume, D. Vercaigne-Marko, E. Kosciarz, C. Ruckebusch, P. Dhulster, D. Guillochon, Antibacterial activity of pepsin derived bovine hemoglobin fragment, FEBS Lett. 491 (2001) 159–163.
[9] N. Nedjar-Arroume, V. Dubois-Delval, E. Yaba Adje, J. Traisnel, F. Krier, P. Mary, M. Kouach, G. Briand, D. Guillochon, Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides, Peptides 29 (2008) 969–977.
[10] N. Barkhudaryan, J. Kellerman, A. Goloyan, F. Lottspeich, High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the beta-chain of haemoglobin, FEBS Lett. 329 (1993) 215–218.
[11] B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, Solvent effect on kinetics of appearance of haemorphins in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin, Biotechnol. Appl. Biochem. 29 (1999) 25–30.
[12] Y. Pouliot, M.C. Wijers, S.F. Gauthier, L. Nadeau, Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes, J. Membr. Sci. 158 (1999) 105–114.
[13] L. Bazinet, L. Firdaous, Membrane processes and devices for separation of bioactive peptides, Recent Pat. Biotechnol. 3 (2009) 61–72.
[14] G. Bargeman, J. Houwing, I. Recio, G.H. Koops, C. van den, Horst, Electromembrane filtration for the selective isolation of bioactive peptides from an as2-casein hydrolysate, Biotechnol. Bioeng. 80 (2000) 599–609.
[15] D. Gardais, Les procédés électriques de traitement des rejets industriels: électrodialyse, Environnement et Electricité, in: Electra Doppee Diffusion, Avon, France, 1990.
[16] J.F. Lapointe, C. Bouchard, S. Gauthier, Y. Pouliot, Selective separation of a cationic peptide from a tryptic hydrolysate of β-lactoglobulin by electrofiltration, Biotechnol. Bioeng. 94 (2005) 223–233.

[17] J.F. Lapointe, C. Bouchard, S. Gauthier, Y. Pouliot, Fouling of a nanofiltration membrane by a β-lactoglobulin tryptic hydrolysate: impact on the membrane sieving and electrostatic properties, J. Membr. Sci. 253 (2005) 89–102.
[18] L. Bazinet, J. Amiot, J.F. Poulin, A. Tremblay, D. Labbé, Process and system for separation of organic charged compounds, International Patent WO 2005/082495A1.
[19] P. Dhulster, R. Kapel, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume, A. Fertin-Bazus, L. Choisnard, D. Guillochon, Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction, Desalination 148 (2002) 221–226.
[20] J.F. Poulin, J. Amiot, L. Bazinet, Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electrodialysis with ultrafiltration membrane, J. Biotechnol. 123 (2006) 314–328.
[21] R. Froidevaux, B. Lignot, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, B. Coddeville, G. Ricart, Kinetics of appearance of hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by a direct coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry, J. Chromatogr. A 873 (2000) 185–194.
[22] L. Firdaous, P. Dhulster, J. Amiot, A. Doyen, F. Lutin, L.P. Vézina, L. Bazinet, Investigation of the large scale bioseparation of an antihypertensive peptide from alfalfa white protein hydrolysate by an electromembrane process, J. Membr. Sci. 355 (2010) 175–181.
[23] J.F. Poulin, J. Amiot, L. Bazinet, Improved peptide fractionation by electrodialysis with ultrafiltration membrane: influence of ultrafiltration membrane stacking and electrical field strength, J. Membr. Sci. 299 (2007) 83–90.
[24] J.F. Poulin, J. Amiot, L. Bazinet, Impact of feed solution flow rate on peptide fractionation by electrodialysis with ultrafiltration membrane, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 2007–2011.
[25] L. Firdaous, P. Dhulster, J. Amiot, A. Gaudreau, D. Lecouturier, R. Kapel, F. Lutin, L.P. Vézina, L. Bazinet, Concentration and selective separation of bioactive peptides from alfalfa white protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes, J. Membr. Sci. 329 (2009) 60–67.
[26] C.C. Bigelow, On the average hydrophobicity of proteins and their relation between it and protein structure, J. Theor. Biol. 16 (1967) 187–211.

Chapitre IV
Conclusion et perspectives

Conclusion

Chacun des trois procédés innovants étudiés a permis d'extraire sélectivement des peptides ou une fraction peptidique dont les propriétés physico-chimiques correspondait spécifiquement aux paramètres de celui-ci.

Les peptides opioïdes LVV-hémorphine-7 et VV-hémorphine-7 ont été extraits dans un système biphasique eau/solvant organique à l'aide d'agents formateurs de paires d'ions de la famille des alkyl-sulfonates. Les solvants organiques octan-1-ol et dichlorométhane étudiés ont permis de mettre en évidence qu'une plus forte polarité favorisait l'extraction de nos peptides cibles. L'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée de l'agent surfactant, et donc de l'hydrophobie de l'association peptide-agent, permit d'accroitre davantage le rendement d'extraction. Ces rendements d'extraction favorisés aux pH acides l'étaient cependant au détriment des ratios d'enrichissement des hémorphines car une grande partie de la population peptidique était extraite simultanément. Ces travaux permirent de multiplier par 40 les coefficients de partage des hémorphines. L'ajout d'un contacteur à membrane pour supporter l'interface biphasique a permis d'augmenter l'échelle du procédé et d'apporter une sélectivité supplémentaire par la nature de son matériau et son seuil de coupure. Une membrane en PES permettait d'atteindre un état stationnaire plus rapidement qu'une membrane en PS : cette dernière, sensiblement plus hydrophobe, ralentissait le transfert des peptides hydrophobes ciblés. Le rendement d'extraction final restait toutefois inférieur à ceux observés en extraction directe, mais la sélectivité restait intéressante avec la membrane en PES.

Un procédé de moussage-drainage permit d'isoler une fraction peptidique aux propriétés antibactériennes grâce à des différences de propriétés tensioactives, liées à des différences d'hydrophilie, d'hydrophobie et de taille moléculaire entre les peptides présents dans l'hydrolysat de D.H. 3 %. La mise en œuvre du système mit en évidence l'influence de nombreux paramètres. Un premier plan d'expériences permit, par une matrice de criblage, de mettre en avant l'influence majeure de quatre d'entre eux : la concentration en hydrolysat et en KCl, et les pH de l'hydrolysat et de la solution de drainage. Ces paramètres influent sur la manière dont les peptides sont chargés et donc sur leur affinité plus ou moins grande pour le milieu aqueux ou l'interface avec l'air. Un second plan d'expériences permit d'optimiser le protocole par la méthode des surfaces de réponses en travaillant spécifiquement sur ces quatre paramètres majeurs. Un pH de l'hydrolysat et du drainage à 3, une concentration en KCl de 1,5 M et en hydrolysat de 1,45 % (p/v) améliorèrent l'enrichissement de la fraction peptidique bioactive de 1,5 à 5,2.

Le procédé d'électrodialyse associée à des membranes d'ultrafiltration permit d'isoler une fraction peptique cationique issue d'un hydrolysat de D.H. 15 % contenant des peptides aux propriétés antimicrobiennes. Procédé basé sur la différence de potentiel électrique comme seule force motrice, il devait permettre l'extraction simultanée de fractions globalement chargées négativement ou positivement. La mesure par potentiels d'écoulement de la charge de la membrane permit de mettre en évidence un phénomène de répulsion de charges avec les

peptides anioniques, la membrane étant naturellement chargée négativement. Cette analyse permit également de mettre en évidence un encrassement sur les membranes d'ultrafiltration : les peptides en migration d'une part, mais également à cause de l'hème, agrégé aux peptides, qui venait colmater la membrane coté cathode. La vitesse de migration des peptides était alors logiquement plus rapide avec un hydrolysat décoloré, sans hème, qu'avec un hydrolysat brut.

En résumé, ces études ont mis en évidence la possibilité d'extraire sélectivement des peptides aux caractéristiques physico-chimiques différentes en choisissant un procédé spécifiquement adapté au peptide ou à la fraction peptidique ciblée.

Perspectives

Les études de l'extraction assistée par paires d'ions dans un système biphasique peuvent être complétées par plusieurs approches. L'étude de nouveaux agents formateurs de paires d'ions, que ce soit dans la nature du contre-ion ou dans les variations de la chaîne hydrophobe, peut amener une sélectivité supplémentaire à notre système. Il serait également intéressant de pouvoir suivre la formation de l'association peptide-agent au cours de sa migration, par spectroscopie infrarouge par exemple, pour comprendre les mécanismes régissant les transferts aux interfaces.

L'étude du procédé d'extraction biphasique assistée par paires d'ions a également posé les bases d'un procédé continu : les conditions initiales de notre système sont maîtrisées grâce aux études sur l'extraction liquide-liquide directe, et la mise en œuvre avec un contacteur à membrane montre qu'une montée en échelle est réalisable. Cela demandera préalablement un travail d'optimisation du système supporté, que ce soit dans le choix du matériel ou des conditions du protocole, les variables (autres natures du support membranaire, seuils de coupure différents, optimisation des concentrations, des débits…) étant encore nombreuses.

Le procédé de moussage-drainage fut mis en œuvre et optimisé en batch. Une nouvelle étape de développement amènerait la mise en œuvre d'un même système mais en continu. De nouvelles perspectives d'études s'ouvriraient (conception du système, l'alimentation continue en produit …) et pourrait déboucher sur une application industrielle de ce procédé simple et efficace.

L'extraction par EDUF réalisée était limitée à un seul D.H. d'hydrolysat, à certaines conditions opératoire (pH, débits, type de membrane…). Il pourrait être intéressant d'étudier le comportement du système dans d'autres conditions afin de mieux cerner les nombreuses possibilités de ce procédé.

Quelque soit le système d'extraction présenté, il peut également être très intéressant de comparer leurs performances avec d'autres hydrolysats, de sources différentes, afin de mieux appréhender leur fonctionnement. Les interactions avec des hydrolysats complexes sont dans tous les cas très nombreuses, et une simplification de notre système de départ avec par exemple des solutions de peptides modèles permettrait de mieux en cerner les mécanismes et limites. Ces études peuvent être particulièrement intéressantes pour mettre en œuvre une méthode qui permettrait de prédire, en fonction des caractéristiques physico-chimiques des peptides ciblés, quel type de procédé conviendrait le mieux à une extraction sélective.

Références bibliographiques

ADJEI A., RAO S., GARREN J., MENON G., VADNERE M., Effect of ion-pairing on 1-octanol-water partitioning of peptide drugs. I: The nonapeptide leuprolide acetate, *Int. J. Pharm.* 90, 1993, 141-149.

ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food., *Ann. Nutr. Alim.* 32, 1978, 205-216.

AKAMATSU M., YOSHIDA Y., NAKAMURA H., ASAO M., IWAMURA H., FUJITA T. Hydrophobicity of di- and tripeptides having unionizable side chains and correlation with substituent and structural parameters, *QSAR Comb. Sci.* 8, 1989, 195-203

ANNUNZIATA O., COSTANTINO L., D'ERRICO G., PADUANO L., VITAGLIANO V., Transport properties for aqueous solution of sodium sulfonate surfactants: 1. Mutual diffusion measurements: Evaluation of the equilibrium parameters for the micellization process, *J. Colloid Interf. Sci.* 216, 1999, 8-15.

ANTONOV V.K., New data on pepsin mechanism and specificity, *Adv. Exp. Med. Biol.* 95, 1977, 179-198.

AUBES-DUFAU I., CAPDEVIELLE J., SERIS J.L., COMBES D., Bitter peptide from haemoglobin hydrolysate : isolation and characterization, *FEBS Lett.* 364, 1995, 115-119.

AUBES-DUFAU I., COMBES D., Effect of different proteases on bitterness of haemoglobin hydrolysates, *Appl. Biotech. Biochem.* 67, 1997, 127-138.

BALCHEN M., REUBSAET L., PEDERSEN-BJERGAARD S., Electromembrane extraction of peptides, *J. Chromatogr. A* 1194, 2008, 143-149.

BARGEMAN G., DOHMEN-SPEELMANS M., RECIO I., TIMMER M., VAN DER HORST H.C., Selective isolation of cationic amino acids and peptides by electro-membrane filtration, *Lait* 80, 2000, 175-185.

BARGEMAN G., KOOPS G.H., HOUWING G., BREEBAART I., VAN DER HORST H.C., WESSLING M., The development of electro-membrane filtration for the isolation of bioactive peptides: the effect of membrane selection and operating parameters on the transport rate, *Desalination* 149, 2002, 369-374.

BARKHUDARYAN N.A., KELLERMANN J., GALOYAN A.A., LOTTSPEICH F., High molecular weight aspartic endopeptidase generates a coronaro-constrictory peptide from the β-chain of hemoglobin, *FEBS Lett.* 329, 1993, 215-218.

BARKHUDARYAN N.A., OBERTHUER W., LOTTSPEICH F., GALOYAN A., Structure of hypothalamic coronaro-constrictory peptide factors, *Neurochem. Res.* 17, 1992, 1217-1221.

BAZINET L. and FIRDAOUS L., Membrane Processes and Devices for Separation of Bioactive Peptides, *Recent Pat. Biotechnol.* 3, 2009, 61-72.

BAZINET L., AMIOT J., POULIN J.F., LABBE D., TREMBLAY D., Separation of organic charged compounds, WO 2005/082495.

BAZINET L., POULIN J.F., AMIOT J., Effect of conditioning ultrafiltration membranes on their performances in electrodialysis with ultrafiltration membrane, *Sep. Sci. Technol.* 42, 2007, 2501-2518.

BELLAMY W., TAKASE M., YAMAUCHI K., KAWASE K., SHIMAMURA S., TOMITA M., Identification of the bactericidal domain of lactoferrin, *Biochim. Biopys*. 1121, 1992, 130-136.

BENNET J.C., Paper chromatography and electrophoresis ; special procedure for peptide maps, *Methods Enzymol.* 11, 1967, 330-338.

BIGELOW C.C., On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure, *J. Theoret. Biol.* 16, 1967, 187-211.

BJERRUM N., Some anomalies in the theory of solution of strong electrolytes and their explanation, *Trans. Faraday Soc*. 23, 1927, 445-454.

BLISHCHENKO E.Y., MERNENKO O.A., MIRKINA I.I., SATPAEV D.K., IVANOV V.S., TCHIKIN L.D., OSTROVSKY A.G., KARELIN A.A., IVANOV V.T., Tumor cell cytolysis mediated by valorphin, an opioid-like fragment of hemoglobin β-chain, *Peptides* 18, 1996, 79-85.

BOHLEN P., KLEEMAN G., Analytical and preparative mapping of complex peptide mixture by reversed-phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatography* 205, 1981, 65-75.

BOUHALLAB S., HENRY G., Transmission of a hydrophobic peptide through an inorganic ultrafiltration membrane: effect of membrane support, *J. Membrane Sci.* 104, 1995, 73-79.

BOUHALLAB S., MOLLE D., LEONIL J., Tryptic hydrolysis of caseino macropeptide in membrane reactor : preparation of bioactive peptides, *Biotechnol. Lett.* 14, 1992, 805-810.

BOUHALLAB S., TOUZE C., Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor : kinetic study and gram-scale production of antithrombic peptides, *Lait* 75, 1995, 251-258.

BOURSEAU P., VANDANJON L., JAOUEN P., CHAPLAIN-DEROUINIOT M., MASSE A., GUERARD F., CHABEAUD A., FOUCHEREAU-PERON M., LE GAL Y., RAVALLEC-PLE R., BERGE J.P., PICOT L., PIOT J.M., BATISTA I., THORKELSSON G., DELANNOY C., JAKOBSEN G., JOHANSSON I., Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofilatrtion : impact on peptidic populations, *Desalination* 244, 2009, 303-320.

BRANTL V., GRAMSCH C., LOTTSPEICH F., HENSCHEN F., JAEGER K.H., HERZ A., Novel opioid peptides derived from mitochondrial cytochrome b : cytochrophins, *Eur. J. Pharmacol.* 111, 293-294.

BRANTL V., GRAMSCH C., LOTTSPEICH F., MERTZ R., JAEGER K.H., HERZ A., Novel opioid peptides derived from hemoglobin : hemorphins, *Eur. J. Pharmacol*. 106, 1986, 213-214.

BROMBERG L.E. and KLIBANOV A.M., Detergent-enabled transport of proteins and nucleic acids through hydrophobic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 1994, 143-147.

BULT A., Ion-pair and metal complex formation in drug analysis, In D.D. Breimerand and P. Speiser (Eds), *Topics in Pharmaceutical Sciences 1983*, Elsevier, Amsterdam, 1983, 3-14.

BUTYLINA S., LUQUE S., NYSTROM M., Fractionation of whey-derived peptides using a combination of ultrafiltration and nanofiltration, *J. Membrane Sci.* 280, 2006, 418-426.

CARBON J.Y., L'HER M., COURTOT-COUPEZ J., Salt effects on the distribution of metal ions and their complexes between water and propylene carbonate, *J. Chem. Research*., 1978, 344-345.

CASSATT J.C., STEINHARDT J., Effects on traces of n-alcohols on the acid denaturation of horse ferrihemoglobin, *Biochemistry* 10, 1971, 3738-3742.

CHABEAUD A., VANDANJON L., BOURSEAU P., JAOUEN P., CHAPLAIN-DEROUINIOT M., GUERAR F., Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate : Application to the refining of bioactive peptidic fractions, *Sep. Purif. Technol.* 66, 2009, 463-471.

CHANG R.C.C., HUANG W.Y., REDDING T.W., ARIMURA A., COY D.H., SCHALLY A.V., Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalami, *Biochem. Biophys. Acta* 625, 1980, 266-273.

CORDANO A., COOK D.A., Preclinical and clinical evaluation with casein hydrolysate products, *Nutrition for special infancy*, chap. 9, F. Lifshtz ed., Marcel Dekker, Inc., New-York, 1985, 119-130.

CORDLE C.T., MAHMOUD M.I., MOORE V., Immunogenicity evaluation of protein hydrolysates for hypoallergenic infant formulas, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 13, 1991, 270-276.

CORDLE C.T., DUSKA-McEWEN G., JANAS L.M., MALONE W.T., HIRSCH M.A., Evaluation of the immunogenicity of protein hydrolysate formulas using laboratory animal hyperimmunization, *Pediatr. Allergy Immu.* 5, 1994, 14-19.

COWAN D.A., BROWN J.H., Effect of turbulence on limiting current in electrodialysis cells, *Ind. Eng. Chem.* 51, 1959, 1445-1448.

CROSBY W.H., MUNN J.I., FURTH F.W., Standardizing a method for clinical hemoglobimetry, *US. Armed. Forces. Med. J.* 5, 1954, 693-703.

D'ALVISE N., LESUEUR-LAMBERT C., FERTIN B., DHULSTER P., GUILLOCHON D., Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate, *Enzyme Microb. Techn.* 27, 2000, 286-294.

DAMODARAN S., Protein Stabilization of Emulsions and Foams, *J. Food Sci.* 70, 2005, 54-66.

DAOUD R., DUBOIS V., BORS-DODITA L., NEDJAR-ARROUME N., KRIER F., CHIHIB N.E., MARY P., KOUACH M., BRIAND G., GUILLOCHON D., New antibacterial peptide derived from bovine haemoglobin, *Peptides* 26, 2005, 713-719.

DARTON R.C., SUPINO S., SWEETING K.J., Development of a multistaged foam fractionation column, *Chem. Eng. Process.* 43, 2004, 477-482.

DASA R., BHATTACHERJEEB C., GHOSH S., Effects of operating parameters and nature of fouling behavior in ultrafiltration of sesame protein hydrolysate, *Desalination* 237, 2009, 268-276.

DAVIS T.P., GILLEPSIE T.J., PORRECA F., Peptide fragments derived from the β-chain og hemoglobin (hemorphins) are centrally active in vivo, *Peptides* 10, 1989, 747-751.

DEBYE P., HUCKEL E., The theory of electrolytes I. Lowering of freezing point and related phenomena, *Physikal. Zeitschrift* 24, 1923, 185-206.

DHULSTER P., KAPEL R., FROIDEVAUX R., NEDJAR-ARROUME N., FERTIN-BAZUS A., CHOISNARD L., GUILLOCHON D., Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction, *Desalination* 148, 2002, 221-226.

DIAMOND R.M., Aqueous solution behavior of large univalent ions, A new type of ion-pairing, *J. Phys. Chem.* 67, 1963, 2513-2517.

DRAPALA A., DZYGIEL P., JONSSON J.A., WIECZOREK P., Supported liquid membrane extraction of peptides, *Acta Biochim. Polon.* 48, 2001, 1113–1116.

DRAPALA A., WIECZOREK P., Extraction of short peptides using supported liquid membranes, *Desalination* 148, 2002, 235-239.

ESBJORNER E.K., LINCOLN P., NORDEN B., Counterion-mediated membrane penetration: Cationic cell-penetrating peptides overcome born energy barrier by ion-pairing with phospholipids, *BBA – Biomembranes* 1768, 2007, 1550-1558.

FIAT A.M., JOLLES P., Caseins of various origins and biologically active peptide and oligosaccharides : structure and physiological aspects, *Mol. Cell. Biochem.* 87, 1989, 5-30.

FLORENCE A.T., ATTWOOD D., *Physicochemical principles of pharmacy*, Macmillan, London, 1988.

FOGACA A.C., SILVA P.I., TERESA M., MIRANDA M., BIANCHI A.G., MIRANDAI A., RIBOLLA P.E.M., DAFFRE S., Antimicrobial Activity of a Bovine Hemoglobin Fragment in the *Tick Boophilus microplus*, *J. Biol. Chem.* 274, 1999, 25330–25334.

FONINA L.A., GUR'YANOV S.A., NAZIMOV I.V., YANOVSKII O.G., ZAKHAROVA L.A.,MIKHAILOVA A.A., PETROV R.V., Structure of two myelopeptides affecting pain sensitivity, *Biomed. Sci.* 2, 1991, 665-666.

FREISER H., Relevance of solubility parameter in ion association extraction systems, *Anal. Chem.* 41, 1969, 1354-1355.

FREISER H., Ion pair partition, *Acta Pharm. Suec*. 9, 1972, 609-611.

FROIDEVAUX R., LIGNOT B., NEDJAR-ARROUME N., GUILLOCHON D., CODDEVILLE B., RICART G., Kinetics of appearance of haemorphins from bovine haemoglobin peptic hydrolysates by a direct coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 873, 2000, 185-194.

FROIDEVAUX R., KRIER F., NEDJAR-ARROUME N., VERCAIGNE-MARKO D., KOSCIARZ E., RUCKEBUSCH C., DHULSTER P., GUILLOCHON D., Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment, *FEBS Letters* 491, 2001, 159-163.

FROIDEVAUX R., VERCAIGNE-MARKO D., TICU L., KAPEL R., LECOUTURIER D., CHUNG S., DHULSTER P., GUILLOCHON D., Study of a continuous reactor for selective solvent extraction of haemorphins in the course of peptic haemoglobin hydrolysis*, J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 2006, 1433-1440.

FROIDEVAUX R., VANHOUTE M., LECOUTURIER D., DHULSTER P., GUILLOCHON D., Continuous preparation of two opioid peptides and recycling of organic solvent using liquid/liquid extraction coupled with aluminium oxide column during haemoglobin hydrolysis by immobilized pepsin, *Process Biochem*. 43, 2008, 431-437.

GALOYAN A.A., Primary structure and biological activity of hemoglobin-related hypothalamic peptides, *Biopolymers* 43, 1997, 135-137.

GERKEN B.M., NICOLAI A., LINKE D., ZORN H., BERGER R.G., PARLAR H., Effective enrichment and recovery of laccase C using continuous foam fractionation, *Sep. and Purif. Technol.* 49, 2006, 291-294.

GLAMSTA E.L., MARKLUND A., HELLMAN U., WERNSTEDT C., TERENIUS L., NYBERG F., Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland, *Regul. Pept.* 34, 1991, 169-179.

GLAMSTA E.L., MEYERSON B., SILBERRING J., TERENIUS L., NYBERG F., Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 1991, 1060-1066.

GLASER L.A., PAULSON A.T., SPEERS R.A., YADA R.Y., ROUSSEAU D., Foaming behavior of mixed bovine serum albumin-protamine systems, *Food Hydrocolloid.* 21, 2007, 495-506.

GOURLEY L., BRITTEN M., GAUTHIER S.F., POULIOT Y., Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurement, *J. Membrane Sci.* 97, 1994, 283-289.

GUNTHER R.C., Chemistry and characteristics of enzyme-modified whipping proteins, *J. Am. Oil Chemists Soc.* 56, 1979, 295-299.

HERRMANN K.W., Micellar Properties of Some Zwitterionic Surfactants, *J. Colloid Interf. Sci.* 22, 1966, 352-359.

HIGUCHI A., HIGUCHI Y., FURUTA K., YOON B.O., HARA M., MANIWA S., SAITOH M., SANUI K., Chiral separation of phenylalanine by ultrafiltration through immobilized DNA membranes, *J. Membrane Sci.* 221, 2003, 207-218.

HIGUCHI T., MICHAELIS A., TAN T., HURWITZ A., Role of Dipolar Solvating Agents in Extraction of Dextromethorphan, *Anal. Chem.* 39, 1967, 974-979.

HILL R.L., DELANAY R., Peptide mapping with automatic analysers : use of analysers and other automatic equipment to monitor peptide separations by column methods, *Methods Enzymol.* 11, 1967, 57-76.

HO T.S., HALVORSEN T.G., PEDERSEN-BJERGAARD S., RASMUSSEN K.E., Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport, *J. Chromatogr. A* 998, 2003, 61-72.

IBANOGLU E., KARATAS S., High pressure effect on foaming behaviour of whey protein isolate, *J. Food Eng.* 47, 2001, 31-36.

IRWIN G.M., KOSTENBAUDER H.B., DITTERT L.W., STAPLES R., MISHER A., SWINTOSKY J.V., Enhancement of gastrointestinal absorption of a quaternary ammonium compound by trichloroacetate, *J. Pharm. Sci.* 58, 1969, 313-315.

IVANOV V.T., KARELIN A.A., KARELINA E.V., UL'YASHIN V.V., VASKOVSKY B.V., MIKHALEVA I.I., NAZIMOV I.V., GRISHINA G.A., KHAVINSON V.K., MOROSOV V.G., MIKHALTSOV A.N., Peptides, Chemistry and Biology : total screening of bovine brain and bone marrow extracts for active peptides, *Proceedings of the Twelfth American Peptide Symposium*, J.A. Smith and J.E. Rivier (Eds), ESCOM, Leiden, 1992, 939-941.

IVANOV V.T., KARELIN A.A., MIKHALEVA I.I., VASKOVSKY B.V., SVIRYAEV V.I., NAZIMOV I.V., Isolation, structure and properties of endogenous peptides, *Bioorg. Khim.*, 1992, 1271-1311.

IVANOV V.T., KARELIN A.A., PHILIPPOVA M.M., NAZIMOV I.V., PLETNEV V.Z., Haemoglobin as a source of endogenous bio-active peptides : the concept of tissue-specific peptide pool, *Biopolymers.* 43, 1997, 171-188.

IVASHKIV E., Colorimetric determination of peptide antibiotics : In-process assay of cyclic octapeptidic antibiotics in fermentation broths, *J. Pharm. Sci.* 64, 1975, 1401-1403.

KARELIN A.A., PHILIPPOVA M.M., IVANOV V.T., Proteolytic degradation of hemoglobin in erythrocytes leads to biologically active peptides, *Peptides* 16, 1995, 693-697.

KAROOR S., SIRKAR K.K., Gas absorption studies in microporous hollow fiber membrane modules, *Ind. Eng. Chem. Res.* 32, 1993, 674-684.

KAGAWA K., MATSUKATA H., FUKUHAMA C., FUJINO H., OKUDA H., Suppressive effect of globin digest in postprandial hyperlipidemia in male volunteers, *Human Nutr. Metab.*, 1998, 56-60.

KAGAWA K., MATSUKATA H., FUKUHAMA C., WATANAKA Y., FUJINO H., Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertlyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, posseses most superior effect, *Life Sci.* 58, 1996, 1745-1755.

KLEINMANN R.E., BAHNA S., POWEL G.F., SAMPSON H.A., Use of infant formulas in infants with cow milk allergy, *Pediatr. Allergy Immunol*. 4, 1991, 146-155.

KRAUS C.A., The ion-pair concept : its evolution and some applications, *J. Phys. Chem.* 60, 1956, 129-141.

LANTZ I., GLAMSTA E.L., TALBACK L., NYBERG F., Hemorphins derived from hemoglobin have an inhibitory action on angiotensin converting enzyme activity, *FEBS Lett*. 287, 1991, 39-41.

LAPOINTE J.F., GAUTHIER S.F., POULIOT Y., BOUCHARD C., Characterization of interactions between β-lactoglobulin tryptic peptides and a nanofiltration membrane: Impact on the surface membrane properties as determined by contact angle measurements, *J. Membrane Sci.* 261, 2005, 36–48.

LAPOINTE J.F., GAUTHIER S.F., POULIOT Y., BOUCHARD C., Selective separation of cationic peptides from a tryptic hydrolysate of β-Lactoglobulin by Electrofiltration, *Biotechnol. Bioeng.* 94, 2006, 223-233.

LARRE C., MULDER W., SANCHEZ-VIOQUE R., LAZKO J., BEROT S., GUEGUEN J., POPINEAU Y., Characterisation and foaming properties of hydrolysates derived from rapeseed isolate, *Colloid. Surfaces B* 49, 2006, 40-48.

LEBRUN F., BAZUS A., DHULSTER P., GUILLOCHON D., Influence of molecular interactions on ultrafiltration of a bovine hemoglobin hydrolysate with an organic membrane, *J. Membrane Sci.* 146, 1998, 113-124.

LEE S.J., KIM S.W., hydrophobization of ionic drugs for transport through membranes*, J. Contr. Rel.* 6, 1987, 3-13.

LEO A., HANSCH C., ELKINS D., Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71, 1971, 525-554.

LEON J., REUBSAET E., JONAS V., PAULSEN V., Ion-pair mediated transport of small peptides in liquid phase micro-extraction under acidic conditions, *J. Sep. Sci.* 28, 2005, 295-300.

LOUPY A., HAUDRECHY A., Effets du milieu en synthèse organique. Des effets de solvants aux méthodes d'activation non classiques, *Sciences de l'Ingénieur*, Ed. Masson, Paris, 1996.

MARSHALL A.D., MUNRO P.A., TRAGARDH G., The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity : a literature review, *Desalination* 91, 1993, 65-108.

MAUREL A., Techniques séparatives à membranes : osmose inverse, nanofiltration, ultrafiltration, microfiltration tangentielle – considérations théoriques, *Tech. Inge.*, 1993, 1-24.

MODIN R., SCHRODER-NIELSEN M., Quantitative determinations by ion pair extraction Part 9. Extraction of penicillins with ion-pairing and adduct-forming agents, *Acta Pharm. Suec.* 8, 1971, 573-584.

MOURE A., DOMINGUEZ H., PARAJO J.C., Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates, *Process Biochem.* 41, 2006, 447-456.

MURTHY K.S., ZOGRAFI G., Oil-water partitioning of chlorpromazine and other phenotiazine derivatives using dodecane and n-octanol, *J. Pharm. Sci.* 59, 1970, 1281-1285.

MUYNG S.W., CHOI I.H., LEE S.M., PARK J.Y., KIM I.C., LEE K.H., Separation of silk proteins and silk oligopeptides by thin film composite ultrafiltration membrane, *Desalination* 234, 2008, 158-165.

NEDJAR-ARROUME N., DUBOIS-DELVAL V., MILOUDI K., DAOUD R., KRIER F., KOUACH M., BRIAND G., GUILLOCHON D., Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin, *Peptides* 27, 2006, 2082-2089.

NEDJAR-ARROUME N., DUBOIS-DELVAL V., ADJE E.Y., TRAISNEL J., KRIER F., MARY P., KOUACH M., BRIAND G., GUILLOCHON D., Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides, *Peptides* 29, 2008, 969-977.

NISHIMURA K., HAZATO T., Isolation and identification of an endogenous inhibitor of ankephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 194, 1993, 713-719.

NYBERG F., SANDERSON K., GLAMSTA E.L., The hemorphins : a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin, *Biopolymers* 43, 1997, 147-156.

ORTS R.J., LIAO T.H., SARTIN J.L., BRUOT B., Purification of a tripeptide with anti-reproductive properties isolated from bovine pineal glands, *Physiologist* 21, 1978, 87.

PARISH C.A., JIANG H., TOKIWA Y., BEROVA N., NAKANISHI K., Mc CABE D., ZUCKERMAN W., XIA M.M., GABAY J.E., Broad-spectrum antimicrobial activity of haemoglobin., *Bioorg. Med. Chem.* 9, 2001, 377-382.

PEARSON J.T. and LAWRENCE A.S.C., Behaviour of Calcium Ions in Micellar Sodium Dodecyl Sulphate Solution containing Solubilized Polar Organic Compounds, *Trans. Faraday Soc.* 63, 1965, 488-494.

PEARSON R.G. and SONGSTAD J., Application of the Principle of Hard and Soft Acids and Bases to Organic Chemistry, *Org. Biol. Chem.* 89, 1967, 1827-1836.

PIERRE F.X., SOUCHON I., ATHES-DUTOUR V., MARIN M., Membrane-based solvent extraction of sulfur aroma compounds : influence of operating conditions on mass transfer coefficients in a hollow fiber contactor, *Desalination* 148, 2002, 199-204.

PIOT J.M., GUILOCHON D., THOMAS D., Size-exclusion and high-performance liquid chromatography separation of peptides from peptic hemoglobin hydrolysate obtained by ultrafiltration, *Chromatographia.* 25, 1988, 307-312.

PIOT J.M., GUILOCHON D., ZHAO Q., LEROY Y., RICART G., FOURNET B., THOMAS D., LC-MS of enzymatic peptic haemoglobin hydrolysate produced at the pilot-plant level, *Chromatographia* 27, 1989, 307-312.

PIOT J.M., GUILOCHON D., ZHAO Q., RICART G., FOURNET B., THOMAS D., Identification of peptides, from a peptic haemoglobin hydrolsate produced at pilot-plant scale, by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 481, 1989, 221-231.

PIOT J.M., ZHAO Q., GUILLOCHON D., RICART G. and THOMAS D., Isolation and characterization of a bradykinin-potentiating peptide from a bovine peptic hemoglobin hydrolysate, *FEBS* 299, 1992, 75-79.

POPINEAU Y., HUCHET B., LARRE C., BEROT S., Foaming and emulsifying properties of fractions of gluten peptides obtained by limited enzymatic hydrolysis and ultrafiltration, *J. Cereal Sci.* 35, 2002, 327-335.

POULIOT Y., GAUTHIER S.F., BARD C., Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes, *J. Membrane Sci.* 60, 1993 257-264

POULIN J.F., AMIOT J., BAZINET L., Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electrodialysis with ultrafiltration membrane, *J. Biotechnol.* 123, 2006, 314–328.

PREVOT D'ALVISE N., LESUEUR-LAMBERT C., FERTIN-BAZUS A., FERTIN B., DHULSTER P., GUILLOCHON D., Continuous enzymatic solubilization of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor, *Enzyme Microb. Tech.* 34, 2004, 380-391.

ROBERTS R.C., SZWARC M., The chemistry of the radical anion of tetraphenylethylene, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1954, 2597-2598.

REICHARDT C., Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators, *Chem. Rev.* 94, 1994, 2319-2358.

RODRIGUEZ P.J.M., CONDE J.M., LINARES H.M., JIMENEZ J.J.P., SANCHEZ C.C., PIZONES V., RODRIGUEZ F.M., Interfacial and foaming properties of enzyme-induced hydrolysis of sunflower protein isolate, *Food Hydrocolloid.* 21, 2007, 782–793.

SADEK H., FUOSS R.M., Electrolyte-solvent interaction IV. Tetrabutylammonium bromide in methanol-caron tetrachloride and methanol-heptane mixtures, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1954, 5897-5901.

SASAKAWA S., Studies on hemoglobin VI. Amino acid composition of the fractionated bovine globin α and β, *J. Biochem.* 50, 1961, 345-351.

SCHALLY A.V., HUANG W.Y., REDDING T.W., COY D.H., CHIHARA K., CHANG R.C.C., RAYMOND V., LABRIE F., Isolation, structural elucidation and synthesis of a tetradecapeptide with in vitro ACTH-releasing activity corresponding to residues 33-46 of the a-chain of porcine hemoglobin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 1978, 582-588.

SCHLIMME E., MEISEL H., Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects, *Die Nahrung* 39, 1995, 1-20.

SHROEDER W.A., ROBBERSON B., An improved gradient for ion exchange chromatography of peptides on Dowex-1, *Anal. Chem.* 37, 1965, 1583-1585.

SHROEDER W.A, SHELTON J.R., SHELTON J.B., ROBBERSON B., BABIN D.R., A comparison of amino acid sequences in the beta-chains of adult bovine hemoglobins A and B, *Arch. Biochem. Biophys.* 120, 120, 124-135.

SLEMMON J.R., HUGHES C.M., CAMPBELL G.A., FLOOD D.G., Increased levels of hemoglobin-derived and the others peptides in Alzheimer's disease cerebellum, *J. Neurosci.* 14, 1994, 2225-2235.

SZWARC M., Living polymers : a tool in studies of ions and ion-pairs, *Science* 170, 1970, 23-31.

TAKAGI H., SHIOMI H., FUKUI K., HAYASHI K., KISO Y., KIGATAWA K., Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, from bovine brain, *Life Sci.* 31, 1982, 1733-1736.

TAKAGI H., SHIOMI H., UEDA H., AMANO H., A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin realeser, *Nature* 5737, 1979, 410-412.

TANG J., Competitive inhibition of pepsin by aliphatic alcohols, *J. Biol. Chem.* 240, 1965, 3810-3815.

VANDANJON L., GRIGNON M., COUROIS E., BOURSEAU P., JAOUEN P., Fractionating white fish fillet by ultrafiltration and nanofiltration, *J. Food Eng.* 95, 2009, 36-44.

VASLOVSKY B.V., IVANOV V.T., MIKHALEVA I.I., KOLAEVA S.G., KOBOZ S.G., YU M., SVIERYAEV V.I., ZIGANSHIN R.H., SUKHOVA G.S., IGNATIEV D.A., Neokyotorphin from the brain of hibernating ground squirrels can participate in heart activation and arousal from hibernation, Peptides, Chemistry, Structure and Biology, J.E. Rivier and G.R. Marshall, Eds Leiden ESCOM, 1990, 302-304.

VERCAIGNE-MARKO D., KOSCIARZ E., NEDKAR-ARROUME N., GUILLOCHON D., Improvement of Staphylococcus aureus-V8-protease hydrolysis of bovine haemoglobin by its adsorption on a solid phase in the presence of SDS : peptide mapping and obtention of two haemopoietic peptides, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 2000, 127-134.

WANG J., ZHAO M., YANG X., JIANG Y., Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration, *J. Cereal Sci.* 44, 2006, 93-100.

WERNER G.H., FLOC'H F., MIGLIORE-SAMOUR D., JOLLES P., Immunomodulating peptides, *Experientia* 42, 1986, 521-531.

WILKINSON A.M., Mc NAUGHT A.D., Compendium of chemical technology : IUPAC Recommendations, *Blackwell Scientific Publication*, Oxford, 1997.

WINSTEIN E., CLIPPINGER E., FAINBERG A.H., ROBINSON C., Salt effects and ion-pairs in solvolysis, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1954, 2597-2598.

YOU-JIN J., HEE-GUK B., SEE-KWON K., Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes, *Process Biochem.* 35, 1999, 471-478.

ZHAO Q., PIOT J.M, Organic solvent extraction associated with HPLC in the prepapation of hemorphins from bovine haemoglobin peptic hydrolsyate, *Prep. Biochem. Biotech.* 28, 1998, 61-78.

ZHAO Q., SANNIER F., GARREAU I., LECOEUR C., PIOT J.M, Reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with second-order derivative spectroscopy for the quantitation of aromatic amino acids in peptides : application to hemorphins, *J. Chromatogr. A.* 723, 1996, 35-41.

ZHAO Q., MOLINA P., PIOT J.M., Peptic peptide mapping by HPLC, on line with photodiode array detection, of a haemoglobin hydrolysate produced at pilot-plant scale from ultrafiltration process, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 20, 1997, 1717-1739.

ZHAO Q., SANNIER F., GARREAU I., GUILLOCHON D., PIOT J.M., Inhibition and inhibition kinetics of angiotensin converting enzyme activity by hemorphins, isolated from peptic bovine hemoglobin hydrolysate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 1994, 216-223.

ZHENG X., BAKER H., HANCOCK W.S., Analysis of the low molecular weight serum peptidome using ultrafiltration and a hybrid ion trap-Fourier transform mass spectrometer, *J. Chromatograph. A* 1120, 2006, 173-184.

ZIOUDROU C., STREATY R.A., KLEE W.A., Opioid peptides derived from food proteins, the exorphin, *J. Biol. Chem.* 10, 1979, 2446-2449.

Site internet :

S.I.F.CO., Syndicat des industries françaises des coproduits animaux, POINT B.,
Disponible sur : http://www.sifco.fr/nos-metiers/donnees-economiques/production

Titre : Etude de l'extraction sélective par des procédés innovants de peptides issus de la protéolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine

Résumé : Trois procédés innovants ont permis d'extraire sélectivement des peptides actifs d'un hydrolysat complexe issu de la protéolyse pepsique de l'hémoglobine bovine. Un premier procédé d'extraction biphasique assistée par des alkyl-sulfonates a permis de modifier l'affinité des peptides pour la phase organique par la formation de paires d'ions. Ces études des conditions d'extraction de peptides opioïdes hydrophobes ont permis la mise en œuvre d'un système d'extraction dans l'octan-1-ol supporté par un contacteur à membrane. Dans un deuxième temps, un procédé de moussage-drainage fut développé sur les propriétés tensioactives des peptides et a permis de fractionner la population peptidique pour isoler une fraction aux propriétés antibactériennes. L'optimisation par plans d'expériences a mis en avant l'influence de quatre paramètres majeurs (concentrations en hydrolysat et en sel, pH des solutions d'hydrolysat et de drainage) et a permis de multiplier par 3,4 l'enrichissement de cette fraction dans la solution récoltée. Enfin un procédé récemment développé, l'électrodialyse associée à des membranes d'ultrafiltration ayant pour seule force motrice la différence de potentiel électrique, a permis d'isoler une fraction peptidique cationique. L'étude du comportement en encrassement a révélé l'existence de phénomènes de répulsion de charges empêchant la récolte d'une fraction peptidique anionique et la formation d'agrégats hème-peptides colmatant de manière partiellement réversible les membranes d'ultrafiltration.

Mots-clés : peptide, extraction, système biphasique, moussage, électrodialyse, ultrafiltration

Title : Study of the selective extraction by innovative processes of peptides from the enzymatic proteolysis of bovine haemoglobin

Abstract : Three innovative processes allowed to extract selectively active peptides from a complex hydrolysate from the pepsic proteolysis of bovine haemoglobin. A first process of biphasic extraction assisted by alkyl-sulfonates allowed to modify the affinity of peptides for the organic phase by the formation of ion-pairs. These studies of conditions of extraction of opioid hydrophobe peptides allowed the implementation of a system of extraction in octan-1-ol supported by a membrane contactor. Secondly, a process of bubbling-draining was developed based on the surface tension properties of the peptides and allowed to split the peptidic population to isolate a fraction showing antibacterial properties. The optimization by experimental design advanced the influence of four major parameters (concentrations of hydrolysate and KCl, pH of solutions of hydrolysate and drainage) and allowed to multiply by 3,4 the enrichment of this fraction in the collected solution. Finally a process recently developed, the electrodialysis associated with ultrafiltration membranes having for only driving strength the difference of electric potential, allowed to isolate a cationic peptidic fraction. The study of the behavior in fouling revealed the existence of phenomena of charge repulsion preventing the isolation of a anionic peptidic fraction and the formation of aggregates haem-peptides fouling in a partially reversible way the ultrafiltration membranes.

Keywords : peptide, extraction, biphasic system, foaming, electrodialysis, ultrafiltration