THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

M. BENJAMIN MORAS

le mardi 30 juin 2015

Titre :

FRACTIONNEMENT DE PROTEINES VEGETALES POUR LE DEVELOPPEMENT D'INGREDIENTS ALIMENTAIRES INFANTILES HYPOALLERGENIQUES ET A TENEUR REDUITE EN PHYTOESTROGENES

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (L.C.A.)

Directeur(s) de Thèse :

M. PIERRE YVES PONTALIER

M. GERARD VILAREM

Rapporteurs :

M. FARID CHEMAT, UNIVERSITE D'AVIGNON

Mme STEPHANIE JUNG, CALIFORNIA POLYTECHNIC STATE UNIVERSITY

Membre(s) du jury :

M. PHILIPPE BEHRA, INP TOULOUSE, Président

M. DENIS COULON, INSTITUT POLYTECHNIQUE DE BORDEAUX, Membre

M. GERARD VILAREM, INP TOULOUSE, Membre

Mme MARIA AURORA FERNANDEZ, INSA TOULOUSE, Membre

« L'ouvrier qui veut bien faire son travail doit commencer par aiguiser ses instruments »

Confucius

A ma grand-mère

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse : les deux rapporteurs de thèse Mme Stéphanie JUNG venue de si loin et M. Farid CHEMAT qui m'ont permis de soutenir mes travaux et qui ont su porter un regard très instructif et complet sur ce manuscrit, le président du jury M. Philippe BEHRA, Mme Maria Aurora FERNANDEZ et M. Denis COULON.

Merci à Messieurs Gérard VILAREM et Carlos VACA GARCIA, directeurs du LCA, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire durant ces quatre années de thèse. Merci à Carlos pour son dynamisme, ses conseils lors des séminaires et sa transmission concernant la planification expérimentale. Merci à Gérard, co-directeur de thèse, pour avoir instaurer un climat de confiance dès le début et d'avoir débloqué des situations inhérentes à ce type de partenariat.

Merci à M. Pierre-Yves PONTALIER, directeur de thèse, lui aussi pour sa confiance, pour m'avoir laissé prendre des initiatives tout en gardant sa disponibilité. Merci pour son humanité, son écoute et ses encouragements à des moments critiques. Merci aussi de m'avoir laissé la possibilité d'encadrer des stagiaires, de participer à des congrès scientifiques et surtout pour m'avoir soutenu et bien sûr pour l'aide à la rédaction de ce manuscrit.

Merci aux trois associés fondateurs d'Activ'Inside, Stéphane REY, David GAUDOUT et Benoît LEMAIRE de m'avoir recruté au sein de leur société afin de mener ce projet. Une relation de confiance s'est construite d'année en année et leur intérêt porté aux résultats a été la source d'une grande motivation. Merci en particulier à Stéphane qui a suivi le projet dans son intégralité, pour son rôle de catalyseur, pour sa disponibilité, et pour tous les échanges techniques et scientifiques très constructifs. Merci à mes collègues d'Activ'Inside, Patricia, Karine, Cécile, Julien, et Hesouwe pour leur accueil chaleureux lors de mes déplacements.

L'ensemble de ces travaux de thèse ont été facilités par des personnes toujours très disponibles. Merci à Céline MATHIEU de m'avoir aidé sur les premières mises au point de méthodes d'analyses avec beaucoup de patience et de gentillesse. Merci à Jérôme PEYDECASTAING pour ses conseils sur la mise au point d'analyses et sa disponibilité. Merci à Laure CANDY et Anne LUNG pour leurs apports techniques sur les procédés d'extraction, les essais d'extrusion et la mise à l'échelle sur Tournaire, mais aussi pour leur gentillesse et leur disponibilité qui aide beaucoup lors du commencement de la thèse. Merci à Didier DANGLAS, Emmanuelle DAO, Ingrid PELLETIER pour toute la partie logistique. Je tiens aussi à remercier Eric LACROUX pour son réacteur, sa paillasse et ses cubains. Merci à Mike l'Ironman (Michaël CHARTON) pour ses blagues, son humilité et pour m'avoir aidé à mettre en place les méthodes d'électrophorèse toujours dans la bonne humeur.

Merci à Nathalie FERRY qui a effectué son stage de fin d'étude dans le cadre de ce projet, merci pour toute son aide.

Ces années de thèses n'auraient pas eu la même saveur sans l'échange quotidien avec d'autres doctorants venus de tout horizon. Beaucoup de partages de joie et de galères, de conseils, d'entraides, de bons moments. Merci à Assad pour son vocabulaire venu d'ailleurs, nos échanges scientifiques

enrichissants, nos débats, sa bonne humeur quotidienne. Merci à Cécile, R-LCA, mon bras droit, pour son aide sur les corrections et sa volonté permanente à vouloir aider son prochain... Merci à JB pour tous les moments partagés, les fous rires, les délires, mais aussi nos échanges scientifiques toujours dans un esprit de camaraderie. Merci à Bastien pour sa sincérité exemplaire, ses moments hors LCA (surtout chez lui), ses coups droits dévastateurs. Merci à Jerem pour son coaching sportif, sa bravoure, son esprit de camaraderie. Merci à Pablo pour ses délicieux tacos, sa gentillesse, très appréciables pendant la rédaction de la thèse. Merci à Natalia pour les extractions de caféines parfaitement maitrisées et autres gourmandises. Merci à Maria pour son aide sur les DH et sa douceur. Merci à Nydia pour ses démonstrations de salsa et son sourire. Merci Alice pour sa gentillesse et tous nos échanges. Merci à Gildas pour ses remarques toujours bien placées et les spectacles prohibés. Merci à Houssein pour nos débats politiques endiablés. Merci à Hien et Sabina pour nos échanges culturels intéressants et leurs sourires. Une pensée pour Thibaud et sa grosse machine. Merci au jeune Vincent pour son enthousiasme et nos échanges malgré son arrivée trop tardive.

Une pensée pour les anciens doctorants Clément, Anaïs, Manon, Alla, Julien, Mathieu, Pauline et Cédric avec qui j'ai partagé de bons moments durant mes débuts de thèse. Je ne peux pas oublier non plus Lupita, Jean François, Tianming, Julien, Antoine pour sa gentillesse et ses palets bretons, Didier, Karine, et Marion qui s'est bien occupé de mon jumeau.

Merci à toute ma famille, mes parents qui m'ont toujours permis d'avancer dans mes études et qui m'ont transmis la curiosité des choses et des autres, ma sœur pour ses surplus de viennoiserie et pour son œil toujours admiratif, mon frère pour ses conseils de consultant sans faille, ma belle-sœur et la petite dernière, ma filleule Lea, qui lira peut-être ce passage un jour.

Je dois aussi remercier mes amis toulousains, lyonnais et bordelais sans qui de bons moments de détentes n'auraient pas pu avoir lieu. Une pensée particulière pour Olivier qui m'a hébergé de nombreuses fois lors de mes déplacements.

Merci à Jin pour m'avoir rejoint de si loin, m'avoir accompagné durant ces périodes parfois difficiles. Sa présence a été un grand moteur durant ces longues années d'études.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE 18

CHAPITRE I. ETAT DE L'ART SUR LA PURIFICATION DES PROTEINES DE SOJA ET DE RIZ : REDUCTION DE LA TENEUR EN COMPOSES INDESIRABLES 22

1. LES PROTEINES VEGETALES 23
1.1. HISTORIQUE DES EXTRAITS PROTEIQUES VEGETAUX 23
1.2. LES PRINCIPALES SOURCES DE PROTEINES VEGETALES 23
1.3. LES STRUCTURES DE PROTEINES 24
1.4. LES FAMILLES DE PROTEINES VEGETALES 25
1.4.1. Classification générale 25
1.4.2. Vers un changement de classification 26
1.4.3. Caractéristiques des protéines de soja : les globulines représentantes majeures 26
1.4.4. Caractéristiques des protéines de riz : les glutélines représentantes majeures 28
2. LES PRODUITS PROTEIQUES ET LES PROCEDES DE PRODUCTION 30
2.1. PRODUITS PROTEIQUES DE SOJA : DE LA TRADITION ASIATIQUE AUX PRODUITS INDUSTRIELS ISOLES 30
2.1.1. Traditions asiatiques 30
2.1.2. De la farine à l'isolat protéique de soja 31
2.1. PURIFICATION DES PROTEINES DE RIZ : VERS LA PRODUCTION D'ISOLATS ? 34
2.1.1. Procédés de transformation courants 34
2.1.2. Extraction de la fraction protéique : méthodes et limites 36
2.2. UTILISATION EN INDUSTRIE AGRO-ALIMENTAIRE 38
2.2.1. Les Matières Protéiques Végétales 38
2.2.2. Le cas de l'alimentation infantile 39
3. LES ISOFLAVONES : PERTURBATEURS ENDOCRINIENS CIBLE DU PROJET 40
3.1. GENERALITES 40
3.1.1. Rôle dans la plante 40
3.1.2. Structures des isoflavones de soja 40
3.1.3. Effets cliniques connus chez l'Homme 42
3.1.4. Y-a-t-il un risque concernant l'alimentation infantile ? 44
3.2. METHODES D'ANALYSE DES ISOFLAVONES 44
3.3. TENEURS DANS LES PRODUITS PROTEIQUES DE SOJA 45
3.3.1. Teneurs totales 45
3.3.2. Distribution des différentes isoflavones selon le produit : influence du procédé d'obtention 46
3.3.3. Quel seuil viser pour le développement d'ingrédient infantile ? 46
3.4. INTERACTIONS PROTEINES ET POLYPHENOLS 47
4. PROCEDES PHYSICO-CHIMIQUES APPLICABLES A L'ELIMINATION DES ISOFLAVONES 49
4.1. EXTRACTION SOLIDE LIQUIDE 49
4.1.1. Principe théorique de l'extraction solide-liquide 49

4.1.2. Extraction des polyphénols et cas spécifique des isoflavones 50
4.2. PURIFICATION SUR RESINE CHROMATOGRAPHIQUE 54
4.2.1. Aspects théoriques 54
4.2.2. Rétention des isoflavones 59
5. ASPECTS NUTRITIONNELS DES PROTEINES VEGETALES 63
5.1. VALEUR PROTEIQUE : IMPORTANCE DES ACIDES AMINES ESSENTIELS 63
5.1.1. Teneur recommandée en acides aminés essentiels 63
5.1.2. Digestibilité des protéines 63
5.1.3. Intérêts nutritionnels des protéines de soja et de riz 64
5.2. PRESENCE DE FACTEURS ANTINUTRITIONNELS 64
5.2.1. Les facteurs antinutritionnels identifiés dans le soja 64
5.2.2. Les facteurs antinutritionnels identifiés dans le riz 65
5.3. ALLERGENICITE DES PROTEINES 65
5.3.1. Explication synthétique de l'allergie alimentaire 65
5.3.2. Les allergènes connus 66
5.3.3. Diminution de l'allergenicité des protéines 67
5.4. L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PROTEINES VEGETALES 68
5.4.1. La réaction d'hydrolyse des protéines 68
5.4.2. Différents types de protéases 69
5.4.3. Autres intérêts de l'hydrolyse enzymatique des protéines 69
5.4.4. Les hydrolysats hypoallergéniques 70
6. CONCLUSION DE CHAPITRE 71

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES 74

1. CARACTERISATION DES MATIERES PREMIERES 76
1.1. PRESENTATION DES MATIERES ISSUES DU RIZ ET DU SOJA 76
1.2. MATIERE SECHE ET MATIERE MINERALE 77
1.3. TENEUR EN PROTEINES PAR LA METHODE DU KJELDAHL 77
1.4. DOSAGE DES SUCRES PAR HPIC 78
1.5. DOSAGE DE L'AMIDON DANS LES PRODUITS DU RIZ 79
2. DOSAGE DES ISOFLAVONES PAR HPLC-UV 80
2.1. CHOIX DU SOLVANT DE REFERENCE 80
2.2. SYSTEME DE MELANGE POUR LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON 80
2.3. APPAREILLAGE 80
2.4. METHODE DE SEPARATION 80
2.4.1. Comparaison entre colonne 80
2.4.2. Limite de détection et de quantification 83
2.4.1. Conservation de l'échantillon 83
2.5. STANDARDS ET CALCUL DE LA TENEUR EN ISOFLAVONES EN EQUIVALENT AGLYCONES 83
2.6. DOSAGE APRES HYDROLYSE ACIDE 84

3. EXTRACTION DES ISOFLAVONES PAR ETHANOL 85
3.1. PLANIFICATION EXPERIMENTALE EN REACTEUR DE 500 ML 85
3.2. ESSAIS D'EXTRACTIONS MULTI-ETAGEE SUR REACTEUR AGITE DE 2 L ET SOXHLET 86
3.3. MISE A L'ECHELLE INDUSTRIELLE SUR TOURNAIRE A FOND FILTRANT DE 500 L 86
4. EXTRACTION PAR FLUIDES PRESSURISES 87
5. RETENTION DES ISOFLAVONES DE SOJA SUR RESINES CHROMATOGRAPHIQUES 89
5.1. NOMS ET CARACTERISTIQUES DES RESINES UTILISEES 89
5.2. SYSTEME BATCH POUR LA RETENTION DES ISOFLAVONES 89
5.3. GRANDEURS ET MODELES UTILISES 90
5.4. CONDITIONNEMENT DES RESINES ANIONIQUES 92
5.5. ADSORPTION EN MODE DYNAMIQUE SUR RESINE FPA91 ET XAD7HP 92
5.6. SECHAGE PAR ATOMISATION 93
6. ETUDE DU PROFIL DE POIDS MOLECULAIRE ET AUTRES INDICATEURS D'HYDROLYSE 93
6.1. SEPARATION PAR HP-SEC (EXCLUSION STERIQUE) 93
6.1.1. Méthode de solubilisation 93
6.1.2. Système chromatographique HP-SEC 93
6.1.3. Calibration 94
6.1.4. Séparation et détection 94
6.1.5. Calculs 94
6.2. ELECTROPHORESE SDS-PAGE 95
6.3. DEGRE D'HYDROLYSE 96
6.4. MESURE DE LA SOLUBILITE DES PROTEINES DANS LA MATIERE PREMIERE 96
7. HYDROLYSES ENZYMATIQUES 97
7.1. ECHELLE LABORATOIRE SUR 2 G DANS DES TUBES AGITES 97
7.2. HYDROLYSE EN REACTEUR AGITE 99
7.3. COMPARAISON DE DIFFERENTS TRAITEMENTS D'HYDROLYSE 99
7.4. HYDROLYSE DES PROTEINES DE SOJA AVANT RETENTION DES ISOFLAVONES SUR RESINE 99

CHAPITRE III. EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE DES ISOFLAVONES DE SOJA PAR METHODES CONVENTIONNELLES ET FLUIDES PRESSURISES 101

1. INTRODUCTION 103
1.1. CARACTERISATION GLOBALE ET TENEUR EN ISOFLAVONES PAR HPLC-UV 103
1.2. LES MATIERES PREMIERES UTILISEES 103
1.3. DOSAGE DES ISOFLAVONES DANS LES MATIERES PREMIERES 104
1.3.1. Problématique identifiée 104
1.3.2. Méthode avec hydrolyse par le dosage des structures de base 104
1.3.3. Méthode sans hydrolyse avec identification des 12 formes 105
2. EXTRACTION ETHANOLIQUE DES ISOFLAVONES 111
2.1. OBJECTIF ET DEMARCHE EXPERIMENTALE 111
2.2. COMPORTEMENT CINETIQUE 111

2.3. PREMIERE APPROCHE PAR PLANIFICATION EXPERIMENTALE 112
2.4. INFLUENCE DES PARAMETRES SUR LA PERTE EN MATIERE PROTEIQUE 115
2.5. EXTRACTION MULTI-ETAGEE EN REACTEUR DE 2 LITRES ET SOXHLET 117
2.6. MISE A L'ECHELLE INDUSTRIELLE 119
2.6.1. Contraintes et adaptation au système Tournaire à fond filtrant 119
2.6.2. Suivi de l'extraction par dosage de l'extrait 122
2.6.3. Teneur résiduelle en isoflavones 122
2.7. SYNTHESE 124
3. ETUDE DE L'EXTRACTION DES ISOFLAVONES PAR EAU PRESSURISEE SUR SYSTEME ASE 125
3.1. OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE 125
3.2. PLANIFICATION EXPERIMENTALE 125
3.3. SURFACE DE REPONSE DES MODELES 127
3.4. INFLUENCE SUR LA MATRICE PROTEIQUE ET IMPACT SUR L'EXTRACTION DES ISOFLAVONES 128
3.5. DEGRADATION DES ISOFLAVONES CONJUGUEES 130
3.6. SYNTHESE 131
4. ESSAI D'EXTRACTION SUR CO_2 SUPERCRITIQUE 133
4.1. OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE 133
4.2. RENDEMENT D'EXTRACTION SELON LE TYPE D'ISOFLAVONES 134
4.3. SYNTHESE 135
5. CONCLUSION DE CHAPITRE 137
5.1. INFLUENCE DU PROFIL EN ISOFLAVONES ET NOTION DE POLARITE 137
5.2. INFLUENCE DE LA TENEUR EN PROTEINES : LIMITE A L'EXTRACTION D'ISOLAT PROTEIQUE SUR LES SYSTEMES PRESSURISES 137
5.3. BILAN INDUSTRIEL 138

CHAPITRE IV. ISOLEMENT DES PROTEINES DE RIZ ET DIMINUTION DE LEUR POIDS MOLECULAIRE PAR HYDROLYSES ENZYMATIQUES 140

1. INTRODUCTION 142
2. ISOLEMENT PREALABLE DES PROTEINES DE RIZ PAR HYDROLYSES ENZYMATIQUES 142
2.1. CARACTERISATION DES MATIERES PREMIERES CHOISIES 142
2.1.1. Teneurs globales en macronutriments et minéraux 142
2.1.2. Teneurs en différents glucides 144
2.2. HYDROLYSE DES FRACTIONS POLYSACCHARIDIQUES POUR ISOLER LES PROTEINES DE RIZ A PETITE ECHELLE 145
2.2.1. Hydrolyse de l'amidon sur farine de riz 145
2.2.2. Hydrolyse des hémicelluloses et de l'amidon sur concentrés protéiques de riz 149
2.2.3. Mise à l'échelle sur 500 mL en réacteur agité 153
2.3. CONCENTRATION DES PROTEINES DE SON DE RIZ PAR LEUR SOLUBILISATION A LA PROTEASE 154
3. PRODUCTION ET CARACTERISATION D'HYDROLYSATS A PARTIR DU CONCENTRE AI-S76 ET DE L'ISOLAT PROTEIQUE DE RIZ AI-R90 156

3.1. SOLUBILITE INITIALE DES PROTEINES ISSUES DES MATIERES PREMIERES DE RIZ COMPAREE A CELLE DES PROTEINES DE SOJA 156
3.2. SUIVI DE LA SOLUBILISATION DES PROTEINES DE RIZ DURANT L'HYDROLYSE PAR PROTEASE A PARTIR DE AI-S76 ET AI-R90 157
3.3. SUIVI DU DEGRE D'HYDROLYSE LORS DES TRAITEMENTS ENZYMATIQUES 159
3.4. ETUDE DES PROFILS DE POIDS MOLECULAIRE DES HYDROLYSATS PROTEIQUES PAR HP-SEC 160
3.4.1. Problématique de la solubilité de l'échantillon : mise au point sur soja et riz 160
3.4.2. Profil de poids moléculaire des deux matières premières concentrées de riz 161
3.4.3. Suivi des hydrolyses de protéines riz 162
3.4.4. Elimination des protéines de haut poids moléculaire par séparation liquide/solide 165
3.5. PROFIL DE TAILLE PAR ELECTROPHORESE SDS-PAGE 167
4. CONCLUSION 170

CHAPITRE V. RETENTION DES ISOFLAVONES SUR RESINE CHROMATOGRAPHIQUE A PARTIR D'HYDROLYSATS PROTEIQUES DE SOJA 172

1. INTRODUCTION 174
2. PRODUCTION ET CARACTERISATION D'UN HYDROLYSAT PROTEIQUE DE SOJA 175
2.1. SUIVI DE LA SOLUBILISATION DES PROTEINES APRES HYDOLYSE PAR ENDOPROTEASE 175
2.2. SOLUBILITE DE L'HYDROLYSAT POUSSE 175
2.3. SUIVI DU DEGRE D'HYDROLYSE ET PROFIL DE POIDS MOLECULAIRE 176
2.4. PROFIL DE POIDS MOLECULAIRE : INFLUENCE DE L'HYDROLYSE 177
3. RETENTION DES ISOFLAVONES A PARTIR D'HYDROLYSATS DE PROTEINE DE SOJA EN MODE STATIQUE 179
3.1. INFLUENCE DE LA NATURE DE L'HYDROLYSE SUR LA CAPACITE DE RETENTION ET LE BILAN DE RECUPERATION DANS LES FRACTIONS 179
3.2. COMPARAISON D'EFFICACITE ENTRE DIFFERENTES RESINES 181
3.3. INFLUENCE DU PH SUR RESINE ADSORBANTE ET ANIONIQUE 182
3.4. INFLUENCE DU VOLUME TRAITE SUR LA CAPACITE D'ADSORPTION 184
4. MECANISME DE RETENTION DES ISOFLAVONES SUR RESINE ADSORBANTE XAD7HP 184
4.1.1. Suivi cinétique des formes détectées d'isoflavones 184
4.1.2. Description de la diffusion 185
4.1.3. Description de la réaction d'adsorption 187
4.1.4. Isotherme d'adsorption 189
5. FRACTIONNEMENT DES ISOFLAVONES ET DES PROTEINES DE SOJA SUR COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE 190
5.1. INFLUENCE DU DEBIT 190
5.2. INFLUENCE DU CHOIX DE LA RESINE SUR LA RECUPERATION DE LA FRACTION PROTEIQUE ET LA PURETE EN ISOFLAVONES DU FILTRAT OBTENU 191
5.3. COMPORTEMENT GENERAL DU SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE 192
5.4. CHOIX DU DEBIT ET DU VOLUME TRAITE 196
5.5. ETUDE DE L'ADSORPTION ET DE LA DESORPTION DES DIFFERENTES FORMES D'ISOFLAVONES SUR RESINE ADSORBANTE XAD7HP 197

5.5.1. Adsorption des isoflavones 197
5.5.2. Effet d'un traitement à la β-glucosidase 200
5.5.3. Comportement des différentes formes durant l'élution 201
5.6. INFLUENCE DU CONTRE-ION SUR LA RETENTION DES ISOFLAVONES SUR RESINE ANIONIQUE 203
6. PASSAGE A ECHELLE PILOTE INDUSTRIEL 205
6.1. ESSAIS PREALABLES DE REPETABILITE A PETITE ECHELLE ET BILAN PAR FRACTION SUR RESINE ADSORBANTE 205
6.2. ESSAIS PREALABLE SUR 8 L DE RESINE XAD7HP ET FPA91CL 206
6.3. ESSAIS SUR 100 L DE RESINE XAD7HP 207
6.4. CARACTERISATION DU PRODUIT FINAL 210
6.4.1. Teneur en isoflavones et influence sur la couleur 210
6.4.2. Profil de poids moléculaire 211
7. CONCLUSION 213

CONCLUSION GENERALE 216

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 222

RESUME 233

ABSTRACT 234

Liste des tableaux

Tableau I-1. Teneur en protéines des principales légumineuses cultivées et des plantes de grandes cultures (Juliano 1994; Godon 1996) 24
Tableau I-2. Les principales protéines du soja adapté de (Werner J. Bauer, Raphaël Badoud et al. 2010; Wang, Qin et al. 2014)..... 28
Tableau I-3. Proportion des différentes familles de protéines dans le grain de riz 28
Tableau I-4.Méthodes d'extraction par solvants présentées dans la littérature pour l'isolement des protéines de riz et résultats obtenus 36
Tableau I-5. Méthodes d'extraction thermo-mécaniques présentées dans la littérature pour l'isolement des protéines de riz et résultats obtenus..... 37
Tableau I-6. Méthodes d'extraction par hydrolyses présentées dans la littérature pour l'isolement des protéines de riz et résultats obtenus 38
Tableau I-7. Propriétés des protéines de soja pour l'alimentation (Kinsella 1979) 39
Tableau I-8. Les effets cliniques des isoflavones connus chez l'Homme 43
Tableau I-9. Teneurs totales en isoflavones de soja selon le type de produits et le solvant d'extraction utilisé 45
Tableau I-10. Mélanges hydroalcooliques utilisés pour les procédés d'extraction des isoflavones..... 51
Tableau I-11. Extraction des isoflavones par CO_2 supercritique en présence de cosolvants..... 53
Tableau I-12. Les étapes du processus d'adsorption (Montgomery 1985)..... 55
Tableau I-13. Les principaux modèles d'adsorption utilisés dans les procédés agroalimentaires (Masel 1996; Kammerer, Carle et al. 2010) 58
Tableau I-14. Les modèles de diffusion durant le processus d'adsorption..... 59
Tableau I-15. Les modèles cinétiques décrivant la réaction d'adsorption..... 59
Tableau I-16.Caractéristiques des adsorbants utilisés dans la littérature pour la fixation des isoflavones et le type de solvant utilisé pour l'adsorption et la désorption 62
Tableau I-17. Profil en acides aminés essentiels recommandés par la FAO pour l'alimentation infantile (mg/g de protéines)..... 63
Tableau I-18. Les facteurs antinutritionnels thermolabiles et résistants aux traitements thermiques (Liener 1994) 64
Tableau I-19. Méthodes utilisées afin de diminuer l'allergenicité des protéines de soja..... 67
Tableau I-20. Effets recherchés des protéases sur les propriétés fonctionnelles d'un aliment (Tavano 2013)..... 70
Tableau II-1. Les facteurs de conversion pour l'étalonnage..... 83
Tableau II-2. Les facteurs de conversion pour exprimer les teneurs en isoflavones équivalent aglycones 84
Tableau II-3. Les résines adsorbantes utilisées pour la rétention des isoflavones 89
Tableau II-4. Les résines échangeuses d'ions utilisées pour la rétention des isoflavones..... 89
Tableau II-5. Linéarisation des modèles utilisés et paramètres associés..... 91
Tableau II-6. Détermination des grandeurs de poids moléculaires par le logiciel..... 95
Tableau II-7. Enzymes utilisées pour l'hydrolyse des polyssacharides sur farine et concentrés protéiques de riz et par protéase sur les matières protéiques de riz et de soja 98
Tableau III-1. Caractérisation des matières premières de soja..... 104

Tableau III-2. Dosages des isoflavones effectués sur différentes matières protéiques de soja par la méthode d'extraction Murphy (MeCN 53%, eau acidifiée) suivie d'une étape d'hydrolyse acide 105
Tableau III-3. Effet de la durée d'extraction, de la prise d'essai et du traitement de l'extrait sur la teneur en isoflavones 106
Tableau III-4. Effet du traitement de l'échantillon sur le dosage des isoflavones 107
Tableau III-5. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) des différentes isoflavones dans un extrait d'isolat protéique de soja 107
Tableau III-6. Teneurs des différentes isoflavones en µg/g sur base sèche (µg/g) et en équivalents aglycones dans les trois types de matières premières disponibles 110
Tableau III-7. Les différents niveaux des variables choisies pour le plan de Doehlert avec les réponses prédites et mesurées 113
Tableau III-8. Coefficients des modèles quadratiques du plan d'expériences et significativité 114
Tableau III-9. Rendement en matière sèche lors de l'extraction, valeurs mesurées et prédites par le modèle 115
Tableau III-10. Coefficients du modèle quadratique du plan d'expériences et significativité pour une réponse correspondant au rendement de matière sèche extraite 116
Tableau III-11. Bilan de récupération en isoflavones et matière sèche dans les résidus et les extraits éthanoliques 118
Tableau III-12. Teneur résiduelle en isoflavones après un traitement par Soxhlet en fonction du nombre de cycles effectués 118
Tableau III-13. Valeurs prédites et mesurées des rendements d'extraction en isoflavones pour les différents niveaux de variables du plan d'expériences de Doehlert à partir d'isolat protéique et de farine de soja 126
Tableau III-14. Coefficients des modèles quadratiques du plan d'expérience et significativité 126
Tableau III-15. Vérification des rendements obtenus sur conditions optimales 128
Tableau III-16. Coefficients des modèles quadratiques du plan d'expériences et significativité pour le rendement en matière sèche récupérée dans le surnageant 129
Tableau III-17. Taux d'extraction des isoflavones par CO_2-SC sur les trois types de matières avec deux conditions 134
Tableau III-18. Teneur en isoflavones dans les trois matières premières testées pour l'extraction par CO_2-SC 135
Tableau III-19. Solubilité différentielle des isoflavones de soja indicatrice de la polarité des constituants (Jankowiak, Méndez Sevillano et al. 2015) 135
Tableau IV-1. Composition globale des matières premières de riz utilisées 143
Tableau IV-2. Rapports des teneurs en glucides constitutifs des hémicelluloses dans les produits de riz144
Tableau IV-3. Traitements enzymatiques par amylases et mélanges enzymatiques de type cellulolytiques 146
Tableau IV-4. Hydrolyse séquencée par amylases effectuée à 70°C puis à 50°C 147
Tableau IV-5. Effet du pH sur l'isolement des protéines par traitement par amylases 148
Tableau IV-6. Hydrolyse séquencée par amylases résistantes à des températures supérieures à 70°C .. 148
Tableau IV-7. Isolement des protéines par hydrolyses enzymatiques par amylase et enzymes cellulolytiques sur concentré protéique de riz à 63 % de protéine 150

Tableau IV-8. Isolement des protéines de riz à partir de concentré protéique R79 de riz par hydrolyse enzymatique 152
Tableau IV-9. Isolement des protéines sur une échelle intermédiaire de 50 g de produit dans 500 mL d'eau en réacteur agité 153
Tableau IV-10. Bilan de récupération en protéines et matière sèche dans le filtrat et le surnageant de centrifugation avec ou sans traitement à l'endoprotéase 155
Tableau V-1. Influence de la nature de l'hydrolyse sur la capacité d'adsorption avec trois volumes équivalents de résine mis en œuvre sur XAD7HP 179
Tableau V-2. Récupération de la matière séchée totale et des isoflavones dans les trois fractions 180
Tableau V-3. Efficacité des résines après mise en contact sur 14h de 8BV de solution protéique de soja issue de 2h et 14h d'hydrolyse par protéase sur isolat protéiques 181
Tableau V-4. Pureté du filtrat obtenu avec 50 BV et après 14h de fixation selon la résine utilisée 182
Tableau V-5. Teneur en isoflavones dans les filtrats en fonction du pH imposé avec un volume équivalent de 3BV 183
Tableau V-6. Teneur en isoflavones obtenu dans les filtrats avec pH 4,5 imposé et selon deux ratios volume/résine 183
Tableau V-7. Corrélation de la cinétique d'adsorption des isoflavones sur XAD7HP avec les modèles décrivant la diffusion 187
Tableau V-8. Corrélation des cinétiques avec les modèles décrivant la réaction d'adsorption 189
Tableau V-9. Influence du choix de la résine sur le taux d'isoflavones récupérées dans le filtrat après 8BV equivalent passé 192
Tableau V-10. Bilan de l'adsorption en isoflavones et de la récupération du filtrat lors de deux passages successifs 194
Tableau V-11. Pureté en isoflavones dans le filtrat en fonction du contre ion et du volume chargé à 2BV/h 204
Tableau V-12. Bilan des quatre passages successifs réalisés sur lit de résine XAD7HP 206
Tableau V-13. Bilan de récupération de matière sèche et pureté en isoflavones après passage de 64 L d'hydrolysat protéique de soja sur une colonne de 8 L de résine 207
Tableau V-14. Bilan de l'essai sur 100L de lit fixe de résine avec un débit de 1BV/h et un passage de 4 BV d'hydrolysat partiel obtenu avec 2 h de traitement à l'endoprotéase 208
Tableau V-15. Bilan de l'essai sur 100L de lit fixe de résine avec un débit de 2BV/h et un hydrolysat poussé de 8h 209

Liste des figures

Figure I-1. Présentation schématique des quatre niveaux dimensionnels structurant les protéine (source internet Mariana Ruiz Villarreal, LadyofHats) 25
Figure I-2. Représentations tridimensionnelles de la glycinine (globuline 11S du soja) en hexamère (Adachi, Kanamori et al. 2003) à gauche et de la β-conglycinine globuline 7S trimérique à droite (Maruyama, Adachi et al. 2001) 27
Figure I-3. Diagramme schématique du grain de riz (gauche) et des corps protéiques ou granule d'amidon dans la couche subaleurone de l'albumen d'un grain de riz (Juliano 1994) 29
Figure I-4. Représentation schématique des produits de soja de traditions asiatiques et leurs voies d'obtention simplifiées 31
Figure I-5. Représentation des voies de production des concentrés et isolats protéiques de soja ainsi que les composés résiduels éliminés. Encadré en noir la matière première, en rouge les produits les plus courants, en bleu les intermédiaires et en pointillés les coproduits 33
Figure I-6. Représentation schématique des procédés conventionnels de transformation du riz pour l'obtention de farine et de sirop de glucose ainsi que les résidus produits lors de ces transformations. Encadré en noir la matière première, en rouge les produits les plus courants, en bleu les intermédiaires et en pointillés les coproduits 35
Figure I-7. Structure di-phénolique des isoflavones de soja et leur dérivés glycosidiques les plus connus 42
Figure I-8. Schéma des interactions possibles entre polyphénols et protéines (Asano, Shinagawa et al. 1982) (Le Bourvellec, Renard 2012) 47
Figure I-9. Influence du pH sur l'extraction des isoflavones et des protéines de soja (Lopes Barbosa, Lajolo et al. 2006). (▲) isoflavones et (●) protéines 48
Figure I-10. Représentation schématique du processus d'extraction solide-liquide de composés naturels au sein d'une particule poreuse 49
Figure I-11. Diagramme de phase d'un corps pur et zone supercritique 52
Figure I-12. Diffusion du soluté au travers d'une bille à structure poreuse (proposition de schéma illustrant les premières étapes du processus d'adsorption 55
Figure I-13. Représentation des quatre formes d'isothermes de Giles (Limousin, Gaudet et al. 2007) 58
Figure I-14. Les grandes étapes de la production d'extraits purifiés d'isoflavones de soja (Giles, Smith et al. 1974; Harjo, Wibowo et al. 2006) 60
Figure I-15 69
Figure I-16. La réaction d'hydrolyse par protéase sur un tripeptide 69
Figure II-1. Les produits commerciaux de riz utilisés 76
Figure II-2. Isolat et concentré protéique de soja utilisés dans ces travaux 76
Figure II-3. Gradient utilisé pour la séparation des sucres sur colonne anionique Carbopac PA1 79
Figure II-4. Gradient d'élution utilisé pour la colonne Synergi Max RP-C18 81
Figure II-5. Gradient d'élution utilisé pour la colonne Kinetex XB-C18 81
Figure II-6.Exemple de chromatogramme obtenu à partir d'un isolat protéique avec les 12 formes identifiées sur la colonne Kinetex XB-C18 81
Figure II-7. Identification des formes conjuguées malonyles et acétyles par traitement thermique sur isolat protéique de soja. 82

Figure II-8. Systèmes utilisés pour l'étude de l'extraction à l'éthanol par planification expérimentale et extraction multi-étagée. A gauche le système pour la planification expérimentale, au milieu le système de 2 L pour l'extraction multi-étagée et à droite le système multi-étagée de type Soxhlet 85
Figure II-9. Extracteur à fond filtrant Tournaire 87
Figure II-10. Cellule d'extraction ASE en acier inoxydable 88
Figure II-11. Extraits obtenus pour chaque point du plan d'expérience exemple de la farine de soja..... 88
Figure II-12. Système chromatographique utilisé pour l'étude de la rétention des isoflavones sur résine d'adsorption 92
Figure III-1.Exemple de chromatogramme obtenu à partir d'un isolat protéique avec les 12 formes d'isoflavones identifiées..... 105
Figure III-2. Les voies connues de dégradations des formes conjuguées d'isoflavones (Rostagno, Villares et al. 2009)..... 108
Figure III-3. Cinétique d'extraction des isoflavones au cours d'une extraction à l'éthanol à 80 % pour une température de 50 °C..... 111
Figure III-4. Plan d'expériences de Doehlert pour deux facteurs..... 112
Figure III-5. Surface de réponse des modèles quadratiques représentant le rendement en extraction en fonction de la température de l'extraction et de la teneur en éthanol..... 114
Figure III-6. Surface de réponse des modèles quadratiques concernant la perte en matière protéique lors de l'extraction des isoflavones par éthanol 116
Figure III-7. Schéma du procédé d'extraction multi-étagée..... 117
Figure III-8. Schéma simplifié de l'extraction multi-étagée par Tournaire à fond filtrant 120
Figure III-9. Plateforme de l'extracteur Tournaire à fond filtrant et de l'unité de distillation associée ... 120
Figure III-10. Isolat protéique appauvri en isoflavones récupéré en fin d'extraction éthanolique multi-étagée..... 121
Figure III-11. Exemple d'extrait éthanolique issu de l'extraction après concentration par distillation 121
Figure III-12. Quantité cumulée d'isoflavones extraites après chaque étage d'extraction sur Tournaire à fond filtrant. IFT pour isoflavones totales..... 122
Figure III-13. Teneurs résiduelles en isoflavones totales en fonction du nombre d'étage d'extraction .. 123
Figure III-14. Suivi de la teneur résiduelle des différentes formes d'isoflavones dans l'isolat protéique en fonction du nombre d'étage d'extraction sur la partie superficielle de la matière..... 123
Figure III-15. Surfaces de réponse du modèle d'extraction représentant l'influence du ratio solide-liquide, de la température et de la durée statique sur les rendements d'extraction des isoflavones à partir de farine de soja en haut et à partir d'isolat en bas. 127
Figure III-16. Surface de réponse du modèle d'extraction représentant l'influence du ratio solide-liquide, de la température et de la durée statique d'extraction..... 129
Figure III-17. Influence de la température sur solubilité de la matière première et rendement en isoflavones associés pour un ratio solide/liquide de 4 % et une durée de 14 min..... 130
Figure III-18. Influence de la température sur la structure des isoflavones 130
Figure III-19. Photo du pilote utilisé à l'Atelier des fluides supercritiques de Nyons 133
Figure III-20. Cellule d'extraction utilisée pour l'extraction en CO_2-SC..... 134
Figure III-21. Représentation des espèces malonyl-génistine et génistéine à pH 7,4..... 138
Figure IV-1. Présentation des matières de riz utilisées 143

Figure IV-2. Teneurs en glucides sur matière sèche déterminées par HPIC après hydrolyse acide 144
Figure IV-3. Dénaturation des protéines de riz par classe de protéines (Ju, Hettiarachchy et al. 2001) .. 147
Figure IV-4. Cinétique de l'isolement des protéines par hydrolyses amylases et enzymes cellulolytiques 151
Figure IV-5. Schéma représentatif du procédé mis en œuvre pour la solubilisation des protéines de son de riz 154
Figure IV-6. Solubilité des protéines de riz et de soja en fonction du pH 156
Figure IV-7. Solubilité des protéines de riz en fonction du pH 157
Figure IV-8. Solubilisation des protéines à partir de l'hydrolyse par protéases sur la fraction protéique issue du concentré AI-S76. La flèche indique l'ajout de Flavourzyme 159
Figure IV-9. Solubilisation des protéines à partir de l'hydrolyse par protéases sur isolat protéique issu du de l'isolat AI-R90. La flèche indique l'ajout de Flavourzyme 159
Figure IV-10. Suivi du degré d'hydrolyse des protéines de riz issues des concentrés protéiques 160
Figure IV-11. Chromatogramme comparatif entre la solubilisation effectuée au tampon phosphate avec ou sans ajout de SDS à partir de l'isolat protéique de soja et concentrés protéiques de riz. Bleu sans SDS et noir avec SDS 161
Figure IV-12.Profil de poids moléculaire des protéines issus des matières protéiques de soja et de riz. CPR et IPS pour concentrés protéiques de riz et isolat protéique de soja respectivement 162
Figure IV-13. Chromatogrammes obtenus lors des analyses de profil de poids moléculaire en HP-SEC des hydrolysats protéiques produits à partir du concentré S63 par solubilisation au SDS. En noir la solution à t0, hydrolyse après 2h en bleu, 4h en rouge, 8h en vert. Le trait bleu situe la sortie du standard le plus petit la vitamine B12 à 1355 Da. 163
Figure IV-14. Chromatogrammes obtenus lors des analyses de profil de poids moléculaire en HP-SEC des hydrolysats protéiques produits à partir du concentré R79 par solubilisation au SDS. En noir la solution à t0, hydrolyse après 2h en bleu, 4h en vert, 8h en rouge 163
Figure IV-15. Evolution du profil de poids moléculaire par hydrolyse enzymatique sur concentré protéique de riz enrichie AI-S76 à partir de la matière première S63 164
Figure IV-16. Evolution du profil de poids moléculaire par hydrolyse enzymatique sur isolat protéique de riz AI-R90 à partir de la matière première concentré R79 164
Figure IV-17. Présentation du schéma du procédé de production d'hydrolysat protéique de riz avec une étape de séparation liquide/solide. En pointillé rouge l'étape ajoutée avant analyse HP-SEC 166
Figure IV-18. Profil de poids moléculaire des hydrolysats après 8 h de traitement avec ou sans étape de séparation solide/liquide. L'hydrolysat global est solubilisé par tampon phosphate avec ou sans SDS .. 166
Figure IV-19. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE représentant les poids moléculaires des protéines issues des matières protéines. R pour conditions réductrices et NR pour non réductrice à partir des concentrés protéiques de riz 167
Figure IV-20. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE après migration des protéines d'hydrolysats protéiques de riz à partir des matières enrichies en protéines AI-S76 et AI-R90. Solubilisation réalisée en condition non réductrice excepté pour 8hR. La distorsion du gel est prise en compte dans la mesure du front de migration par le logiciel Gel Analyser 169
Figure V-1. Solubilisation des protéines de soja par hydrolyse à l'endoprotéase 175

Figure V-2. Influence de l'hydrolyse et du pH sur la solubilité de la matière protéique de soja. A gauche produit non hydrolysé à pH 8, les trois autres sont des hydrolysats de protéine de soja conditionnés sous trois pH 176
Figure V-3. Suivi de l'hydrolyse des protéines de soja par Promod 278MDP 177
Figure V-4. Chromatogrammes obtenus lors des analyses de profil de poids moléculaire en HP-SEC des hydrolysats protéiques produits à partir d'isolat protéique de soja, par solubilisation au tampon phosphate SDS 2%. En noir la solution à t0, hydrolyse après 2h en bleu, 4h en marron, 6h en rose. Le trait bleu situe la sortie du standard de plus faible poids moléculaire la vitamine B12 à 1355 Da 177
Figure V-5. Evolution du profil de poids moléculaire par hydrolyse enzymatique sur isolat protéique de soja. SPI O pour la matière initiale ; t0 pour l'ajout d'enzyme suivi d'une désactivation de 15 min à 85 °C ; hydrolyses effectuées de 2 à 8 h 178
Figure V-6. Influence du volume d'hydrolysat traité sur la capacité d'adsorption des résines d'adsorption et anioniques 184
Figure V-7. Cinétique d'adsorption des isoflavones sur XAD7HP pour un volume traité de 8BV 185
Figure V-8. Corrélation entre les points expérimentaux et le modèle Weber-Morris de diffusion intra-particulaire sur XAD7HP 186
Figure V-9. Diffusion intra-particulaire de Weber-Morris pour l'adsorption des isoflavones d'après (Shi, Kong et al. 2013) 186
Figure V-10. Corrélation de la cinétique d'adsorption des isoflavones sur XAD7HP avec le modèle de diffusion Boyd sur XAD7HP 187
Figure V-11. Corrélation de la cinétique d'adsorption des isoflavones sur XAD7HP avec les modèles cinétiques de réaction d'adsorption couramment utilisés 188
Figure V-12. Isotherme d'adsorption des isoflavones 189
Figure V-13. Corrélation avec le modèle Freundlich. 189
Figure V-14. Corrélation avec le modèle Langmuir 189
Figure V-15. Influence du débit imposé au système sur l'adsorption des isoflavones de soja dans un système fermé à partir d'un hydrolysat de protéine de soja 191
Figure V-16. Suivi de la matière sèche en sortie de colonne sur lit fixe de 200 mL en fonction du type de résine choisi à partir d'un hydrolysat content 45 g/L de matière sèche 191
Figure V-17. Courbe de percée représentant la concentration en isoflavones et matière sèche sur les concentrations initiales respectives durant le passage d'hydrolysat protéique de soja au travers de résine adsorbante XAD7HP avec un débit de 2BV/h 193
Figure V-18. Courbe de percée issue d'un passage de 25BV d'hydrolysat protéique de soja avec un débit de 5BV/h et une élution effectuée à 1BV/h 195
Figure V-19. Influence du débit sur la concentration en isoflavones dans le filtrat 196
Figure V-20. Influence de la teneur en isoflavones sur la capacité d'adsorption par dilution de l'hydrolysat. Les lignes en pointillés représentent la droite à l'origine 196
Figure V-21. Influence du volume traité sur la teneur en isoflavones résiduelle dans le filtrat pour un débit fixé à 2BV/h 197
Figure V-22. Suivi des formes détectées d'isoflavones dans le filtrat en sortie de colonne en fonction du débit imposé sur résine XAD7HP 198

Figure V-23. Courbes de percée de chaque forme d'isoflavones détectée en fonction du débit imposé sur résine XAD7HP 199
Figure V-24. Courbe de percée des formes d'isoflavones en sortie de colonne à partir d'un hydrolysat dilué à 25g/L 200
Figure V-25. Effet de la β-glucosidase sur le profil de concentration de la génistéine et de ses dérivés dans un hydrolysat protéique de soja préalablement obtenu par action d'une peptidase 201
Figure V-26 Courbe de percée lors de l'étape de désorption des isoflavones après passage de 14BV d'hydrolysat à 45 g/L et élution effectuée par éthanol 70% 202
Figure V-27. Concentration en isoflavones lors de l'étape de désorption des isoflavones après passage de 14BV d'hydrolysat à 45 g/L et élution effectuée par éthanol 70% 202
Figure V-28. Suivi des formes détectées d'isoflavones dans le filtrat en sortie de colonne sur résine FPA91Cl 203
Figure V-29. Evolution du pH en sortie de colonne en selon les différents contre ion testés 204
Figure V-30. Suivi de la teneur en matière sèche et en isoflavone en sortie de colonne 209
Figure V-31. Photos de l'isolat protéique de soja et de l'hydrolysat appauvri en isoflavones produit sur une échelle de 100L de résine. A gauche le produit final et à droite l'isolat protéique 210
Figure V-32. Profils de poids moléculaires de l'hydrolysat final après mise à échelle industrielle en fonction de la méthode de solubilisation et comparaison avec la matière première 211
Figure V-33. Analyse du profil de poids moléculaire par électrophorèse SDS-PAGE en condition réductrice (R) et non réductrice (NR à partir d'isolat protéique de soja (IPS) et le produit final hydrolysé et traité sur colonne de résine (HPS) 212
Figure V-34. Electrophorèse référence présentée dans la littérature identifiant les allergènes du soja (Wang, Qin et al. 2014) 212

Liste des abréviations

CIFRE	Conventions Industrielles de Formation par la Recherche
AAP	American Academy of Pediatrics
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOAC	Association Of Analytical Communities
ASE	Accelerate Solvent Extraction
BV	Bed Volume
CPR	Concentré Protéique de Riz
CPS	Concentré Protéique de Soja
DH	Degré d'Hydrolyse
DIASS	Digestible Indispensable Amino Acid Score
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DVB	Divinylbenzène
EFSA	Autorité européenne de sécurité des aliments
ESPGHAN	European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition
EtOH	Ethanol
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
GPC	Gel Permeation Chromatography
HP	High Pressure
HPIC	High-Pressure Ion Chromatography
HPLC	High-Pressure Liquid Chromatography
HPP	High-Pressure Processing
IF	Isoflavones
IFA	Isoflavones Aglycones
IFT	Isoflavones Totales
IPR	Isolat Protéique de Riz
IPS	Isolat Protéique de Soja
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LAPU	Leucine Aminopeptidase Unit
LCA	Laboratoire de Chimie Agro-industrielle
LD	Limite de Détection
LQ	Limite de Quantification
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Methanol
MM	Matière Minérale
Mn	Nombre Moyen (masse moléculaire)
MPV	Matière Protéique Végétale
MS	Matière Sèche
MS (HPLC)	Mass Spectrometry
Mw	Poids moyen (masse moléculaire)

NH	Non Hydrolysé
PAE	Pousse A l'Eau
PAGE	Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
PDCAAS	Protein. Digestibility Corrected Amino. Acid Score
PEX	Plan d'EXpériences
PLE	Pressurized Liquid Extraction
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PWE	Pressurized Water Extraction
Qté	Quantité
RP	Reverse Phase
RRLC	Rapid Resolution Liquid Chromatography
S/L	Solide/Liquide
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SEC	Size Exclusion Chromatography
UV	Ultraviolet
UV-DAD	Ultraviolet- Diode Array Detector

Introduction générale

Ce manuscrit présente les travaux de thèse réalisés au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle dans le cadre du projet SafeProtein porté par la société Activ'Inside et par l'intermédiaire d'un partenariat CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche). Ce projet vise à développer de nouveaux ingrédients protéiques destinés à l'alimentation du nourrisson souffrant d'allergie aux protéines de lait de vache ou d'intolérance au lactose.

Afin d'atteindre les niveaux énergétiques alimentaires requis dans les préparations infantiles, les isolats protéiques sont incorporés dans les préparations pour l'enfant de la naissance à trois ans. Ils correspondent à la fraction protéique pure à plus de 90 %. De par leurs bonnes qualités nutritionnelles, et afin de répondre aux problèmes d'allergies, les protéines de soja sont incorporées dans les préparations pour nourrissons et sont les seules protéines végétales natives autorisées par la règlementation Européenne (European Food Safety Authority 2014). Des protéines végétales autres que celles du soja sont aussi autorisées à condition qu'elles soient hydrolysées.

Néanmoins, en raison de la présence de phytoestrogènes (isoflavones) dans les isolats protéiques de soja, de nombreuses questions se posent sur la sécurité alimentaire du nourrisson en cas de surexposition envers ces composés. En effet, les isoflavones peuvent entrainer chez l'animal, des troubles du développement neuroendocrinien et ont un rôle dans la prévalence de maladies auto-immunes (Agostoni, Axelsson *et al.* 2006). Pour ces raisons, les autorités sanitaires françaises puis européennes (AFSSA et EFSA) recommandent la diminution de la teneur en isoflavones dans ces préparations (AFSSA 2005; European Food Safety Authority 2014). Il est donc premièrement envisagé de développer un isolat protéique de soja à teneur réduite en isoflavones. D'après ces recommandations, ainsi que des taux d'incorporation dans les produits commerciaux, un seuil résiduel d'isoflavone idéal de 50 ppm est visé (µg/g produit sec).

Les propriétés nutritionnelles des protéines de riz en font une source intéressante, de bonne valeur biologique et contenant les acides aminés essentiels à l'alimentation humaine. Cette céréale n'est pas reconnue comme allergène, au niveau règlementaire, même si certaines populations asiatiques y sont sensibles. Cette phyto-ressource est donc choisie dans le cadre du projet SafeProtein. Cependant, les véritables isolats protéiques de riz sont inexistants sur le marché, ou extrêmement rares, de par la faible accessibilité des protéines, leur nature, et la présence de polyssacharides pariétaux qui freineraient leur purification. Ces travaux de recherches visent donc aussi à l'obtention d'isolats protéiques de riz.

Outre le risque lié à la présence des isoflavones, les protéines de soja sont considérées comme des allergènes. Pour une population sensible telle que les nourrissons, il est envisagé de développer un hydrolysat de protéine de soja hypoallergénique, qui pourra être lui aussi à teneur réduite en isoflavones. Dans la même optique, la production d'hydrolysat protéique de riz est envisagée. L'hydrolyse par l'action d'enzymes protéolytiques permet de réduire l'allergénicité des protéines par la réduction de leur taille, et donc par la dégradation des allergènes. Elle induit aussi de meilleures propriétés nutritionnelles (Tavano 2013).

Ainsi, les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont pour but de développer des procédés industriels pour le développement de quatre produits suivants :

- Un isolat protéique de soja à teneur réduite en isoflavones sous le seuil de 50 µg/g
- Un isolat protéique de riz avec une teneur minimale de 90 % de protéines
- Un hydrolysat de protéines de riz et un hydrolysat de protéine de soja avec un maximum de peptides de très petites tailles, inférieures à 3000 Da

Ces travaux de recherche se situent dans une démarche d'utilisation de procédés adaptés aux nouvelles contraintes environnementales et sanitaires. Ils visent à permettre la compréhension des mécanismes et paramètres de fractionnement menant à la production des ingrédients protéiques de riz et de soja. Le premier axe d'étude, concerne l'extraction poussée des isoflavones de soja par des procédés sans solvants ou qui permettent l'utilisation de solvants adaptés tel que l'éthanol, l'eau subcritique ou le CO_2 supercritique. Afin de pouvoir tendre vers l'élimination des isoflavones, l'extraction doit permettre d'atteindre de hauts rendements d'extraction et des pertes faibles en protéines. De plus, de par la finalité alimentaire qui implique des coûts de commercialisation relativement bas, les procédés mis au point doivent être transférables industriellement de manière rapide et doivent être peu coûteux. Des approches par optimisation et mise à l'échelle industrielle ont été réalisées dès que cela était possible. Le dosage des isoflavones par des méthodes fiables mais rapides a dû faire l'objet d'une étude préalable. Un troisième axe d'étude a porté sur l'isolement des protéines de riz par des méthodes enzymatiques. L'élimination des isoflavones a été étudiée, dans un deuxième axe, par adsorption sur résine chromatographique de l'échelle laboratoire à échelle pilote industriel, l'objectif étant de pouvoir traiter une solution protéique de soja en phase aqueuse, sans l'intervention de solvants, permettant de répondre ainsi aux contraintes précédemment décrites. Le contenu en polyssacharides dans les matières protéiques de riz a été étudié et hydrolysé pour le développement d'un procédé de production d'isolat. Le quatrième axe de recherche est le contrôle du profil de poids moléculaire d'hydrolysats protéiques de soja et de riz qui s'est orienté vers l'hydrolyse par protéases et le suivi de différents indicateurs d'hydrolyse (pH, solubilisation, degré d'hydrolyse, profil de poids moléculaire).

Ainsi, le **Chapitre I** est dédié à l'état de l'art sur la purification des protéines de soja et de riz et la réduction de la teneur en composés indésirables. Il décrit la nature de ces protéines, leurs caractéristiques, les procédés d'obtention et leur utilisation notamment dans l'alimentation infantile. Les allergènes et les méthodes pour diminuer l'allergénicité y sont aussi mentionnés. Les isoflavones font l'objet d'une description synthétique sur leurs caractéristiques générales, leurs méthodes d'analyse, leurs teneurs dans les produits de soja et leurs intéractions potentielles avec les protéines. Les procédés d'extraction et de purification des isoflavones envisagés dans ces travaux sont ensuite décrits.

Le **Chapitre II** est dédié aux matériels et méthodes utilisés pour les travaux présentés dans ce manuscrit.

Le **Chapitre III** présente l'étude de l'extraction solide/liquide des isoflavones par méthode conventionnelle et par fluides pressurisés. La première partie concerne le développement analytique HPLC-UV basé sur une extraction par solvant organique de référence et le dosage des 12 isoflavones dans les matières protéiques de soja pressenties pour ce projet. L'optimisation de l'extraction

éthanolique des isoflavones dans un isolat protéique de soja, par plan d'expériences suivi d'une mise à l'échelle industrielle est ensuite présentée. Une troisième partie décrit l'étude de l'extraction des isoflavones en eau pressurisée, là aussi par une approche d'optimisation qui permet de comprendre l'influence des paramètres et les limites de cette méthode. Enfin, la dernière partie est consacrée aux essais menés en CO_2 supercritique à partir de trois matières différentes.

L'isolement préalable des protéines de riz, à partir de plusieurs matières, et par l'intermédiaire d'hydrolyses enzymatiques, est présenté dans le **Chapitre IV.** Il montre de nouvelles voies de production d'isolats protéiques de riz, et d'hydrolysats peptidiques. Une partie de ce chapitre décrit l'étude de la catalyse enzymatique par protéase par le biais de différentes méthodes de caractérisation de la taille des protéines et leurs degrés d'hydrolyses.

Le **Chapitre V** présente l'étude de la rétention des isoflavones sur résine d'adsorption par l'intermédiaire d'une hydrolyse préalable d'isolat protéique de soja. Une première partie traite de la caractérisation de l'hydrolysat développé par les méthodes précédemment décrites pour les hydrolysats de riz. Ensuite une étude en mode statique décrit l'influence des paramètres sur l'adsorption des isoflavones et l'application de modèles d'adsorption pour décrire les mécanismes inhérents. L'étude du procédé en mode dynamique sur lit fixe de résine est ensuite décrit, de l'échelle laboratoire à industrielle.

Chapitre I. Etat de l'art sur la purification des protéines de soja et de riz : réduction de la teneur en composés indésirables

1. Les protéines végétales

1.1. Historique des extraits protéiques végétaux

Les protéines sont présentes chez tous les végétaux et peuvent avoir des rôles de réserve, de structure ou avoir des fonctions biologiques spécifiques. Qu'ils soient issus de légumineuses ou de céréales, l'intérêt important de ces composés est ancien. Le gluten est le premier composé protéique d'origine végétale mis en évidence par Beccari, qu'il décrivit en 1747 comme « une substance proche de celle que l'on peut extraire des matières animales ». Par la suite, le professeur Braconnot en 1827 identifie un extrait brut de protéine de légumineuse qu'il appela légumine. La mise au point en 1883 de la méthode pour le dosage de l'azote total organique par Kjeldahl, Gunning et Arnold permet le suivi des fractions protéiques lors des études sur extraits végétaux (méthode toujours d'actualité). Osborne et Campbell identifient deux familles de protéines qu'ils nomment legumeline et viciline en 1898. Ils montrent notamment que la principale protéine du soja est une globuline qu'ils appellent la glycinine et déterminent des quantités plus faibles d'autres familles appelées légumeline, phaséoline et protéose (Smith, Circle 1939). Osborne établit une classification par solubilité des protéines végétales, s'appuyant sur l'étude des protéines de blé, classification sur laquelle une très large majorité des études sur les protéines végétales s'appuient jusqu'à aujourd'hui (Osborne 1909). C'est grâce au développement des techniques d'ultracentrifugation que Danielsson parvient à associer les globulines à des coefficients de sédimentation 11S et 7S (Danielsson 1949). Par la suite les connaissances sur les protéines végétales s'améliorent rapidement par l'étude sur leur séquençage, leurs structures et fonctions.

1.2. Les principales sources de protéines végétales

Les légumineuses (pois, fèves, soja et lupin) ou d'autres plantes issues des grandes cultures (tournesol, colza, blé ou riz) ont été très étudiées pour leur contenu protéique. Elles représentent un apport très important en protéines dans l'alimentation humaine. Bien qu'il y ait une forte différence entre les pays industrialisés et les pays dits en développement, elles assurent environ 65 % des apports protéiques mondiaux (Young, Pellett 1994). Le lupin et le soja sont les grains les plus riches en protéines, les céréales comme le blé ou le riz en contiennent peu (Tableau I-1). L'abondance du soja dans l'agriculture mondiale et la qualité de ses protéines en ont fait la principale source de protéines végétales présente sur le marché aujourd'hui, avec de nombreux produits issus des cultures asiatiques traditionnelles, ou de l'industrie moderne agro-alimentaire.

Tableau I-1. Teneur en protéines des principales légumineuses cultivées et des plantes de grandes cultures (Juliano 1994; Godon 1996)

Source végétale	Teneur en protéines (%)
Pois	20,2-34,4
Fève	23,1-38,1
Lentille	23-32
Haricot	26,1
Lupin	30-51
Soja	36,9-40,7
Colza	21-24
Tournesol	15,8-27,1
Blé	9,6
Riz	7,3

1.3. Les structures de protéines

Les protéines sont constituées d'enchainements d'acides aminés et leur structure est communément décrite en quatre niveaux dimensionnels (Figure I-1). Le premier correspond à l'enchainement linéaire, un à un, des acides aminés par liaison covalente (-NH et –CO) qui représente la structure primaire laquelle décrit souvent une périodicité. La structure secondaire résulte de liaisons présentes de manière régulière entre acides aminés plus ou moins éloignés, formant ainsi des structures de replis de type feuillet β ou hélice α. Vient ensuite la structure tertiaire qui décrit le repliement de la chaine entre les différents feuillets ou hélices mettant en jeux des interactions entre acides aminés très éloignés (liaisons de faible énergie ou ponts disulfures) et conférant l'aspect tridimensionnel à la structure souvent appelée sous-unité. La structure quaternaire fait intervenir plusieurs sous-unités formant le polymère, la protéine, par liaisons non covalentes de type hydrogène, ionique ou hydrophobe.

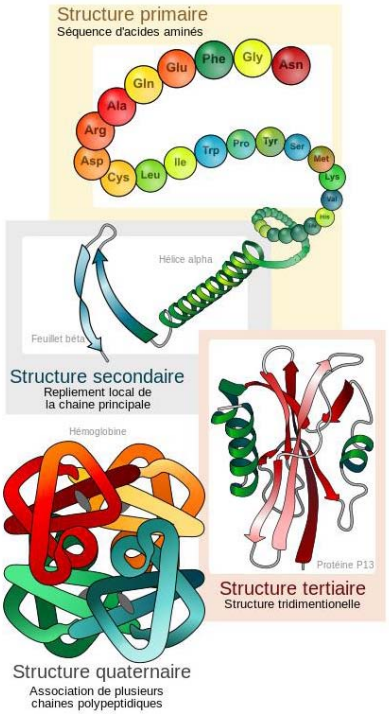


Figure I-1. Présentation schématique des quatre niveaux dimensionnels structurant les protéine (source internet Mariana Ruiz Villarreal, LadyofHats)

1.4. Les familles de protéines végétales

1.4.1. Classification générale

Depuis les travaux d'Osborne, la classification permet de décrire quatre familles de protéines végétales à l'état natif d'après leur solubilité dans différents solvants et à température ambiante :

- Les albumines qui sont les protéines solubles dans l'eau
- Les globulines solubles dans les solutions salines à faible concentration
- Les prolamines solubles dans les solutions alcooliques
- Les glutélines solubles dans un milieu alkalin

Les albumines représentent un large spectre de polypeptides aux fonctions très diverses. On y retrouve toutes les protéines de petites tailles, car plus solubles dans l'eau, comme des enzymes (protéases, glucosidases, lipoxygénases) qui servent à la plante pour la dégradation des réserves ou l'activation de métabolites ainsi que des protéines intervenant dans les mécanismes de défenses de la plante (inhibiteur de protéase, lectines…) et d'autres servant de réserve (albumine 2S, napines).

Les globulines représentent un spectre de polypeptides plus étroit. Comme il est décrit plus haut, les coefficients de sédimentation permettent de les différencier. Parmi les globulines on retrouve ainsi principalement les globulines 11S (anciennement appelées légumines) constituées de six sous-unités ayant chacune une chaine α et une chaine β organisées en anti-prisme trigonal (Plietz, Drescher *et al.*

1987). Les hélices α sont localisées à la périphérie contrairement aux feuillets β formant un cœur hydrophobe à l'intérieur de la protéine. Ce sont des protéines très proches d'une plante à l'autre. Elles sont connues pour être très compactes, leur forme globulaire est une ellipse dont la taille chez le soja est de de 11 nm sur 7,5 nm. A contrario, une hétérogénéité de composition en sous-unité est décrite selon l'origine botanique. Les globulines 7S sont trimériques et sont retrouvées chez les légumineuses principalement.

Les glutélines correspondent au groupe de protéines qui ne peuvent être solubilisées dans les solutions aqueuses neutres, les solutions salines ou alcooliques, leur nom provenant du gluten de blé (Osborne 1909). La classification correspondant aux glutélines est parfois confuse et se heurte aujourd'hui à certaines limites. Par exemple, les protéines de riz glutélines ont montré de fortes similitudes avec les globulines 11S au niveau de leurs séquences ADN respectives, et certains auteurs les présentent ainsi comme des globulines. De plus les gluténines de blé s'apparenteraient plus à des prolamines (Shewry, Halford 2002).

La classification des prolamines est complexe car elle fait appel à plusieurs critères : association, poids moléculaires, composition en acides aminés. Elles ont été remarquées au départ pour leur composition riche en proline et glutamine et servent de stockage d'azote dans les graines, utilisable lors de la germination (Godon 1996). A l'exception de l'avoine et du riz, la majorité des protéines de réserve des grains de céréales sont des prolamines. Leur masse moléculaire est très variable de 10 à 100 kDa (Shewry, Halford 2002).

1.4.2. Vers un changement de classification

Au vu de la difficulté à classer les glutélines, en particulier pour les céréales, il est de plus en plus courant de croiser la classification d'Osborne avec la classification par fonction. Ainsi une classification par fonction peut être utilisée avec trois groupes fonctionnels au lieu de quatre : les protéines de réserves, les protéines dites de structure et métaboliques ainsi que les protéines de protection (Shewry, Halford 2002). Les protéines de réserve présentes dans l'embryon sont des globulines 7S et 11S ou des albumines chez les dicotylédones. Cependant pour certaines céréales les protéines de réserves sont essentiellement des prolamines situées dans l'endosperme. Par homologie et comparaison de séquence il est aussi proposé que les prolamines des *Triticeae* (sous-famille incluant le blé, l'orge et le seigle) soient séparées en trois groupes (« riche en sulfure », « pauvre en sulfure » et « de haut poids moléculaire »). Dans cette classification, la gluténine est classée comme prolamine (Shewry, Halford 2002).

1.4.3. Caractéristiques des protéines de soja : les globulines représentantes majeures

Les protéines de soja ont été et restent très étudiées, souvent citées comme référence pour l'étude des protéines végétales. Près de 80 % des protéines du soja sont classées en globulines 7S (conglycinine) et 11S (glycinine), ce sont principalement des protéines de stockage. Elles sont constituées de sous-unités formant un hexamère et un trimère (Figure I-2).

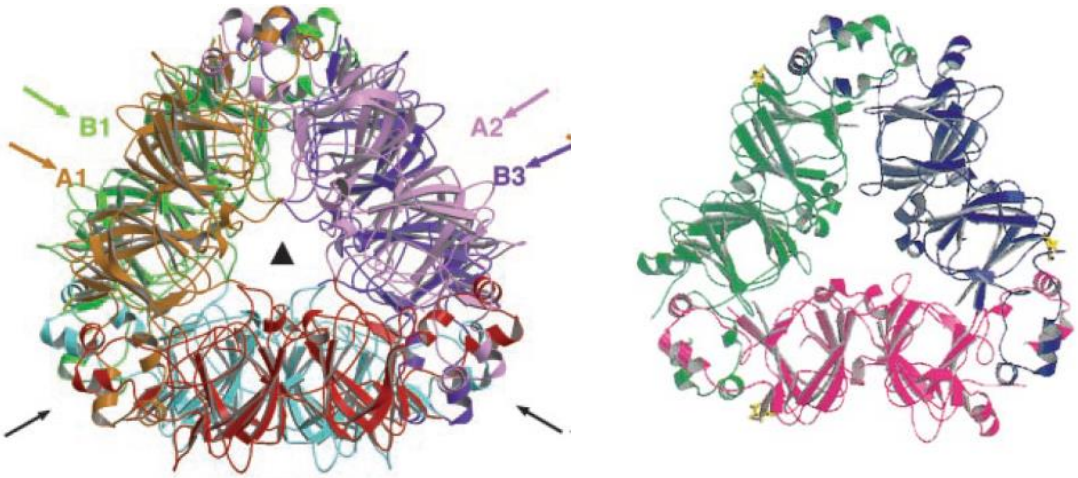


Figure I-2. Représentations tridimensionnelles de la glycinine (globuline 11S du soja) en hexamère (Adachi, Kanamori et al. 2003) à gauche et de la β-conglycinine globuline 7S trimérique à droite (Maruyama, Adachi et al. 2001)

Les poids moléculaires de ces protéines et de leurs sous-unités sont variables (Tableau I-2). Les globulines 11S peuvent être isolées sous forme de complexe de 350 kDa (Nielsen 1985) formé de 6 éléments constitués de chaines acides et basiques liées par un pont disulfure. Deux groupes sont identifiés par comparaison des séquences peptidiques et poids moléculaires : un à 58 kDa relativement riche en méthionine et un autre à 62 et 69 kDa plus pauvre en méthionine. La β-conglycinine est le nom donné à la fraction 7S, contrairement à la glycinine, elle contient des groupes N-glycosyles. Il s'agit d'un trimère (α', α et β ou β' dans certaines variétés) avec un poids moléculaire d'environ 170 kDa. Ces deux types de protéines représentent respectivement 31 à 38 % et 17 à 21 % des protéines totales (Tableau I-2). Une proportion relativement importante de 10 à 20 % correspond à des petites protéines de type globulines. Les protéines de soja sont solubles à pH très acide et au-delà de pH 7. La précipitation est maximale au niveau du pH isoélectrique des protéines soit entre 3,5 et 5 en moyenne. Le point isoélectrique des protéines de soja est variable, lors d'une solubilisation à pH alcalin certaines, plus minoritaires, seront précipitées (cytochrome-c, hemaglutinines). Le pH isoélectrique choisi, afin de précipiter les protéines de soja lors des procédés d'extraction, est proche de 4,5 (Godon 1996).

Tableau I-2. Les principales protéines du soja adapté de (Werner J. Bauer, Raphaël Badoud et al. 2010; Wang, Qin et al. 2014)

	Nom	Fraction des protéines de soja (%)	Masse moléculaire (Da)	Sous-unités	Point isoélectrique
11S	Glycinine	31-38	350000	6	5,7
7S	Conglycinine	17-21	170000	3	4,5
	Hemaglutinines	0,8-1,0	110000	3	8-9
	Lipoxygénases	<1	94000	1	5-6
	Amylases	<1			
2S	Inhibiteurs de trypsine :				
	- Kunitz	2	20100	1	4,55
	- Bowman-Birk	0,8	8000	1	4,3
	- Cytochrome-c	<1	12380	1	10,25
	- Globulines de faible PM	10-20	20000-70000	1	

1.4.4. Caractéristiques des protéines de riz : les glutélines représentantes majeures

Les teneurs des différentes familles de protéines de riz sont présentées, selon la classification d'Osborne, dans le Tableau I-3, les glutélines sont largement les plus représentées.

Tableau I-3. Proportion des différentes familles de protéines dans le grain de riz

Types de protéines	Valeurs
Glutélines	70 %
Globulines	8 %
Albumines	4 %
Prolamines	3 %

La teneur moyenne en protéine totale est de 6,5 % sur base sèche, majoritairement des glutélines dans le grain entier. Malgré leur classement traditionnel différent, elles sont assimilées à des protéines de type globuline 11S que l'on retrouve dans le soja du fait notamment de la forte homologie de séquences ADN (Okita, Hwang *et al.* 1989). Dans le son de riz, constitué de l'embryon et des couches d'aleurone (Figure I-3), ce sont majoritairement des albumines et globulines qui y sont présentes (Cagampang, Cruz *et al.* 1966).

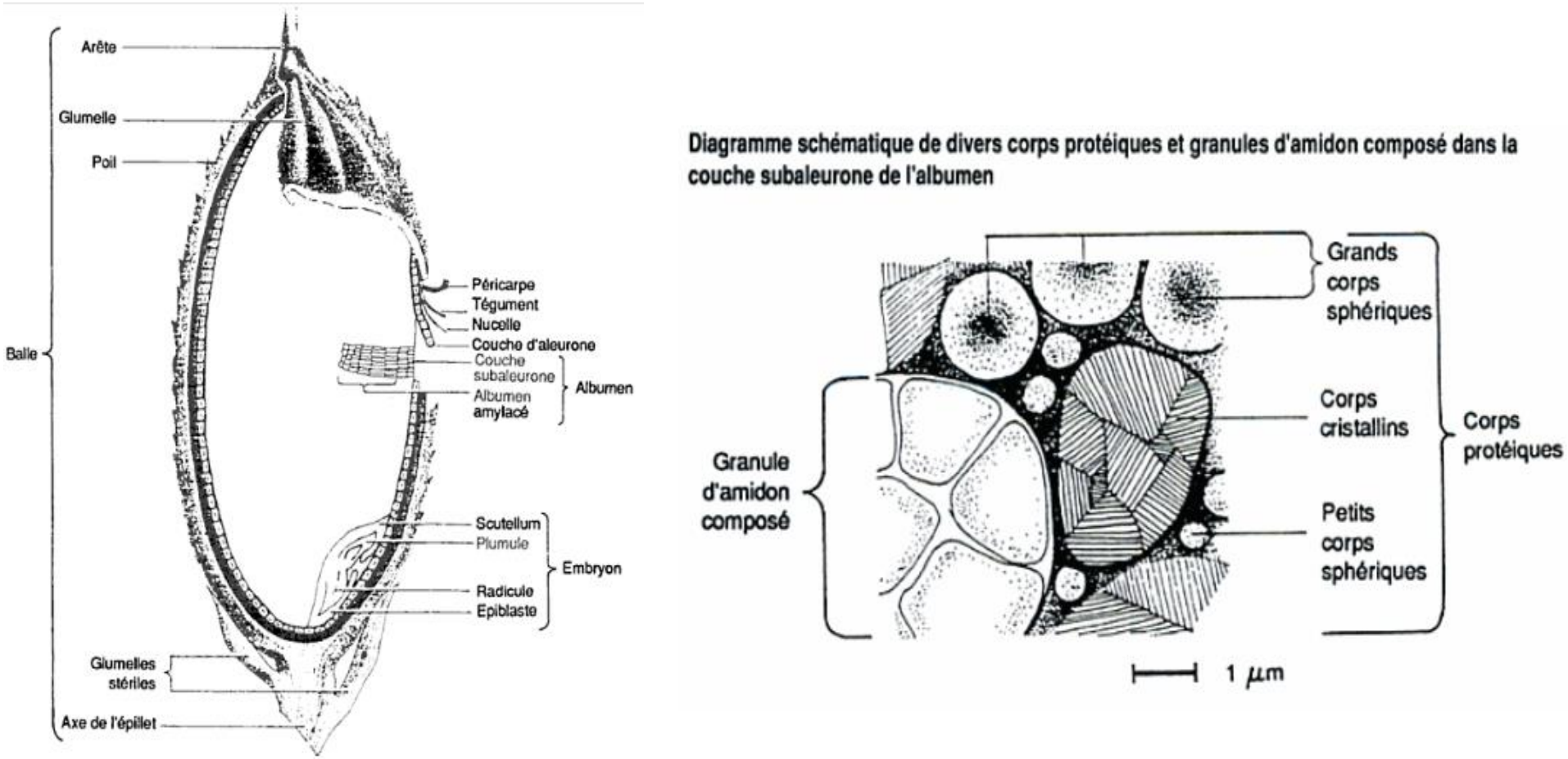


Figure I-3. Diagramme schématique du grain de riz (gauche) et des corps protéiques ou granule d'amidon dans la couche subaleurone de l'albumen d'un grain de riz (Juliano 1994)

Les albumines représentent autour de 66 % des protéines du son de riz et sont localisées dans des corps protéiques distincts dans la couche aleurone, lesquels sont différents des corps protéiques de l'albumen. Ces derniers comprennent deux types de corps protéiques, les corps cristallins riches en glutéline et les corps sphériques riches en prolamines (Figure I-3).

Les poids moléculaires des prolamines de riz sont de l'ordre de 12 à 17 kDa et contiennent une large proportion de glutamine. Les globulines de riz ont montré elles des poids moléculaires de l'ordre de 16 et 25 kDa (Krishnan, White *et al.* 1992) et sont dépourvues de lysine mais riches en acides aminés soufrés. Les glutélines ont des hauts poids moléculaires de 45 à 150 kDa. Deux types de sous-unités apparaissent lors de l'utilisation de solution extractive très basique avec les unités α de 34 à 39 kDa, et les sous-unité β de 21 à 23 kDa révélées par électrophorèse SDS-PAGE (Krishnan, White *et al.* 1992). D'autres polypeptides de 28,5 à 31 et de 20 à 23 kDa sont retrouvés dans le riz brun (grain avec le son).

Les protéines de riz sont connues pour être difficiles à extraire car elles possèdent une forte agrégation, de nombreux ponts disulfures (Hamada 1997), et des liaisons glycosidiques (Wen, Luthe 1985). La présence de complexe associant acide phytique et protéines freinerait aussi leur solubilité, en particulier dans le son de riz qui représente la partie la plus riche en protéines (Hamada 2000)

2. Les produits protéiques et les procédés de production

2.1. Produits protéiques de soja : de la tradition asiatique aux produits industriels isolés

2.1.1. Traditions asiatiques

En Asie, le soja constitue une des sources principales de protéines où sa domestication en Chine remonte à l'antiquité. Les premiers écrits relatant la culture du soja sont datés d'environ 4500 ans et la localise exclusivement sur le bassin géographique chinois alors que son origine sauvage proviendrait du Nord-Est de la Chine actuelle (Singh 2010).

Depuis son introduction aux Etats-Unis vers 1765 et surtout la constitution d'un plasma germinatif (ressources génétiques) provenant d'Asie par des botanistes dans les années 1930 aux États-Unis, la culture du soja n'a cessé de croitre représentant une source cruciale pour la nutrition animale. D'après la FAO, 280 millions de tonnes ont été produites dans le Monde en 2013 dont 90 aux Etats-Unis, 82 au Brésil, 50 en Argentine faisant de ces trois pays les premiers producteurs mondiaux. En Asie sa production est représentée essentiellement par la Chine et l'Inde avec 12,5 et 11,9 millions de tonnes. En France, pour l'alimentation humaine cette source de protéine reste minoritairement exploitée, mais de nouveaux débouchés apparaissent avec une demande croissante pour les produits nutritionnels à base de soja.

Ainsi, il existe une multitude de produits dérivés du soja avec des voies d'obtention différentes. Dans les civilisations asiatiques, des procédés de transformation du soja visent à modifier l'aspect organoleptique et la texture des graines de soja (Figure I-4). On retrouve deux voies traditionnelles de transformation : la fermentation (miso, pâtes de soja, tempeh) et l'extraction à l'eau chaude donnant le lait de soja qui

est directement consommé ou qui est transformé en natto ou en tofu par coagulation au calcium (Barnes 2010) ou d'autres sels. Lors de la fabrication de jus de soja d'importants résidus peuvent apparaitre (okara). La surface du jus, lors de l'ébullition, peut coaguler et donne le fu zhu qui peut être séché ou fermenté. Différentes fermentations sont possibles et très rependues en Asie à partir de très nombreux produits.

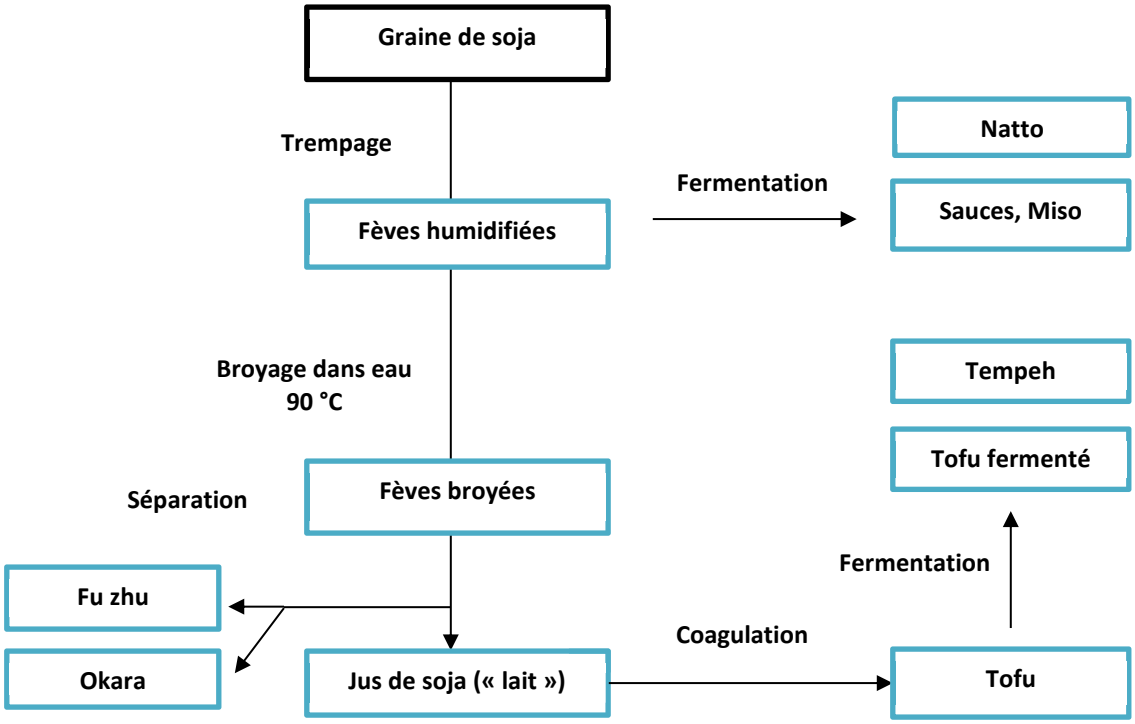


Figure I-4. Représentation schématique des produits de soja de traditions asiatiques et leurs voies d'obtention simplifiées

2.1.2. De la farine à l'isolat protéique de soja

Plus récemment, d'autres voies de transformation sont développées en aval de la production de farine pour être destinées à l'alimentation humaine. Elles correspondent aux produits protéiques retrouvés dans l'industrie agroalimentaire comme les concentrés et isolats (Peñas, Gomez *et al.* 2011). Un isolat protéique de soja est « la fraction protéique de soja issue de graines de soja décortiquées où la majorité des composants non protéiques est éliminée et doit contenir au minimum 90 % de protéines sur une base exempte d'humidité » (Berk 1992). Il est le produit le plus raffiné et contient plus de 90 % de protéines servant, depuis les années 1950 dans l'industrie alimentaire (boissons, alimentation infantile, laitages, burgers). Des produits à plus faible teneur en protéines existent aussi (Villares, Rostagno *et al.* 2010) : les protéines texturées souvent produites par extrusion et les concentrés de protéines habituellement composés de 65 % de proteines sont souvent utilisés pour augmenter les teneurs en protéines de certaines farines. Il existe deux voies de production des isolats protéiques de soja (Figure I-5). A partir de farine dégraissée il s'agit de solubiliser les protéines à pH alcalin (souvent pH 8 jusqu'à 9) et à 55 °C suivi par une élimination des composés insolubles par centrifugation. A cette étape les

procédés de séparation, de type décanteur centrifuge horizontal puis des centrifugeuses verticales à disques, sont généralement employés afin d'éliminer les parties fibreuses présentes dans la farine. Ainsi le coproduit insoluble contient entre 45 et 75 % de composés fibreux totaux et 16 à 36 % de protéines (Godon, 1996). Une précipitation des protéines est ensuite généralement effectuée par une acidification à pH 4,5 correspondant au point isoélectrique des protéines. Une deuxième étape de centrifugation (verticale à buse) permet l'isolement des protéines. L'ultrafiltration est aussi utilisée directement à partir de la solution protéique (Lawhon, Rhee, & Lusas, 1981). Cette méthode permet de récupérer d'autres protéines non précipitables à 4,5 comme les albumines. Le culot ou le retentât est très riche en protéines et constitue l'isolat protéique contenant plus de 90 % de protéines sur matière sèche (S. Shao, 2009) et (Godon, 1996).

Pour la production de concentrés de protéines de soja le principe est inverse. Il s'agit de jouer sur la solubilisation des composés interférents afin principalement d'améliorer les caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques des farines ou flocons dégraissés mais surtout d'augmenter la teneur en protéines. Il existe 2 voies possibles pour l'obtention de concentrés. La principale est l'extraction à l'éthanol en mélange aqueux (teneur supérieure à 50%) permettant la précipitation des protéines avec enrichissement en protéines et en glucides pariétaux et solubilisation (Mdonc élimination) des composés antinutritionnels non désirés comme les facteurs allergènes du soja, les α-galactosides, les phyto-oetrogènes ou les composés responsables de l'odeur, de l'amertume, de l'astringence. Cette concentration peut aussi avoir lieu avec de l'eau acidulée permettant aussi la précipitation des protéines, par traitement thermique pour insolubiliser les protéines et extraction à l'eau ou par coagulation.

La composition en macro et micronutriments va être influencée par le type de méthodes d'extraction. Dans les concentrés on s'attend à avoir éliminé les isoflavones dans le cas d'une extraction alcoolique par exemple (voir section 3.3). Le type de protéine présent dans le produit final pourra lui aussi être différent selon que l'on ait récupéré les protéines par ultrafiltration ou par précipitation. Ainsi dans les concentrés obtenus par extraction alcoolique, la teneur en isoflavones est réduite (voir section 5.3).

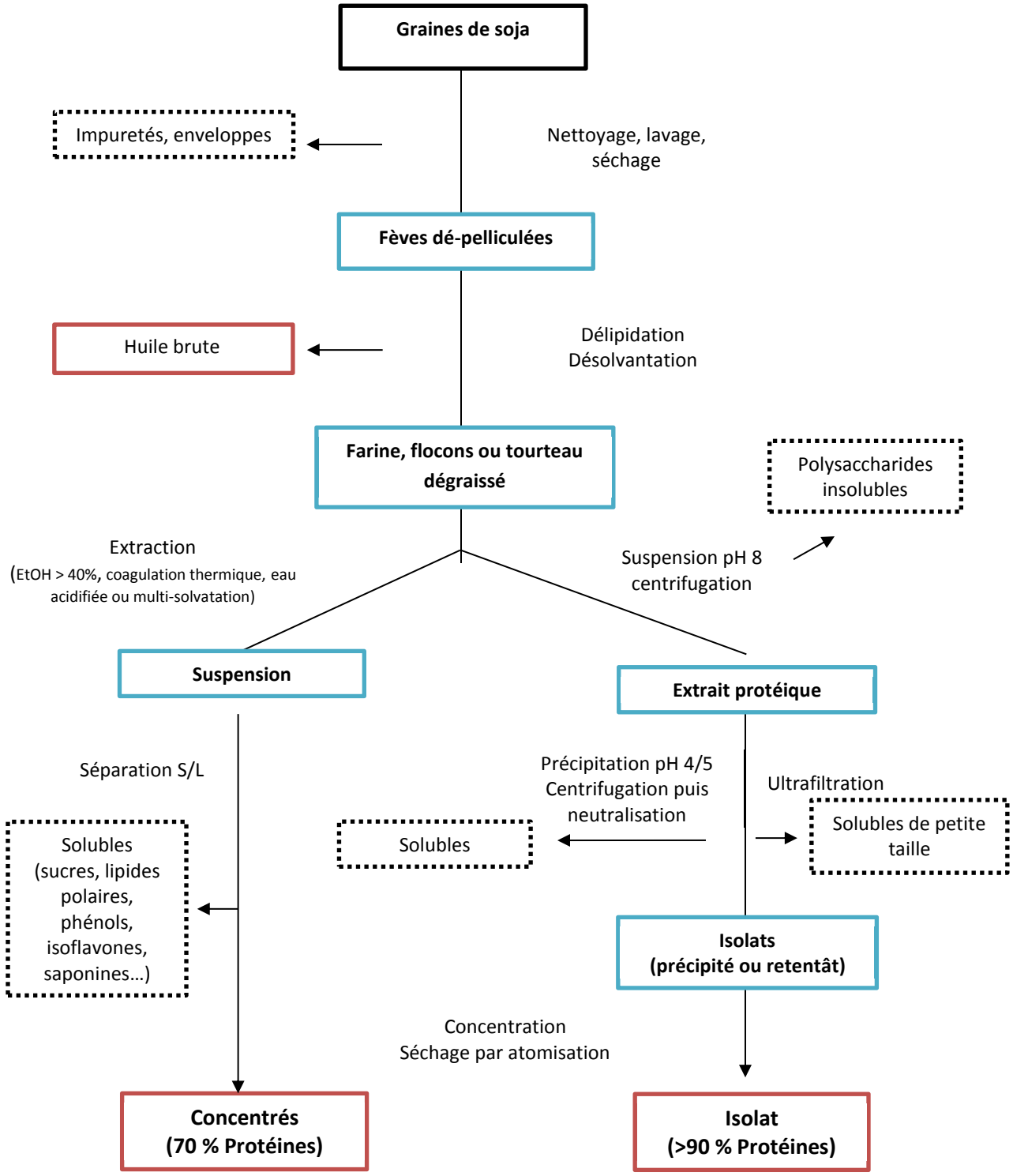


Figure I-5. Représentation des voies de production des concentrés et isolats protéiques de soja ainsi que les composés résiduels éli minés. E ncadré en n oir la ma tière première, en r ouge les produits les plus co urants, en b leu les intermédiaires et en pointillés les coproduits

2.1. Purification des protéines de riz : vers la production d'isolats ?

2.1.1. Procédés de transformation courants

Près de 2 000 variétés de riz sont aujourd'hui cultivées. Plusieurs stades de transformation se distinguent habituellement : le paddy à l'état brut dit non décortiqué, le riz cargo ou riz complet (brun) dont les glumes ont été enlevées (décortiquées), mais dont le son et le germe sont toujours présents. Le riz blanc est la partie où il ne reste quasiment que les réserves amylacées (l'endosperme). Généralement, 1 kg de riz paddy donne 750 g de riz cargo et 600 g de riz blanc. Les procédés de transformation sont conventionnellement orientés vers des produits plus ou moins raffinés amylacés comme le riz blanc, la farine de riz blanc ou de riz brun. Des coproduits valorisables sont présents, le principal est le son de riz, les riz cassés, les résidus de remoulage (Figure I-6). Le son de riz contient de 11,3 à 14,9 % de proteines, 34,0-62,0 % de glucides (principalement de l'amidon) et 15,0-19,7 % de lipides (Juliano 1994). C'est la matière privilégiée car la plus haute en teneur protéique et elle peu coûteuse.

Contrairement au soja, la production d'isolat protéique de riz est limitée, il est donc important de synthétiser les voies possibles présentes dans la littérature. Plus précisément, il existe sur le marché des concentrés protéiques souvent titrés à 80 % de protéines de riz, avec un facteur de conversion du taux d'azote en taux de protéines de 6,25, ce qui en réalité, est associé à une teneur d'environ 76 % avec le facteur de 5,95 retrouvé dans la littérature (plus amples explications sont données dans le chapitre II. Matériels et Méthodes). Les isolats protéiques de riz n'existent donc pas sur le marché à notre connaissance.

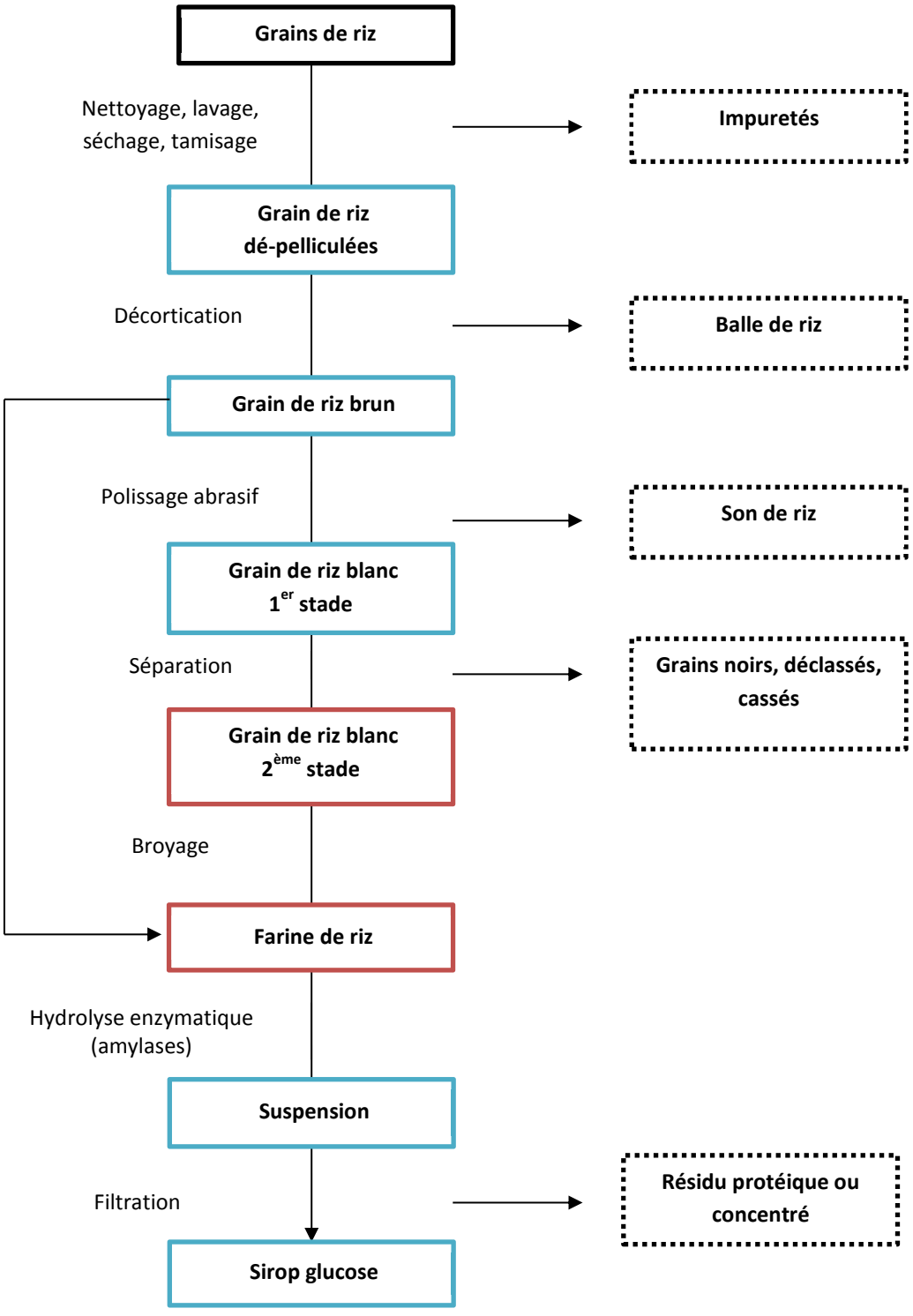


Figure I-6. Représentation schématique des procédés conventionnels de transformation du riz pour l'obtention de farine et de sirop de glucose ainsi que les résidus produits lors de ces transformations. Encadré en noir la matière première, en rouge les produits les plus courants, en bleu les intermédiaires et en pointillés les coproduits

2.1.2. Extraction de la fraction protéique : méthodes et limites

Bien qu'il n'existe pas d'isolat protéique de riz (ou extrêmement rare), quelques travaux sont mentionnés dans la littérature concernant la concentration et parfois l'isolement des protéines de riz en tant que telles, c'est-à-dire un produit à plus de 90 % de protéines sur poids sec. Dans le cadre de ces travaux de thèse il a donc été important de synthétiser les méthodes présentes dans la littérature (Tableau I-4 à Tableau I-6). Les méthodes et leurs résultats, lorsqu'ils sont communiqués, sont présentés dans les tableaux suivants.

Le son de riz est la matière la plus utilisée pour l'étude de l'isolement des protéines de riz au vu de son abondance et sa sous-utilisation en industrie. D'autres co-produits issus de la transformation de riz brun en riz blanc et farine sont aussi cités, comme les brisures (broken-rice), les remoulages (rice middlings), et des co-produits protéiques issus de la production de sirop de glucose correspondant à des concentrés contenants près de 50 % de protéines.

Tableau I-4.Méthodes d'extraction par solvants présentées dans la littérature pour l'isolement des protéines de riz et résultats obtenus

Méthodes	Matière première	Résultats		Références
Extractions des protéines par solvants		Rendement (%)	Pureté (%)	
Type Osborne	Farine de riz brun		78 - 95	(Agboola, Ng *et al.* 2005)
	Son de riz		20 - 97	(Adebiyi, Adebiyi *et al.* 2007)
Solution alkaline et précipitation	Son de riz déshuilé	37	85	(Chen, Houston 1970)
		21 - 48	71 – 80	(Gupta, Chandi *et al.* 2008)
		-	86	(Bandyopadhyay, Misra *et al.* 2008)
		34,2	74,5	(Wang, Hettiarachchy *et al.* 1998)
Agents dénaturants (SDS, Na_2SO_3)	Son de riz déshuilé	84	-	(Hamada 1999)

Concernant premièrement les extractions conventionelles des protéines (Tableau I-4), leur extraction peut être effectuée par la méthode d'Osborne qui permet d'atteindre des hauts rendements et hautes puretés en protéines (ce qui pourrait s'apparenter à la production d'isolats). Cependant cette dernière implique l'utilisation d'une cascade de solvants et la famille majoritaire (glutélines) est moins pure avec 78 % de protéines sur produit sec final à partir de farine et seulement 20 % à partir de son de riz. Cette fraction glutéline a aussi fait l'objet d'extraction seule en solution alkaline donnant des puretés en protéines intéressantes, le produit final s'apparentant à un isolat protéique avec des rendements relativement faibles. La principale limite de cette méthode est la valeur du pH qui doit être très élevée au-delà de 10, ce qui est non recommandé pour une application alimentaire car la formation de lysoalanine, potentiellement toxique, et une racémisation de composés peuvent être observées (Friedman, Levin *et al.* 1984). Les traitements thermiques apportent des rendements proches de 50 % et des puretés en protéines du même ordre de grandeur, le couplage avec un traitement amylase induit une pureté plus forte à 74 % sur son de riz (Tableau I-5).

Tableau I-5. Méthodes d'extraction thermo-mécaniques présentées dans la littérature pour l'isolement des protéines de riz et résultats obtenus

Méthodes	Matière première	Résultats		Références
Méthodes thermo-mécaniques		Rendement (%)	Pureté (%)	
Cuisson hydro-thermique	Son de riz	50	53	(Xia, Wang *et al.* 2012)
Cuisson hydro-thermique et traitement amylase	Son de riz	50	74	(Xia, Wang *et al.* 2012)
Moulin colloïdal		64	30	(Xia, Wang *et al.* 2012)
Microfluidisation + Moulin colloïdal	Brisures de riz	80	44,5	(Xia, Wang *et al.* 2012)
Microfluidisation + Moulin colloïdal + amylase		80	85	(Xia, Wang *et al.* 2012)

L'utilisation de méthodes d'homogénéisation poussée (microfluidisation et moulin colloïdal) facilite la purification des protéines de son de riz. La séparation par différence de densité lors de l'étape de centrifugation, induisant l'apparition de plusieurs phases dans le surnageant, apparaît comme une étape clé pour l'isolement sélectif des protéines. Ces méthodes physiques couplées à un traitement enzymatique permettent d'obtenir des produits à 85 % de protéines et un rendement de 80 % sur des brisures de riz. Même si la pureté reste inférieure à 90 %, ces méthodes récentes représentent des techniques très prometteuses.

Dans l'objectif de solubiliser les protéines de riz, l'hydrolyse enzymatique par protéase est aussi proposée par plusieurs auteurs (Tableau I-6). Des puretés en protéines relativement faibles, proches de 40 %, sont observées avec l'utilisation de son de riz malgré des rendements proches de 80 %. Une très forte solubilisation peut être induite avec l'utilisation de techniques modernes de traitement par eau pressurisée qui induisent une hydrolyse fortement poussée des protéines jusqu'au stade d'acides aminés (Sereewatthanawut, Prapintip *et al.* 2008; Watchararuji, Goto *et al.* 2008; Wiboonsirikul, Kimura *et al.* 2008). Contrairement à l'hydrolyse enzymatique, la sélectivité de ces méthodes fait défaut, car elles co-solubilisent des sucres ou d'autres composés venant freiner la pureté en protéines et impliquent l'utilisation de méthodes de séparation en aval.

L'hydrolyse de l'amidon et des polymères pariétaux, hémicelluloses et cellulose, apparaît comme une voie intéressante pour l'isolement des protéines de riz avec des valeurs de concentration en protéines au-delà des 90 %, ce qui est inhérent à l'utilisation du terme « isolat ». Le rendement est important en partant de concentrés protéiques issus de l'industrie du sirop de glucose mais il est plus faible lors de l'utilisation de sons de riz. Il est important de relever qu'un pH de 10 nécessaire pour désactiver les enzymes, est utilisé dans l'étude présentant un procédé de production d'isolat protéique de son de riz (Wang, Hettiarachchy *et al.* 1998) ; ce qui favoriserait l'extraction des protéines. L'action réelle du traitement phytase/xylanase n'est donc pas évidente. L'utilisation de telles enzymes à des pH plus faibles, légèrement acides, n'est pas étudiée à notre connaissance.

Tableau I-6. Méthodes d'extraction par hydrolyses présentées dans la littérature pour l'isolement des protéines de riz et résultats obtenus

Méthodes	Matière première	Résultats		Références
Solubilisation des protéines par hydrolyse		Rendement (%)	Pureté (%)	
Par protéase	Son déshuilé	73	-	(Apinunjarupong, Lapnirun *et al.* 2009)
		88	30	(Hamada 2000)
Amylases + protéase	Concentré protéique	41,6	78,5	(Shih, Daigle 2000)
Par eau pressurisée		-	84	(Watchararuji, Goto *et al.* 2008)
Hydrolyse des polyssacharides et acide phytique		Rdt	Pureté	
Amylase (Termamyl 120L)	Farine	85 - 92	82	(Morita, Kiriyama 1993)
Amylase (Termamyl 120L) + glucoamylase (Diazyme L200)	Concentré protéique	98,5	85,5	(Shih, Daigle 2000)
Amylase (Su-Hong Biological)	Son de riz	19,7	-	(Xia, Wang *et al.* 2012)
Cellulase	Concentré protéique	73,1	74,6	(Shih, Daigle 2000)
Hemicellulase		81,5	77,2	(Shih, Daigle 2000)
Cellulase, β-glucanase, xylanase		98,5	84,5	(Shih, Daigle 2000)
Xylanase + extraction alkaline	Son de riz déshuilé	54,5	81,7	(Wang, Hettiarachchy *et al.* 1998)
Amylase et cellulase, β-glucanase, xylanase	Concentré protéique	95,4	91,1	(Shih, Daigle 2000)
Complexe phytique : Phytase + extraction alkaline	Son de riz déshuilé	57,3	80,2	(Wang, Hettiarachchy *et al.* 1998)
Phytase + xylanase	Son de riz déshuilé	74,6	92	(Wang, Hettiarachchy *et al.* 1998)

2.2. Utilisation en industrie agro-alimentaire

2.2.1. Les Matières Protéiques Végétales

Lors de l'utilisation de données économiques ou industrielles l'acronyme MPV désigne les Matières Protéiques Végétales. Le marché global des ingrédients protéiques végétaux est de 1,7 tonnes en 2012 dont 43 % de protéines de blé, 27 % de concentrés de protéines de soja et 15 % d'isolats protéiques de soja. Ces matières sont classées en trois catégories de la moins riche en protéines à la plus riche :

- Les farines (50 à 65 % de protéines)
- Les concentrés (65 à 90 % de protéines)
- Les isolats (> 90 % de protéines)

Les MPV possèdent des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles propre à leur origine végétale et aux procédés de transformations associés. Les protéines de soja sont connues pour posséder des propriétés intéressantes pour l'industrie agro-alimentaire (Tableau I-7).

Tableau I-7. Propriétés des protéines de soja pour l'alimentation (Kinsella 1979)

Propriétés	Critères fonctionnels
Organoleptiques/Kinesthésiques	Couleur, saveur, odeur, texture, sensation en bouche, douceur, granularité, turbidité
Hydratation	Solubilité, mouillabilité, absorption de l'eau, gonflement, épaississement, gélifiant
Surface	Emulsion, pouvoir moussant, formation de films, fixation des lipides et des saveurs
Structure et rhéologie	Elasticité, granularité, cohésion, masticabilité, viscosité, adhérence, agrégation, formation de pâte, texturation, formation de fibre et extrudabilité
Autres	Compatibilité avec des additifs, antioxydant

Ces propriétés peuvent être utilisées dans le développement de boissons, produits carnés, sauces et produits boulangers. Les protéines de riz sont beaucoup plus minoritaires sur le marché agro-alimentaire et sont utilisées en tant que protéines de très bonnes qualités nutritionnelles et hypoallergéniques.

2.2.2. Le cas de l'alimentation infantile

2.2.2.1. Le marché

Les protéines de soja, et plus récemment les protéines de riz, sont utilisées en tant qu'ingrédients dans les préparations pour nourrissons. D'après la FDA (Food and Drug Administration) trois types de formulations existent, les poudres qui représentent le produit de base le moins cher, les concentrés liquides et les « ready-to-feed ». L'Agence estime qu'un million de nourrissons ne sont pas alimentés directement par lait maternel et pour lesquels les préparations à base d'ingrédients viennent en remplacement. 2,7 millions d'individus âgés de moins de trois mois sont alimentés au moins en partis par ce type de produits (données pour le marché Nord-Américain 2014). Les formules infantiles à base de protéines de soja sont données dans les premiers mois de la vie du nourrisson et représentent 25 % des enfants aux États-Unis et Canada, 13 % en Nouvelle-Zélande, 7 % au Royaume-Uni, 5 % en Italie et 2 % en France (Agostoni, Axelsson *et al.* 2006; Li, Zhu *et al.* 2013). La recrudescence des intolérances et allergies tendent à faire augmenter ce taux. Des hydrolysats protéiques permettant de réduire l'allergénicité sont aussi commercialisés (détaillé plus amplement dans la section 3.3.).

2.2.2.2. Législation

Pour l'ensemble des produits nutritionnels en Europe, l'EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) émet des évaluations scientifiques sur les produits réglementés tels que les préparations pour nourrissons. Sur la base d'études scientifiques elle émet des directives et des avis émanant d'un groupe scientifique dédié. L'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail en France) coopère dans ce sens avec les autres agences nationales européennes auprès de l'EFSA. Les allégations nutritionnelles ont une valeur légale une fois que l'EFSA en a délivré un avis favorable. Aux Etats-Unis c'est la FDA (Food and Drug Administration) qui fait autorité. Il existe désormais un équivalent pour chaque marché. Pour la législation concernant plus spécifiquement l'alimentation infantile, des organismes spécialisés peuvent exister comme l'AAP (The American Academy of Pediatrics). Il existe trois catégories de préparations alimentaires infantiles dans lesquelles des ingrédients protéiques sont amenés à être incorporés, classés par tranche d'âge. Il existe les

préparations pour nourrissons de 0 à 6 mois et les préparations de suite de 6 à 12 mois qui sont toutes deux encadrées par une législation Européenne. Ensuite les préparations de croissance sont destinées à l'enfant âgé de 1 à 3 ans, cette dernière catégorie étant encadrée par une réglementation différente selon le pays.

2.2.2.3. La teneur en isoflavones et autres facteurs anti-nutritionnels

L'EFSA a établi en 2014 des recommandations (« Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae »). Celles-ci définissent les teneurs minimales et maximales en macronutriments et en énergie, requises dans les formules infantiles, mais aussi concernant les micronutriments (minéraux, vitamines, pro-biotiques, profil en acides aminés). Le panel d'experts Européens considère que la concentration en isoflavones et autres facteurs dits anti-nutritionnels (inhibiteurs de trypsine, lectines et acide phytique) doit être maintenue à des concentrations les plus faibles possibles. Bien que l'AAP ait conclu qu'aucun effet négatif des isoflavones de soja sur le développement humain, la reproduction et les fonctions endocrines n'ait été prouvé, l'agence équivalente européenne (European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology) reconnait que des études manquent sur ce sujet mais recommande la réduction de la teneur en isoflavones dans les formules à base de soja. L'effet des isoflavones, connu à ce jour, est présenté plus amplement dans la section 5.1.

3. Les isoflavones : perturbateurs endocriniens cible du projet

3.1. Généralités

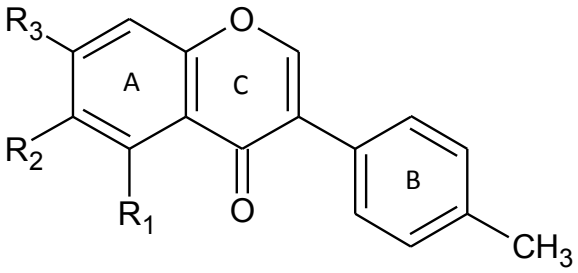
3.1.1. Rôle dans la plante

Les isoflavones sont des composés polyphénoliques qui ont une distribution restreinte chez les plantes. Elles sont retrouvées en plus grande quantité chez les légumineuses, comme le soja, les féveroles ou le trèfle. Elles sont cependant présentes chez 59 autres familles (Lapčík 2007). Elles ont un rôle crucial dans l'intéraction entre les microorganismes fixateurs d'azote pour leur attraction vers les parties terrestres de la plante et comme signal inducteur de la nodulation (Subramanian, Stacey *et al.* 2007), les nodosités étant les excroissances présentes sur les racines et sont le siège d'échanges azotés entre bactérie et plante. Outre cette particularité, elles sont souvent classées comme des phytoalexines ce qui leur confère un deuxième rôle dans les parties supérieures de la plante, comme agent antimicrobien, leur forme active étant produite par l'action de la bêta-glucosidase qui les transforme en aglycones (Shaw, Morris *et al.* 2006).

3.1.2. Structures des isoflavones de soja

Les isoflavones constituent une branche spécifique du métabolisme des flavonoïdes qui se différencie par la position du noyau B phénolique. A partir de chalcones puis de flavanones, les voies de synthèse chez la plante, se dissocient en deux pour produire d'un côté des flavones, flavonols, proanthocyanidines, anthocyanins, et de l'autre côté les isoflavones qui peuvent ensuite rentrer dans d'autres voies de biosynthèse. Les isoflavones de soja ont trois structures de base aglycones, déterminées par la présence ou non de groupements hydroxyles ou O-méthyles sur le noyau A (Figure

I-7). A ces structures de base, peuvent s'ajouter des groupements osidiques en position R3, lesquels peuvent être liés à des groupements acétyles ou malonyles à leur extrémité.



	R1	R2	R3
Aglycones			
Génistéine	OH	H	OH
Daidzéine	H	H	OH
Glycitéine	H	OCH_3	OH
β-glucosides			
Génistine	OH	H	O-Glc
Daidzine	H	H	O-Glc
Glycitine	H	OCH_3	O-Glc
Acétyles			
6˝-O-Acétylgénistine	OH	H	O-Glc-COH_3
6˝-O-Acétyldaidzine	H	H	O-Glc-COH_3
6˝-O-Acétylglycitine	H	OCH_3	O-Glc-COH_3
Malonyles			
6˝-O-Malonylgénistine	OH	H	O-Glc-COH_2COOH
6˝-O-Malonyldaidzine	H	H	O-Glc-COH_2COOH
6˝-O-Malonylglycitine	H	OCH_3	O-Glc-COH_2COOH

Figure I-7. Structure di-phénolique des isoflavones de soja et leur dérivés glycosidiques les plus connus

Bien qu'elles n'apparaissent pas dans les méthodes d'analyse de référence, d'autres isoflavones peuvent être retrouvées chez le soja mais en très faible proportion (biochanine A et formononétine) qui sont moins abondantes chez le soja et que l'on retrouve en plus grande quantité notamment chez le trèfle (Hutabarat, Greenfield *et al.* 2000). Plus récemment, d'autres formes d'isoflavones ont été identifiées notamment des dérivés constitués avec d'autres sucres tels que l'arabinose ou le xylose (Hosny, Rosazza 2002) ainsi que des dérivés méthylés et déshydrogénés (Wu, Kang 2011).

3.1.3. Effets cliniques connus chez l'Homme

Les isoflavones sont des phyto-œstrogènes, c'est-à-dire des composés di-phénoliques non stéroïdiens d'origine végétale associés potentiellement à une activité de type oestrogénique (c'est le cas aussi pour certaines flavones, flavonols, lignanes et chalcones). La structure stérique proche du 17β-estradiol (hormone sexuelle femelle primaire) confère à ces composés la capacité de se lier aux récepteurs oestrogéniques humains (récepteurs ER). L'affinité pour ces récepteurs est 100 à 10000 fois moins importante que l'estradiol. Cependant, leur présence dans le sang peuvent être 10000 fois plus importante (Adlercreutz, Honjo *et al.* 1991).

Les isoflavones ont été étudiées pour leurs action oestrogénique mais d'autres effets cliniques ont été démontrés (Tableau I-8).

Tableau I-8. Les effets cliniques des isoflavones connus chez l'Homme

Domaines d'étude	Effets	Système biologique	Etat d'avancement	références
Santé cardio-vasculaire	Antiathérogène	Animal	Fonction complexe, attente de résultats	(Tikkanen, Adlercreutz 2000)
Cerveau	Santé cognitive		Effets liés à la fonction oestrogénique, supposés	(Schreihofer 2015)
Ostéoporose	Densité minérale accrue	Humain	Nombreuses études cliniques mais certaines sont contradictoires	(Marini, Bitto *et al.* 2008; Vupadhyayula, Gallagher *et al.* 2009)
Cancer du sein	Oestrogénique Anti-prolifération	Humain	Méta-analyse positive (consommation de soja) Différences marquées entre origine ethnique	(Wu, Yu *et al.* 2008; Messina 2010)
Cancer de la prostate		Animal Humain	Retard dans le développement de cancer prouvé Méta-analyse positive (consommation de soja)	(Pollard, Suckow 2006) (Yan, Spitznagel 2009)
Ménopause	Oestrogénique	Humain	Etudes cliniques nombreuses Dépendance forte des résultats envers la capacité catalytique intestinale (transformation des isoflavones en équol) Commercialisation de compléments alimentaires	(Baber 2010) (Jou, Wu *et al.* 2008)

Malgré l'utilisation de compléments alimentaires à base d'extraits d'isoflavones de soja et les études cliniques démontrant leur efficacité, d'autres travaux montrent un risque cancérigène accru chez certaines femmes ayant une prédisposition pour ce type de cancers du sein, notamment *in vitro* avec la stimulation de la croissance cellulaire de souche cancéreuse. Dans ce sens l'EFSA a émis en 2012 un avis défavorable concernant l'utilisation de compléments alimentaires riches en isoflavones pour traiter les effets négatifs de la ménopause cités plus haut (maintien de la densité osseuse, diminution de symptômes vaso-moteurs), mais ce n'est pas le cas aux Etats-Unis où la vente de ces produits continue.

3.1.4. Y-a-t-il un risque concernant l'alimentation infantile ?

L'effet négatif des phyto-oestrogènes sur la fertilité a été démontré sur modèle animal depuis 50 ans, notamment le mouton ou le poisson (Bennetau-Pelissero, Breton *et al.* 2001). Le cas spécifique de l'utilisation de protéines de soja contenant une quantité relativement importante d'isoflavones, dans l'alimentation infantile, fait débat auprès des autorités sanitaires américaines et européennes. En effet, certaines études montrent l'innocuité des isoflavones dans l'alimentation infantile et rappellent que les enfants ayant consommé des produits à base de soja pour l'alimentation de premier âge ne présentent pas de disfonctionnements de développement ou de croissance (Vandenplas, De Greef *et al.* 2011). En dépit du manque d'études, prouvant la dangerosité de ces composés dans l'alimentation infantile, les autorités européennes, notamment l'ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition), relayée par l'EFSA recommandent la diminution de la teneur en isoflavones dans ce type de produits et établissent donc un « principe de précaution » à son égard.

La volonté d'étudier l'élimination des isoflavones, ou du moins leur diminution, dans les produits de soja est donc consécutive de cette prise de position, concernant l'utilisation en alimentation infantile.

3.2. Méthodes d'analyse des isoflavones

Elles sont généralement dosées par des méthodes classiques de type HPLC avec une colonne en phase inverse C18 et une détection par spectrométrie ultra-violet la plupart du temps, ou par spectrométrie de masse. La méthode de Murphy est une des références dans le l'analyse des isoflavones. Elle inclut l'extraction des isoflavones avec un mélange acétonitrile et eau acidifiée puis le dosage par HPLC-UV des 12 formes d'isoflavones du soja (Wang, Murphy 1994). L'acétonitrile est le solvant présentant le plus d'efficacité pour l'extraction des isoflavones de soja (Murphy, Barua *et al.* 2002). Cependant d'autres études montrent que le choix du solvant, acétonitrile, méthanol ou éthanol, dans certains cas, n'engendre pas de différences significatives sur leur extraction (Barnes, Kirk *et al.* 1994). Ainsi, une méthode issue de l'AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) de 2001 fait intervenir une extraction au méthanol à 80 % (Klump, Allred *et al.* 2001) et une plus récente revient sur l'utilisation du solvant de Murphy mais avec ajout de DMSO en supplément (Collison 2008). Le choix du solvant pour le dosage d'isoflavones résiduelles n'est donc pas évident compte tenu de la grande disparité des résultats.

Outre le choix délicat du solvant d'extraction, le principal problème des méthodes d'analyse concernant les isoflavones de soja est la rareté de certains standards (Acétyles et Malonyles) du fait notamment de leur instabilité. Pour y remédier, il existe donc des méthodes de dosages indirects faisant intervenir une étape d'hydrolyse avant dosage afin de quantifier les formes hydrolysées (transformation des formes malonyles en aglycones ou glucosides). Ainsi, une saponification générant des formes glucosides à partir des formes conjuguées peut être utilisée après extraction (Klump, Allred *et al.* 2001). Il est aussi possible d'utiliser une hydrolyse acide permettant de transformer tous les dérivés en aglycones (Nakamura, Tsuji *et al.* 2000). Dans la méthode AOAC 2008 les formes conjuguées malonyles et acétyles sont quantifiées sans hydrolyse et en se reportant sur les courbes de calibration obtenus à partir des formes glucosides et aglycones correspondantes. En effet, les absorptions UV des formes conjuguées sont identiques aux formes glucosides (par exemple, la 6˝-O-Malonylgénistine a sensiblement le même spectre d'adsorption UV que la génistine). Les formes conjuguées malonyles et acétyles peuvent être alors repérées sur les

chromatogrammes par une méthode de traitement thermique préalable sur le matériel, les malonyles sont transformées partiellement en acétyles. Ce phénomène est décrit dans la littérature, la transformation des formes conjuguées engendre la formation des isoflavones (Barnes, Coward *et al.* 1998; Shao 2009). Les méthodes de dosage avec ou sans hydrolyse ont déjà été comparées, elles permettent d'établir qu'il n'y a pas de différences significatives sur la quantification des isoflavones totales (Shao, Duncan *et al.* 2011). La teneur en isoflavones peut être exprimée en « équivalents aglycones » pour s'affranchir des différentes masses molaires des 12 isoflavones.

3.3. Teneurs dans les produits protéiques de soja

3.3.1. Teneurs totales

Bien que les solvants ou les méthodes d'extraction des isoflavones de soja ne soient pas exactement les mêmes dans la littérature, la teneur totale en isoflavones peut être comparée selon le type de produit analysé. Les produits les moins raffinés (farines et tourteaux) sont les plus riches en isoflavones avec des teneurs de 1,78 à 6,81 mg par gramme de produit (Tableau I-9). Les isolats ont des teneurs légèrement plus faibles et moins variables autour généralement de 1 à 1,5 mg/g. Les concentrés de protéines de soja sont eux les plus pauvres en isoflavones, souvent sous les 0,1 mg/g voire sous les limites de détection. Cette particularité provient du procédé de production qui, comme décrit dans la section 2.1, fait souvent appel à une extraction par solvant hydroalcoolique engendrant l'extraction de nombreux composés dont les isoflavones.

Tableau I-9. Teneurs totales en isoflavones de soja selon le type de produits et le solvant d'extraction utilisé

Isolats (IF µg/g)	Concentrés (IF µg/g)	Tourteau et farine (IF µg/g)	Solvant d'extraction	Références
1030 à 1450	160 à 3170	1780 à 3060	MeOH 80 %	(Eldridge 1982)
		2060	MeOH 80 %	(Barnes, Kirk *et al.* 1994)
		2030	MeCN 80 % HCl	(Barnes, Kirk *et al.* 1994)
		5010	EtOH 50 %	(Kao, Chien *et al.* 2008)
621 à 989	72		MeCN HCl (1%)	(Wang, Murphy 1994)
		2460 à 2510	EtOH 80 %	(Xiao, Ye *et al.* 2011)
		2950	EtOH 70 % HCl	(Benedetti, Prudêncio *et al.* 2011)
1630 à 2000	0 à 100	5760 à 6810	MeCN + DMSO	(Collison 2008)
1630		3890	MeCN 80 % HCl (5x)	(Achouri, Boye *et al.* 2005)
1810		3700	MeOH 80 % (5x)	(Achouri, Boye *et al.* 2005)
1660		3890	EtOH 80 % (5x)	(Achouri, Boye *et al.* 2005)

3.3.2. Distribution des différentes isoflavones selon le produit : influence du procédé d'obtention

Dans le soja brut, il y a une prédominance des formes conjuguées (Barnes, Kirk *et al.* 1994) en particulier les formes malonyles, pouvant représenter plus de 90 % des isoflavones dans la graine. Les deux structures de base génistéine et daidzéine sont très majoritaires contrairement à la glycitéine qui est beaucoup plus rare. Les procédés de production de produits de soja influencent les teneurs et la distribution en isoflavones, qu'ils soient de nature chimique ou thermomécanique, entrainant des variations importantes d'un produit à l'autre. Les formes glycosides apparaissent dans les produits protéiques et la farine par dégradation des formes conjuguées. L'utilisation de traitements thermiques lors des procédés de production de farine ou d'isolat entraine une transformation des formes malonyles en formes glucosides simples ou bien en aglycones pour les températures les plus hautes (Rickert, Meyer *et al.* 2004; Kao, Lu *et al.* 2005; Shao 2009; Villares, Rostagno *et al.* 2010). Le profil en isoflavones dépend donc du traitement subi de la graine jusqu'à l'isolat. Pour ce dernier, les formes aglycones sont plus représentées que dans la farine, les conditions basiques utilisées pour la solubilisation des protéines lors de la production des isolats entrainent, en plus des traitements thermiques, une dégradation des formes malonyles. Les formes intermédiaires acétyles apparaissent lors des procédés de transformation des farines uniquement lors de l'utilisation de fortes températures. Elles restent cependant largement minoritaires et à l'état de traces (Benedetti, Prudêncio *et al.* 2011). Ces changements sont similaires concernant les deux structures de base majoritaires (génistéine et daidzéine) mais pour la glycitéines les formes malonyles apparaîtraient lors de la transformation de la graine en farine. Une perte importante en isoflavones peut avoir lieu lors de la production de concentrés par coagulation (les isoflavones restent dans la partie liquide aqueuse) ou par lavage avec des solvants hydroalcooliques. Du fait de la présence d'enzymes endogènes (glucosidases), des dégradations biochimiques peuvent aussi avoir lieu aux alentours de 45°C (Shao 2009; Villares, Rostagno *et al.* 2010).

3.3.3. Quel seuil viser pour le développement d'ingrédient infantile ?

Bien que les autorités sanitaires européennes n'aient pas retenu de seuil critique en isoflavones dans les produits destinés à l'alimentation infantile dans leur dernier rapport (European Food Safety Authority 2014) elles recommandent une diminution « autant que possible ». Des rapports et études antérieures en avaient fixé la limite (AFSSA 2005) avec « une dose quotidienne maximale de phyto-estrogènes chez l'adulte, toute consommation confondue, pouvant être de l'ordre de 1 mg/kg (de poids corporel par jour), rejoignant en cela les recommandations formulées en Allemagne par la SCEFS (Senate Commission on the Evaluation of Food Safety) ». L'AFSSA recommandait la diminution de la teneur en isoflavones à des concentrations maximales de 1 µg/mL pour les préparations finales d'isoflavones (en équivalent aglycones), alors que les concentrations en isoflavones dans les solutions seraient au maximum de 50 µg/mL (Bennetau-Pelissero, Sauvant *et al.* 2004). Pour atteindre le seuil établi par l'AFSSA, et sachant que les concentrations en isolats peuvent atteindre un maximum de 3000 µg d'isoflavones par g, de produit, un seuil théorique idéal de 50 à 60 µg d'isoflavones par g d'isolat devrait être atteint, soit l'élimination de plus de 98 % de isoflavones. Les méthodes d'extraction ou de purification doivent donc permettre d'obtenir de très hauts rendements d'extraction. Cette exigence a représenté une forte contrainte durant l'étude des procédés qui sont décrits dans ce manuscrit.

3.4. Interactions protéines et polyphénols

Il existe de nombreuses interactions entre protéines et polyphénols : interactions hydrophobes ; liaisons covalentes ; hydrogènes ; interactions ioniques (Figure I-8). Il est prouvé aussi que les interactions isoflavones-protéines freinent l'extractabilité des isoflavones (Achouri, Boye *et al.* 2005).

Plus particulièrement, les associations avec les protéines de type globuline conglycinine, et glycinine sont décrites comme étant associées aux isoflavones par liaisons hydrophobes et ponts hydrogènes (Speroni, Milesi *et al.* 2010). La concentration en isoflavones dans les produits de soja dépendrait même des interactions entre protéines et isoflavones durant les procédés de fabrication et de la forme moléculaire de ces dernières. Pour les isolats, le pH de l'extraction et de la précipitation des protéines est très important dans ce sens.

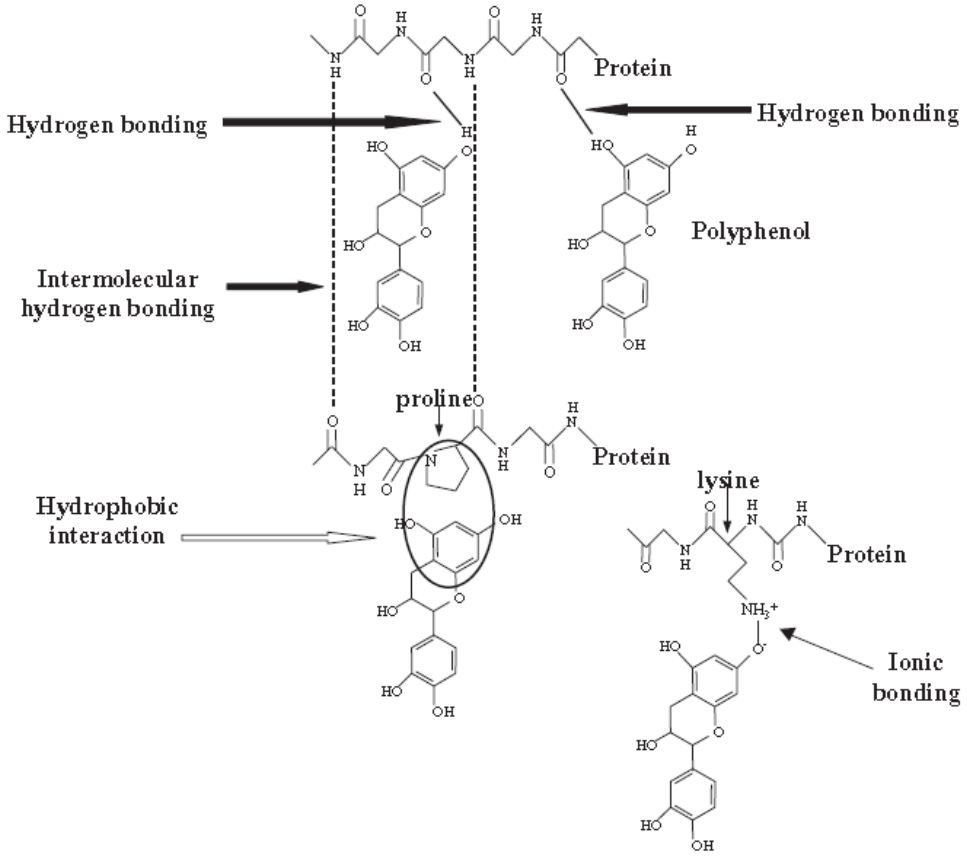


Figure I-8. Schéma des interactions possibles entre polyphénols et protéines (Asano, Shinagawa et al. 1982) (Le Bourvellec, Renard 2012)

Une meilleure affinité avec la glycinine semblerait avoir lieu. Les différentes isoflavones établiraient différents types d'interactions avec les protéines du fait de leurs diverses propriétés hydrophobes (aglycones, glucosides, malonyles) ainsi que leurs aptitudes à former des interactions hydrogènes. Les formes malonyles ayant un pKa de 5,7, elles se dissocieraient en espèces chargées négativement aux pH neutres (Rickert, Meyer *et al.* 2004). Aux pH basiques il y aurait moins d'affinité entre les protéines et les isoflavones (Speroni, Milesi *et al.* 2010). Cependant le taux d'extraction global des deux types de

composés est favorisé dans les conditions alcalines (Figure I-9). Durant la fabrication d'isolats protéiques, la précipitation à pH 4,5, entraine une partie des isoflavones. Ces auteurs montrent que malgré la charge des malonyles à pH basique, elles semblent retenues à hauteur de 40 % par les protéines de soja indiquant une interaction spécifique avec certains résidus. Si l'extraction préalable à cette précipitation est réalisée à pH 11 l'isolat contient moins d'isoflavones totales, si au contraire elle est effectuée à pH 8 la teneur y est plus grande du fait de la présence de malonyles (transformées en glucosides à pH 11). Il semble donc y voir une interaction particulière et non expliquées entre les formes malonyles et les protéines de soja.

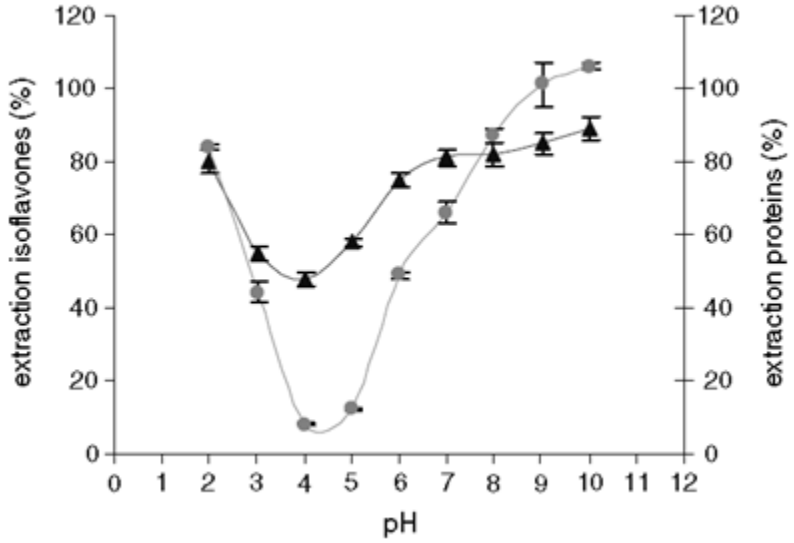


Figure I-9. Influence du pH sur l'extraction des isoflavones et des protéines de soja (Lopes Barbosa, Lajolo et al. 2006). (▲) isoflavones et (●) protéines

L'hydrolyse des protéines de soja influencerait aussi l'extraction des isoflavones ce qui montrerait aussi l'intéraction sous-jacente entre ces deux types de composés (Malaypally, Ismail 2010).

4. Procédés physico-chimiques applicables à l'élimination des isoflavones

4.1. Extraction solide liquide

4.1.1. Principe théorique de l'extraction solide-liquide

L'opération d'extraction de composés comprend trois stades : la dissolution, qui est le passage du soluté dans le solvant, le lavage du solide par du solvant frais ou peu riche en soluté et la séparation mécanique du solide et du liquide. Ces processus peuvent être effectués dans un même système ou dans des systèmes séparés. Le premier stade qui régit les phénomènes d'extraction en tant que tels correspond au transfert du soluté dans le liquide par différentes étapes :

1- L'imprégnation du solvant dans la matrice qui est généralement un transport diffusif

2- La dissolution du soluté par le solvant au sein des particules. Il s'agit d'une désorption des molécules de soluté des sites actifs de la matrice végétale solide.

3- La diffusion lors de laquelle le soluté circule jusqu'à la surface au travers d'un film mince qui entoure les particules, on parle de transfert interne. Ce film joue un rôle important dans la cinétique d'échange de matière car il s'oppose aux phénomènes d'échanges déterminant la vitesse de diffusion (effet de film). L'agitation est le principal levier pour diminuer cette résistance.

4- Le transfert du soluté de la surface vers le fluide d'extraction, qui a la cinétique la plus rapide donc généralement moins limitant que les autres phénomènes.

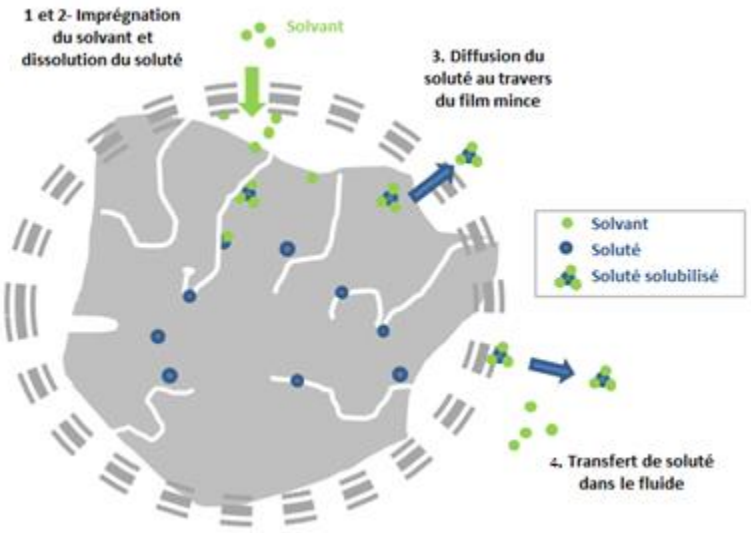


Figure I-10. Représentation schématique du processus d'extraction solide-liquide de composés naturels au sein d'une particule poreuse

L'extraction est influencée par de nombreux facteurs : nature et état de la matrice ; nature, proportion et répartition du soluté ; nature du solvant ; température ; agitation (Frémeaux, Leybros 1990).

L'état de fragmentation de la matière en fines particules permet, dans la plupart des cas, d'augmenter la vitesse de transfert car elle augmente la surface d'échange. Ce paramètre influence l'extraction pour de nombreuses méthodes d'extraction (Wang, Weller 2006). Dans le cas des oléagineuses comme le soja la membrane cellulaire est imperméable aux solvants. Un autre type de fragmentation est préféré (écailles ou flocons) afin d'ouvrir les cellules pour libérer l'huile par diffusion dans le solvant.

Si le soluté est uniformément réparti dans la matrice, le solvant devra atteindre le soluté en profondeur dans la particule, la vitesse d'extraction sera ralentie, et à l'inverse, s'il est plutôt réparti en surface, elle sera plus rapide. Le type d'interaction entre soluté et matrice joue aussi un rôle important.

La polarité du solvant est un des facteurs déterminants pour l'extraction du soluté en question car l'affinité du soluté envers le solvant en dépend. Par exemple, le ratio d'eau et d'alcool dans les mélanges hydroalcooliques va donc être un paramètre important pour l'extraction de composés tels que les isoflavones (Cho, Lee *et al.* 2009).

La température du mélange est importante : son augmentation favorise en général la solubilité, facilite la diffusion du soluté et diminue la viscosité du solvant. Elle est limitée par la production de composés impropre et la dégradation des composés d'intérêt.

L'agitation du système qui a pour but de maintenir les particules en suspension facilite la diffusion du soluté hors de la matrice solide.

4.1.2. Extraction des polyphénols et cas spécifique des isoflavones

4.1.2.1. Extraction éthanolique conventionnelle

Les polyphenols sont extraits principalement pour leurs propriétés anti-oxydantes. Ainsi, des procédés d'extraction ont été mis au point ces dernières années à partir de résidus de l'industrie agroalimentaire. Dans ce cas, les solvants organiques utilisés sont généralement de type hydroalcooliques ou acétone (Moure, Cruz *et al.* 2001).

Bien que les solvants organiques comme le méthanol (pour les polyphénols) ou l'hexane (pour l'huile) puissent être éliminés des produits finaux par désolvatation, il n'en demeure pas moins que leur utilisation est de plus de plus écartée dans les procédés agroalimentaires, au profit de méthodes ayant à la fois un plus faible impact sur l'environnement et une dangerosité réduite. L'éthanol ou l'eau dans certaines conditions permettent de tendre vers ces exigences, ils ont montré une certaine efficacité pour l'extraction des isoflavones principalement lors de la préparation d'échantillons analytiques (voir section 4.2).

Tableau I-10. Mélanges hydroalcooliques utilisés pour les procédés d'extraction des isoflavones

Matière première	Méthode	Solvant	Echelle	Taux d'extraction	Référence
Farine de soja	Agitation magnétique	EtOH 53 %	2 g	92 %[a]	(Murphy, Barua *et al.* 2002)
Farine de soja	Agitation mécanique	EtOH 80 %	2 g	100 %[b]	(Achouri, Boye *et al.* 2005)
Isolat de protéine de soja	Agitation mécanique	EtOH 80 %	2 g	100 %[b]	(Achouri, Boye *et al.* 2005)
Tourteau de soja	Agitation mécanique	EtOH 50 %	50 g	nc[c]	(Kao, Chien *et al.* 2008)
	Reflux Soxhlet	EtOH 80 %	1 g	nc	(Xiao, Ye *et al.* 2011)

[a] *Quantité extraite sur quantité extraite par le meilleur solvant 54 % MeCN + HCl 0,1M*

[b] *Quantité extraite sur quantité extraite par le meilleur solvant 80 % MeCN + HCl 0,1M*

[c] *Non comparé avec acétonitrile ou solvant référence*

De très hauts rendements d'extraction sont observés à petite échelle avec l'utilisation d'éthanol entre 50 et 80 % que ce soient à partir de farine de soja ou d'isolat protéique (Tableau I-10). Ces résultats de rendement sont à relativiser compte tenu de la variabilité de la méthode de référence (qui donne la teneur totale en isoflavones initiales) selon les auteurs.

4.1.2.2. Extraction par fluides pressurisés

La réduction du nombre de solvants utilisables en industrie alimentaire a amené les industriels du secteur à étudier de nouvelles voies d'extraction comme les fluides pressurisés qui sont en grand développement.

L'état supercritique

Tous les corps purs sous pression comme les gaz ou l'eau peuvent atteindre un état appelé supercritique, cependant peu sont réalisables techniquement. Au-delà de la température critique (Tc) toute augmentation de la pression conduit à la formation d'un fluide condensé (supercritique) sans passer par l'état liquide. Au-delà de la pression critique (Pc) l'augmentation de la température aura pour effet de former un fluide moins dense et différent de l'état gazeux. Pour le CO_2-SC, la température critique est de $31°C$ et la pression critique de 74 bar. Par comparaison l'eau possède une Tc de 374°C et une Pc de 221 bars (Figure I-11). Un fluide supercritique peut être utilisé en tant que solvant pour l'extraction de composés naturels par exemple, les méthodes au CO_2-SC ayant été développées en premier lieu industriellement pour l'extraction d'hydrocarbures depuis les années 1970 (Lumia 2011). Cette extraction est équivalente à une extraction solide liquide classique avec une distribution inégale de divers constituants entre deux phases non miscibles. Il est possible de récupérer le CO_2 par regazéification. Outre l'aspect environnemental, l'intérêt des fluides supercritiques est qu'il est possible d'obtenir un solvant performant dont les propriétés physico-chimiques sont contrôlées (viscosité, diffusivité, polarité).

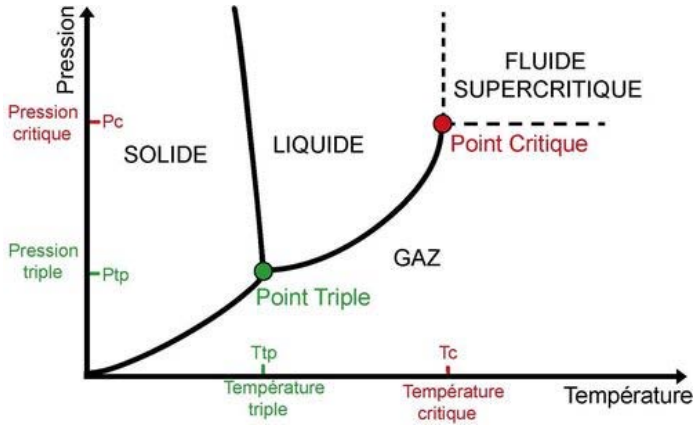


Figure I-11. Diagramme de phase d'un corps pur et zone supercritique

Dans le cas de l'eau il est difficile d'atteindre les conditions supercritiques et elles seraient causes de dégradation de composés d'intérêt au vu de la très haute température critique nécessaire, cependant il existe un « sous-état » appelé subcritique où l'eau est sous pression à l'état liquide au-delà de 100 °C. Dans cet état sub-critique, la constante diélectrique baisse modifiant le pouvoir de solubilisation. Ces méthodes sont intéressantes d'un point de vue environnemental du fait qu'elles peuvent éviter l'utilisation de solvants organiques.

L'eau subcritique et fluides pressurisés pour l'extraction des isoflavones

Les méthodes d'extraction par solvants pressurisés comme l'eau présurisée (dans certains cas eau en condition subcritique) sont de plus en plus étudiées pour leur compatibilité avec les contraintes environnementales (Mustafa, Turner 2011). Il est courant d'utiliser les termes anglophones PLE (Pressurized Liquid Extraction), PWE (Pressurized Water Extraction) afin de nommer ces techniques.

Généralement, à échelle laboratoire, un système ASE (Accelerate Solvent Extraction) est utilisé pour atteindre des conditions suffisantes de pression et de température. Le processus consiste en l'extraction d'une matière dans une cellule en acier inoxydable hermétique qui fait intervenir des étapes successives de remplissage de solvant jusqu'à des pressions de l'ordre de 100 bars (variable ou non selon les modèles), une montée en température, une phase statique de maintien de cette température puis un relargage du solvant par un flux de gaz dans des vials collecteurs. Ces systèmes ont pour but principal de préparer les échantillons pour être analysés mais ils permettent aussi d'étudier le potentiel des solvants sous pressions tel que l'eau. La mise à échelle industrielle est cependant rare. Pour une extraction de l'ordre du litre, un système autoclave est souvent proposé afin de déterminer une possible extrapolation industrielle (Li-Hsun, Ya-Chuan *et al.* 2004). Le traitement de protéines de soja et l'effet sur l'extraction des isoflavones a déjà pu être montré sur des quantités plus importantes à partir de systèmes haute pression (HPP pour High Pressure Food Processor) de capacité proche de 100 L (Jung, Murphy *et al.* 2008; Jung, Mahfuz *et al.* 2009).

Comparativement aux méthodes conventionnelles de type sonication, Soxhlet ou agitation mécanique l'utilisation d'un système ASE a permis d'améliorer l'efficacité d'extraction des isoflavones de soja à partir de farine (Klejdus, Mikelová *et al.* 2004; Luthria, Biswas *et al.* 2007). Néanmoins, la comparaison de

différents solvants montre qu'un mélange éthanol/eau 70 % donne le meilleur résultat (Rostagno, Palma *et al.* 2004; Luthria, Biswas *et al.* 2007), avec et sans ajout de 5 % de DMSO. Comparativement, l'eau pressurisée permet d'atteindre seulement 34 % des isoflavones totales dans la première étude et 26 % dans la seconde comparée à une extraction à l'éthanol 70 %. Ceci peut s'expliquer par le fait que les auteurs ont délibérément choisi une température de 60 °C afin d'éviter la dégradation des formes conjuguées et ce au travers d'une approche purement analytique, ces conditions ne permettant pas d'atteindre les conditions subcritiques de l'eau.

Dans un système autoclave de 2 litres, l'eau seule a montré une bonne efficacité d'extraction avec plus de 90 % des isoflavones extraites sur des conditions optimales déterminées à 110 °C, 641 psi et sur 138 min d'extraction, comparativement à des extractions références effectuées en Soxhlet par méthanol 80 % (Li-Hsun, Ya-Chuan *et al.* 2004). Cependant le suivi des formes conjuguées de type malonyles n'a pas été effectué lors de cette dernière étude ce qui, considérant que ces formes sont thermolabiles et prépondérantes dans le soja, peut influencer fortement les rendements d'extraction. De plus, une affinité différente peut être présente suivant le solvant utilisé.

Extraction des isoflavones par CO_2 supercritique

Bien que l'extraction au CO_2 supercritique concerne en général des composés peu polaires, elle a été étudiée dans le cas des isoflavones. Par ce biais, quelques études ont montrés qu'il est possible d'extraire ces composés avec l'aide d'un cosolvant alcoolique (Tableau I-11)

Tableau I-11. Extraction des isoflavones par CO_2 supercritique en présence de cosolvants

Cosolvant	Résultats (Rdt)	Matière première	Références
MeOH	>90 % (aglycones)	Feuilles clou de girofle / soja	(Klejdus, Lojková *et al.* 2005)
MeOH	40,50 %	Farine de soja	(Rostagno, Araújo *et al.* 2002)
EtOH	93 %	Isoflavones de synthèse	(Chandra, Nair 1996)
MeOH	87,30 %	Tourteau de soja	(Zuo, Zeng *et al.* 2008)
	25,65 %	Hypocotyles de soja	(Araújo, Silva *et al.* 2007)
EtOH	>90% (aglycones)	Soja	(Pyo, Yoo *et al.* 2009)
EtOH		Standards Isoflavone	(Nakada, Imai *et al.* 2009)
EtOH	65 %	Tourteau de soja	(Kao, Chien *et al.* 2008)

A partir de farine de soja, une étude a montré de faibles rendements à 40,5 % d'isoflavones extractibles (Rostagno, Araújo *et al.* 2002). En revanche, de hauts rendements, supérieurs à 90 %, ont été atteints à partir de standards d'isoflavones purifiées. En outre, les formes les plus polaires comme les glucosides ont été difficiles à extraire avec ce type de méthode et ce pour l'ensemble des études mentionnant le suivi de toutes des formes d'isoflavones de soja. Une autre étude montre que la solubilité des glucosides

est nulle et que celle des aglycones daidzéine et génistéine est de 5,14 x 10^{-10} et 6,38 x 10^{-10} mol-isoflavone/mol-$SCCO_2$ respectivement (Nakada, Imai *et al.* 2009). D'autres, ont montré qu'il est possible d'améliorer l'extraction des isoflavones polaires par l'utilisation de hauts débits de solvants. Cependant les formes aglycones sont parfois les seules à être suivies (Pyo, Yoo *et al.* 2009). La matrice végétale semble influencer fortement l'extractabilité des isoflavones particulièrement pour ce type d'extraction (Klejdus, Lojková *et al.* 2005). Des études sur 1 g et 100 g de tourteau de soja ont montré des rendements à 65 % avec l'éthanol en tant que modificateur et 87 % avec le méthanol.

4.2. Purification sur résine chromatographique

4.2.1. Aspects théoriques

4.2.1.1. Principe

Le principe consiste à retenir un ou des composés sur un support organique ou minéral de manière à l'enrichir par accumulation de composé. Aujourd'hui les adsorbants les plus utilisés sont soit naturels (charbons d'origine animale, charbon de bois, charbon actif, argile, zéolites) soit synthétiques (résines en polystyrène, polyacrylique, phénoliques, esters, zéolites synthétiques) (Kammerer, Carle *et al.* 2010). Les procédés de purification sur résines chromatographiques sont discontinus sauf dans le cas d'adsorbants mobiles. Une première phase consiste à retenir le composé d'intérêt sur un lit de résine suivi d'une phase d'élution ou de régénération qui consiste à désorber les composés d'intérêt ou seulement à régénérer la résine avec un solvant spécifique. Pour une pureté plus importante, un lavage intermédiaire peut être intercalé entre ces deux phases afin d'éliminer les impuretés situées dans l'espace interstitiel des billes de résine.

Pour la production d'un extrait de polyphénols par exemple, une extraction hydroalcoolique préalable est généralement utilisée, puis l'extrait est passé au travers d'un lit de résine pour adsorber les polyphénols, la résine est lavée avec de l'eau (pousse à l'eau des impuretés) pour être finalement éluée avec un solvant de polarité inférieure de type hydroalcoolique ou une solution à pH différent (NaOH, acides). Ainsi une fraction (éluat) contenant les polyphénols est récupérée avec un degré de pureté qui dépend des conditions de fonctionnement.

4.2.1.2. Mécanismes mis en jeux : les étapes de transfert

La fixation d'un soluté sur un support solide est un phénomène uniquement de surface qui est régit par cinq étapes, du transport de soluté jusqu'aux interactions physico-chimiques (Tableau I-12). La première étape est rarement discutée dans la littérature et les étapes 3 et 4 sont souvent fusionnées, on parle alors de diffusion externe (étape 2), diffusion intra-particulaire (étapes 3 et 4) et réaction d'adsorption (étape 5).

Tableau I-12. Les étapes du processus d'adsorption (Montgomery 1985)

	Etapes	Facteurs intervenant
1	Transport du soluté de la solution à la couche limite ou à la surface du film entourant la particule d'adsorbant	Taux d'advection Taux du mélange turbulent
2	Transport du soluté à travers le film de la couche limite jusqu'à la surface extérieure de la particule d'adsorbant	Taux de diffusion moléculaire
3	Diffusion du soluté au travers des pores, de la surface externe de la particule à la surface interne	Taux de diffusion moléculaire
4	Transport du soluté le long de la surface de la paroi des pores	Taux de diffusion moléculaire
5	Interactions physico-chimique du soluté sur les surfaces internes de l'adsorbant et de ses micropores	Niveau d'interaction physico-chimique en surface et dans les micropores

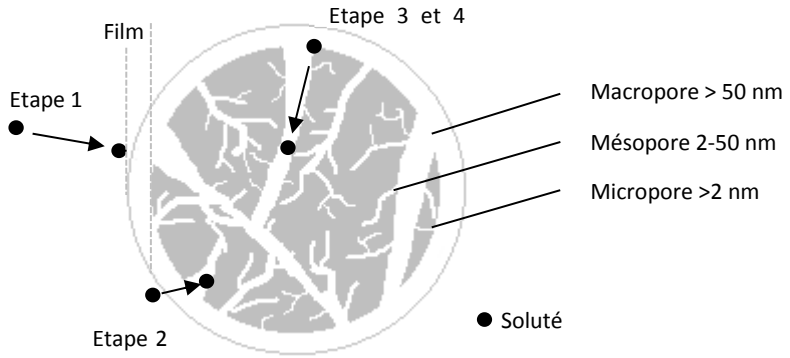


Figure I-12. Diffusion du soluté au travers d'une bille à structure poreuse (proposition de schéma illustrant les premières étapes du processus d'adsorption

4.2.1.3. Réaction d'adsorption

Il existe deux types d'interactions recherchés entre le solide et le soluté présent dans le fluide, la rétention par échanges d'ions ou bien l'adsorption. La nature du support est donc d'abord décrite selon cette caractéristique (résine adsorbante ou ionique) même si leur distinction est parfois partielle puisque ces deux phénomènes peuvent coexister lors d'une mise en contact entre adsorbant et soluté. Il existe, dans l'industrie agroalimentaire notamment, des procédés faisant intervenir des résines échangeuses d'ions (anioniques qui échangent des anions et cationiques qui échangent des cations) ainsi que des résines d'adsorption. Ces deux types sont utilisés pour la purification de polyphénols.

Les mécanismes de sorption ou d'échange sont différenciés en trois types : la physisorption (réversible et rapide) qui fait intervenir principalement des forces de Van der Waals (effet d'orientation, de dispersion ou d'induction) généralement considérées sous 50 kJ/mol ; la chimisorption qui fait intervenir des liaisons chimiques de 60 à 450 kJ/mol avec interactions électroniques et parfois l'ionosorption qui correspond à un transfert d'ions (lors de l'échange d'ions).

La polarité des constituants ou la présence de contre ions sont les premières caractéristiques intervenant dans leur catégorisation. Cependant d'autres critères influencent les capacités et les propriétés de la résine utilisée :

- La taille des particules, qui lorsqu'elle est réduite, tend à faciliter la capacité d'échanges en raccourcissant les chemins de diffusion
- La surface spécifique est aussi une caractéristique importante elle représente la somme des surfaces externes des particules de résines où a lieu l'adsorption et elle est inversement proportionnelle à la taille des pores
- La porosité interne qui est la proportion du volume des pores particulaires sur leur volume total
- La porosité apparente (bulk porosity) correspondant à l'espace interstitiel entre les particules qui forme des pores
- La densité de chaque particule de résine ou la densité apparente (bulk density) de la résine
- Le diamètre des pores qui est classé en 4 catégories (submicropore <0,4 nm, micropores 0,1 à 2,0 nm, mesopores de 2,0 à 50 nm et macropores au-delà de 50 nm de diamètre) d'après l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry standards). Ce diamètre influence les phénomènes d'adsorption et d'échanges, les macros et mésopores permettent le transport des solutés alors que l'adsorption et l'échange : d'ion ont lieu dans les micropores (Kammerer, Carle *et al.* 2010)

4.2.1.4. Description de l'adsorption par modélisations

L'adsorption est fréquemment étudiée au travers de trois niveaux mécanistiques. Le premier correspond aux isothermes d'adsorption pour déterminer l'équilibre d'adsorption avec l'influence de la capacité d'adsorption de soluté sur la résine en fonction de la concentration de soluté à l'équilibre. Des modèles cinétiques permettent de définir ensuite l'étape limitante du processus d'adsorption (diffusion au travers du film ou intra-particulaire). La réaction d'adsorption dite de surface est enfin décrite par d'autres modèles cinétiques.

Afin d'étudier et comprendre le comportement des composés sur les résines d'adsorption, deux types de mesures sont effectuées, les cinétiques d'adsorption et les isothermes d'adsorption qui fournissent des indications de base lors de l'étude des systèmes d'adsorption. A l'origine ils ont été déterminés à partir de système d'adsorption en phase gazeuse mais ont pu être appliqués avec succès à de nombreux cas

d'adsorption solide-liquide. L'isotherme de sorption décrit la rétention ou l'affinité d'un soluté sur la particule solide adsorbante suivant la relation $q = f(C)$ où q est la concentration du soluté retenu sur l'adsorbant et où C est la concentration du soluté restant dans la solution. Les grandeurs sont déterminées lorsque l'équilibre d'échange est atteint, que les paramètres physico-chimiques sont constants et pour une température fixée. Il est courant de calculer q par différence de concentration en soluté entre la solution introduite au départ, dans le système, et celle de la solution après adsorption.

Les principaux modèles d'isothermes sont présentés dans le Tableau I-13 avec les constantes d'adsorption K_H, K_L ou K_F qui peuvent être associées soit à un paramètre dimensionnel b_F mesurant l'intensité de l'adsorption pour Freundlich ou la capacité d'adsorption monocouche Q_{m_L} pour Langmuir (voir Chapitre II. Section 5.3.).

Il existe aussi des modèles à trois paramètres (Fritz-Schülner et Fukuchi) mais ils restent très peu utilisés. La forme des isothermes est communément classée en quatre types avec les lettres C, L, H et S (Figure I-13). Pour le premier, de type C, une droite passant à l'origine représente l'isotherme ce qui correspond au modèle de Henry par exemple. Le type L suggère une saturation progressive du solide avec une forme concave avec une capacité d'adsorption limitée ou non visible. L'isotherme de type H est un cas particulier d'isotherme de type L lorsqu'une grande affinité entre soluté et adsorbant est présente empêchant la détermination d'une pente à l'origine. Le type S est associé à une forme sigmoïdale avec point d'infection qui est induite par deux mécanismes opposés, une affinité faible des composés organiques apolaires dans un premier temps et une affinité plus forte d'autres composés sur ceux déjà adsorbés. On parle d'adsorption coopérative. Les isothermes classiques de Langmuir et Freundlich sont de forme L ou H.

Tableau I-13. Les principaux modèles d'adsorption utilisés dans les procédés agroalimentaires (Masel 1996; Kammerer, Carle et al. 2010)

Nombre de paramètres	Type de modèle	Equation du modèle	Principe théorique
0	Irréversible	$qe = constante$	Indépendant de la concentration initiale, solutions très concentrées
1	Henry	$qe = K_H Ce$	Les sites d'adsorption sont identiques et occupés Les interactions entre composés en surface sont exclues
2	Langmuir	$qe = \frac{Q_{mL} a_L C_e}{1 + a_L C_e} = \frac{K_L C_e}{1 + a_L C_e}$ $\frac{1}{q_e} = \frac{1}{K_L C_e} + \frac{1}{Q_{m_L}}$	Physisorption des particules neutres par la surface de l'adsorbant Sites énergétiquement homogènes Recouvrement monomoléculaire de l'adsorbant sur un site Taux de désorption indépendant de l'occupation des sites d'adsorption voisins
2	Freundlich	$q_e = K_F C_e^{b_F}$ $log\ qe = log\ K_F + b_F\ log\ C_e$	Recouvrement monocouche de l'adsorbant Sites de sorption hétérogènes

Les paramètres et constantes sont décrits plus amplement dans la partie matériels et méthodes (Chapitre II. section 5.3.)

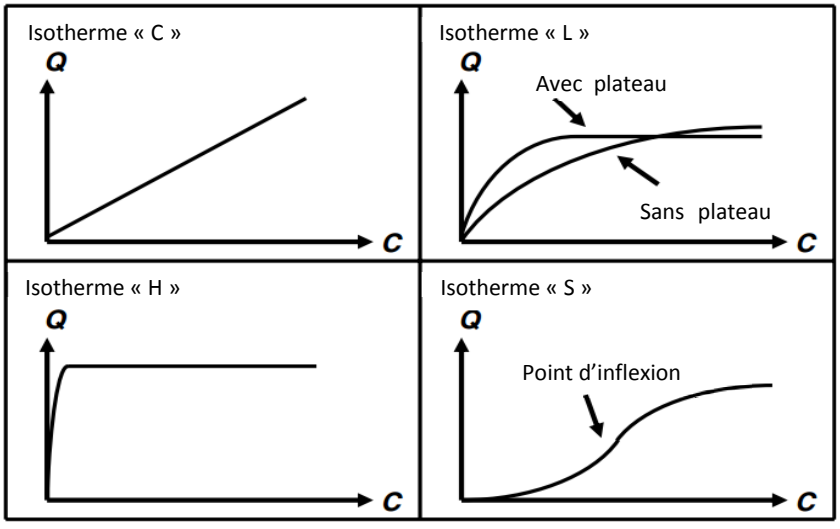


Figure I-13. Représentation des quatre formes d'isothermes de Giles (Limousin, Gaudet et al. 2007)

L'aspect cinétique est fréquemment étudié selon deux niveaux, des modèles qui décrivent la diffusion du soluté, ce qui permet de connaître l'étape limitante du processus (Tableau I-14), et d'autres qui décrivent la réaction d'adsorption qui permet de déterminer quels types d'interactions la régissent

(Tableau I-15). Ils permettent aussi d'obtenir des constantes cinétiques pour pouvoir comparer par exemple différents composés ou conditions.

Tableau I-14. Les modèles de diffusion durant le processus d'adsorption

Nom	Equation du modèle	Principe
Weber-Morris	$q_t = k_{int} t^{1/2}$	Diffusion intra particulaire limitante
Boyd	$\ln(1 - \frac{q_t}{q_e}) = -R^l t$	Diffusion au travers du film

Tableau I-15. Les modèles cinétiques décrivant la réaction d'adsorption

Nom	Equation du modèle	Principe
Pseudo-premier ordre	$\frac{\mathrm{d}q_i}{\mathrm{d}t} = k_{p1}(q_e - q_t)$	Mono occupation de site
Pseudo-second ordre	$\frac{\mathrm{d}q_i}{\mathrm{d}t} = k_{p2}(q_e - q_t)^2$	Double occupation de sites, chimisorption, forces de valence ou échanges d'électrons
Elovich	$\frac{\mathrm{d}q}{\mathrm{d}t} = a\mathrm{e}^{-\alpha q}$	Dépendance au taux initial d'adsorption Prise en compte de la constante de désorption

Les paramètres et constantes sont décrits plus amplement dans la partie matériels et méthodes (Chapitre II. section 5.3.)

4.2.2. Rétention des isoflavones

4.2.2.1. Production d'extraits à petite échelle en chromatographie préparative

Sur les mêmes bases que la chromatographie analytique (discutée en section 4.2.), la chromatographie préparative peut permettre la séparation et la purification des différentes isoflavones. Le procédé de séparation fait généralement intervenir une phase d'extraction au méthanol et de purification au travers d'une colonne préparative C18 en phase inverse suivie d'une ultra-filtration à petite échelle avec un seuil de coupure de 5000 Da pour éliminer les impuretés notamment protéiques (Figure I-14).

Des étapes de cristallisation permettent d'atteindre des puretés très hautes afin d'obtenir des extraits purs d'isoflavones aglycones génistéine et daidzéine.

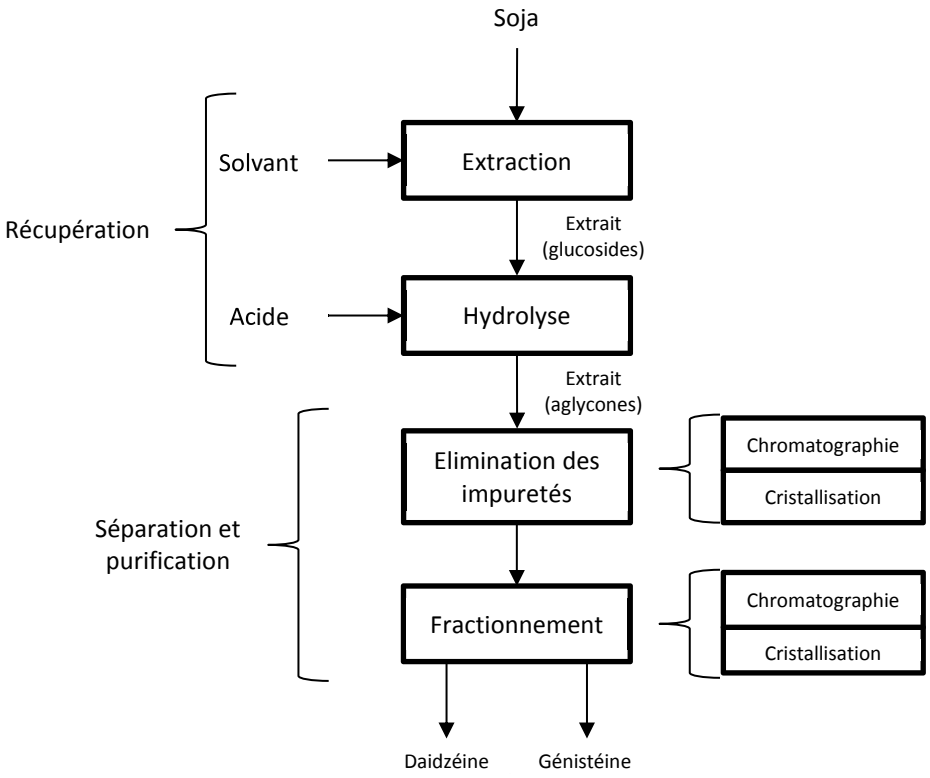


Figure I-14. Les grandes étapes de la production d'extraits purifiés d'isoflavones de soja (Giles, Smith et al. 1974; Harjo, Wibowo et al. 2006)

4.2.2.2. Procédé de purification chromatographique sur colonne

La purification des polyphénols sur colonne de résine chromatographique est une méthode qui a su s'imposer ces dernières années que ce soient pour la décoloration des jus (fixation de polyphénols colorés) ou pour la production d'extraits riches en polyphénols pour le marché des nutraceutiques. La rétention d'isoflavones est précédée, comme en chromatographie préparative ou analytique, d'une étape d'extraction. La résine est déposée dans une colonne au travers de laquelle passe l'extrait (souvent méthanolique ou éthanolique) qui peut être réalisée avec un mélange d'éthanol et d'eau (80/20) (Cho, Lee *et al.* 2009).

Contrairement aux méthodes analytiques, où l'acétonitrile et le méthanol sont les solvants les plus utilisés, il convient de plus en plus d'utiliser des solvants compatibles avec une application alimentaire et respectant certains critères de la chimie verte dans les procédés de purification. Ainsi l'extraction préalable des isoflavones à la rétention sur résine est effectuée avec de l'éthanol ou une solution aqueuse parfois en mode pressurisé. Ce type de solvant, aqueux ou hydroalcoolique permet la rétention et la désorption sur résine en jouant sur leur affinité hydrophobe. Le type de résine choisi, pour ce genre d'application, est donc de nature hydrophobe dans une large majorité des cas avec des copolymères de styrène-divinylbenzène, des polymères d'acrylique, de styrène. Des cas plus isolés et plus récents font état de l'utilisation de charbon actif et de chitosan pour l'adsorption d'isoflavones. Ils ont montré une certaine efficacité même si la désorption n'a pas été étudiée dans le premier cas (Shi, Kong *et al.* 2013;

Liu, Wu *et al.* 2014). Dans toutes les études mentionnées Tableau I-16, l'adsorbant possède généralement une grande surface spécifique supérieure à 300 m^2/g avec une taille moyenne des pores très variable de 50 à 600 Å. Les rendements d'adsorption, lorsqu'ils sont fournis, sont très hauts, souvent supérieurs à 90 % d'isoflavones adsorbées. La désorption semble plus difficile donnant des taux de désorption faibles ainsi qu'une pureté en isoflavones de l'ordre de 30 à 50 % (teneurs qui sont aussi celles des extraits d'isoflavones présents sur le marché nutraceutique). Ces tendances ne sont pas observées pour l'étude sur la résine AB-8, qui fournit des taux de désorption et des puretés beaucoup plus importantes ce qui est probablement dû à une méthode d'extraction préalable par solvant en mode multi-étagé et très différent par sa nature (acétate d'éthyle) et non compatible avec un procédé alimentaire tel qu'il est proposé dans ce travail de thèse. Il existe cependant un brevet qui mentionne des puretés beaucoup plus hautes de l'ordre de 70 à 100 % associées à des rendements supérieurs à 90 % avec l'utilisation de résines chromatographiques d'adsorption (XAD 1600, Tulsion ADS 600 et Dow Optipore SD-2), à partir de molasse (extrait éthanolique aqueux issu de la production de concentrés protéiques).

Tableau I-16.Caractéristiques des adsorbants utilisés dans la littérature pour la fixation des isoflavones et le type de solvant utilisé pour l'adsorption et la désorption

Références	Nom de l'adsorbant	Extrait	Eluant	Surface spécifique (S_{BET})	Taille des pores	Résultats (%)	Type d'adsorbant
(Cho, Lee *et al.* 2009)	Amberlite XAD-2 (S-DVB)	EtOH 80 %	EtOH 80 %	300 m^2/g	90 Å	T_{ads} 86,7	Résine adsorbante
	Diaion HP-20 (S-DVB)	EtOH 80 %	EtOH 80 %	500 m^2/g	260 Å	T_{ads} 88,5	
(Gugger, Dueppeu 1997)	Dow XUS 40323 (DVB, Ethyle-DVB)			650 m^2/g	100 Å	P_{IF} 33	Résine adsorbante
(Shi, Kong *et al.* 2013)	Sinopharm CR (CA)	MeOH		1390 m^2/g		T_{ads} 98	Charbon actif
(Li-Hsun, Ya-Chuan *et al.* 2004)	XAD16-HP (S-DVB)	Eau pressurisée	MeOH 80 %	800 m^2/g	100 Å	P_{IF} 37 T_{des} 24,3	Résine adsorbante
(Li-Hsun, Ya-Chuan *et al.* 2007)		EtOH pressurisé	MeOH 80 %			P_{IF} 58 T_{des} 41	
(Li, Liu *et al.* 2012)	AB-8 (PS)	Acetate d'éthyle	EtOH 70 %	500 m^2/g	130 Å	T_{ads} 90,8 T_{des} 93,3	Résine adsorbante
(K. Hilaly, Sandage *et al.* 2004)	Optipore SD-2	Mélasse extrait EtOH/Eau		800 m^2/g	50 Å	P_{IF} 90	Anioniques Adsorbantes
	Tulsion ADS 600			550 m^2/g		P_{IF} 99 P_{IF} 97	
	XAD 1600			700 m^2/g		P_{IF} 90	

S-DVB Styrène-divinylbenzène ; CA Charbon Actif ; PS Polystyrène ; T_{ads} pour taux d'adsorption des isoflavones sur la résine ; P pour pureté finale après élution ; T_{des} pour taux de désorption

5. Aspects nutritionnels des protéines végétales

5.1. Valeur protéique : importance des acides aminés essentiels

Les acides aminés essentiels sont des composés que l'Homme ne peut pas produire et doit nécessairement retrouver dans son alimentation. Il s'agit des acides aminés suivants : histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane et valine que l'on retrouve dans la plupart des viandes mais qui sont souvent absents dans les végétaux. Il est donc habituel d'associer la valeur protéique d'un aliment en prenant en compte de sa teneur en protéines mais aussi la composition en acides aminés. Par exemple, les protéines végétales sont plus pauvres en lysine que les matières animales et la plupart des céréales sont très pauvres en lysine. Au contraire, les légumineuses (soja) en contiennent plus mais sont légèrement déficientes en acides aminés soufrés et tryptophane. Il est courant d'utiliser la valeur biologique des protéines qui décrit l'efficacité d'incorporation de ces acides aminés dans l'organisme. Dans ce sens, l'œuf est pris comme référence en nutrition car il contient les protéines les plus équilibrées avec une valeur biologique de 98 %. Les protéines végétales peuvent ainsi être comparées à celle de l'œuf.

5.1.1. Teneur recommandée en acides aminés essentiels

Pour l'alimentation infantile notamment, la FAO recommande un apport journalier pour chaque acide aminé essentiel exprimé en mg d'acides aminés par kg de poids corporel et par jour. Un profil recommandé en acides aminés en est alors calculé et préconisé, exprimé en mg d'acides aminés par g de protéines (Tableau I-17).

Tableau I-17. Profil en acides aminés essentiels recommandés par la FAO pour l'alimentation infantile (mg/g de protéines)

	Histidine	Isoleucine	Leucine	Lysine	SAA*	AAA	Thréonine	Tryptophane	Valine
0 à 0,5 ans	21	55	96	69	33	94	44	17	55
0,5 à 3 ans	20	32	66	57	27	52	31	8,5	43
3 et plus	16	30	61	48	23	41	25	6,6	40

** SAA acides aminés soufrés (méthionine + cystéine) ; AAA acides aminés aromatiques (phénylalanine + tyrosine)*

La valeur nutritionnelle d'un isolat protéique va donc dépendre de sa proximité avec une telle recommendation concernant l'alimentation infantile. Pour les nourrissons, la recommendation est basée sur la composition du lait maternel puis sur la composition en acides aminés des tissus humains.

5.1.2. Digestibilité des protéines

La digestibilité d'une protéine est un facteur déterminant dans la prise en compte de sa valeur nutritionnelle. Elle est déterminée par la proportion d'azote réellement absorbée en mesurant la teneur en azote de l'aliment en question et celle des matières fécales ou iléales de l'organisme. L'utilisation du PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) ou plus récemment du DIASS (Digestible Indispensable Amino Acid Score) est conseillé par la FAO (Nations 2013). En français ce terme est parfois traduit par SCCD (Score Chimique Corrigé de la Digestibilité). Il permet de tenir compte de l'absorption des acides aminés dits limitants (acides aminés essentiels les moins présents). Ce score peut prendre des

valeurs différentes selon le mélange dans lequel est incorporée la protéine ou en fonction de l'âge de l'individu ciblé. Ainsi la FAO distingue trois tranches d'âge, de la naissance à 6 mois, de 6 mois à 3 ans et au-delà de 3 ans. Pour l'utilisation d'isolats protéiques dans les produits pour nourrissons, cette caractéristique est donc très importante.

5.1.3. Intérêts nutritionnels des protéines de soja et de riz

Les protéines de soja sont peu coûteuses et de bonnes qualités nutritives. Leur profil en acides aminés est bien équilibré exceptée qu'elles contiennent peu de d'acides aminés soufrés. Elles permettent de remplacer les protéines de lait pour des raisons de santé, culturelles ou religieuses comme l'allergie aux protéines de lait de vache ou l'alimentation végétalienne (Li, Zhu *et al.* 2013). Les protéines de riz sont de meilleures qualités nutritionnelles que les autres protéines végétales fréquemment utilisées même si elles contiennent parfois peu de lysine. Comparativement aux protéines animales, des études ont montré que les protéines de son de riz ont des qualités nutritionnelles proches et intéressantes même si elles ont une biodisponibilité plus faible (Han, Chee *et al.* 2015).

5.2. Présence de facteurs antinutritionnels

5.2.1. Les facteurs antinutritionnels identifiés dans le soja

Malgré la haute qualité des protéines de soja, des composés appelés facteurs antinutritionnels freinent leur digestibilité ou altèrent la qualité des produits protéiques. Ils peuvent engendrer des retards de croissances par exemple. Dans le soja, les plus importants sont éliminés par traitements thermiques mais d'autres sont persistant et sont détectables dans les farines ou produits raffinés après les procédés de transformation (Tableau I-18).

Tableau I-18. Les facteurs antinutritionnels thermolabiles et résistants aux traitements thermiques (Liener 1994)

Thermolabile	Résistant à la chaleur
Inhibiteur de protéase	Saponines
Lectines	Tannins
Goitrogènes	Œstrogènes (isoflavones)
Anti-vitamines	Facteurs de flatulence
Acide phytique (pour un traitement long)	Lysinoalanine
	Acide phytique (pour un traitement court)

Les inhibiteurs de protéase sont connus depuis les années 1930 et sont divisés en deux groupes de taille, les uns autour de 20 kDa et les autres entre 6 et 10 kDa, respectivement nommés Kunitz et Bowman-Birk inhibiteurs (Liener 1994). Un traitement thermique situé dans le procédé de production de farine et d'isolat entraine une diminution de près de 90 % de leur teneur. Cependant dans la farine brute, non traitée thermiquement, les inhibiteurs de protéases n'interviennent qu'à hauteur de 40 % dans l'inhibition de croissance. Les lectines, d'un poids moléculaire moyen de 120 kDa comme l'agglutinine (Lotan, Siegelman *et al.* 1974), sont aussi rapportées comme ayant un rôle important dans cette inhibition. La présence d'acide phytique altère à la fois l'absorption et peut diminuer la digestibilité des protéines. Il est donc à double titre, classé comme facteur antinutritionnel majeur du soja. Il peut être éliminé par traitements thermiques long, ultra-filtration, échange d'ion, changement de pH lors des procédés, mais la méthode la plus simple est l'action de la phytase endogène qui dégrade l'acide

phytique dans une suspension de farine à 65°C. Ce processus peut aussi être induit lors de la production de produits fermentés traditionnels (Liener 1994). Des techniques d'ultrafiltration pour la production d'isolat appauvri en acide phytique ont été mises en place durant ces dernières années (Lai, Mondor *et al.* 2013).

Parmi les autres facteurs antinutritionnels d'importance secondaire, les goitrogènes peuvent être responsables d'une hypertrophie de la thyroïde en empêchant l'assimilation d'iode. Ils sont concentrés lors de la fabrication de tofu et détectés sous forme de traces dans les autres produits protéiques mais les composés responsables de ces effets n'ont pas été étudiés.

Liener (Liener 1994) cite aussi les facteurs suivants : les tannins comme ayant un rôle dans la formation de substrat enzyme-résistant entrainant une indigestibilité de certains composés protéiques ; les saponines qui ont un léger effet sur la perméabilité cellulaire de la muqueuse intestinale et le transport des nutriments ; les facteurs de flatulences qui sont des oligosaccharides éliminés par des extractions alcooliques ou lors de la production d'isolat ; les anti-vitamines A, B12, D ou E.

Les procédés peuvent entrainer aussi la présence de facteurs antinutritionnels, par exemple lors de la solubilisation à un pH au moins égal à 9 il y a formation de lysinoalanine (Friedman, Levin *et al.* 1984), avec transformation des lysines et cystines, à laquelle est attribuée une toxicité. De plus ces pH élevés entrainent une très forte baisse de la digestibilité des acides aminés soufrés (méthionine, cystéine) et d'histidine (Fabian, Ju 2011).

Les isoflavones, qui peuvent être classées comme facteur antinutritionnel, sont présentées plus largement section 5 étant donné qu'elles sont la cible principale de ce projet de recherche.

5.2.2. Les facteurs antinutritionnels identifiés dans le riz

Le riz a été moins étudié pour ses facteurs antinutritionnels mais certains composés ont pu être identifiés. L'acide phytique est aussi présent dans le riz, à hauteur de 32 à 63 mg/g dans le germe et le son de riz (Moongngarm, Daomukda *et al.* 2012) contre 20 à 40 mg/g dans le grain de soja. La lysoalanine peut aussi être présente en fonction du procédé notamment lors de l'extraction des protéines à pH basique. Un inhibiteur de trypsine a aussi été identifié, il peut être éliminé par traitement à la vapeur (Juliano 1994) comme l'oryzacystatine inhibiteur de la protéinase de la cystéine, et une lectine.

Récemment une exposition importante à l'arsenic a été montrée lors de la consommation de riz, due à la capacité de fixation de certains métaux lourds, cette caractéristique est cependant liée au mode de culture plutôt qu'aux caractéristiques intrinsèques du riz.

5.3. Allergenicité des protéines

5.3.1. Explication synthétique de l'allergie alimentaire

D'après l'AFFSA, parmi les réactions allergiques connues, on distingue l'allergie alimentaire « vraie » par opposition aux fausses allergies alimentaires. Il s'agit d'une « manifestation clinique apparaissant après l'ingestion d'un allergène alimentaire (appelé trophallergène) » (Dubuisson, Vieille *et al.* 2002). Cette réaction implique un mécanisme IgE dépendant. Le mécanisme de réaction allergique IgE de type I s'effectue en deux étapes : la sensibilisation et la réaction allergique. La symptomatologie clinique

montre diverses réactions (généralisées, oro-pharyngées, gastro-intestinale, respiratoires, cutanéomuqueuses). La prévalence de ces allergies serait en augmentation. Il existe d'autres types de réactions souvent confondues avec l'allergie vrai, les allergies croisées qui sont induites par la reconnaissance d'allergènes homologues à ceux qui ont produit une sensibilisation ; les intolérances alimentaires (déficit d'enzyme pour le lactose à ne pas confondre avec l'allergie aux protéines de lait de vache) ; les fausses allergies alimentaires après ingestion d'un aliment riche en histamine ou tyramine (fromages, vin, aliments fumés, boissons fermentées, conserves de poisson).

Par ordre de fréquence, l'œuf (34 % des cas), l'arachide (25 %), le lait (8 %) et le poisson (5 %) sont les principales sources d'allergènes en France chez l'enfant. Chez l'adulte ce sont les fruits du groupe « latex » (kiwi, banane, avocat) qui sont les principales sources d'allergies (allergie croisée au latex) suivis par les rosacées, les fruits secs oléagineux et ombellifères. Certaines protéines de soja provoquent des allergies de type I (IgE) et il existe des allergies croisées (avec les allergies aux protéines de lait).

5.3.2. Les allergènes connus

5.3.2.1. Dans le soja

De nombreuses graines, notamment les fruits à coques ou les légumineuses, possèdent des protéines dites à motifs cupine qui sont responsables d'allergies fréquentes (Rougé, Brunet *et al.* 2011). De par leur résistance à la dénaturation, et leur structure très compacte, elles ont de forts pouvoirs allergènes. La glycinine (7S) du soja en fait partie et est particulièrement réactive. La β-conglycinine est aussi considérée comme allergène par certains auteurs. Ces globulines ont plus particulièrement des sous-unités décrites comme responsables de l'allergenicité (fixation sur les IgE) avec des poids moléculaires variables. Les plus petits polypeptides vont de 7 kDa à 15 kDa (nommés Glym 1a, 1b, 2 ou 3), des polypeptides de tailles intermédiaires avec le « Kunitz » inhibiteur de trypsine (20 kDa), la lectine et l'agglutinine (32 kDa). Ensuite des fractions à plus haut poids moléculaire sont aussi identifiées, issues de la glycinine (autour de 30 et 50 kDa) ainsi que les sous-unités α et β de la β-conglycinine (42 kDa et 63 à 70 kDa) (Cordle 2004; Wilson, Blaschek *et al.* 2005; Wang, Qin *et al.* 2014). Malgré un manque de données à ce sujet, certains épitopes sont identifiés chez les protéines de soja (séquence d'acides aminés précisément responsables de la reconnaissance par les IgE). C'est le cas des chaines acides localisées sur la glycinine où plus d'une dizaine d'épitopes sont identifiés (par exemple l'épitope G217-V235 avec la séquence d'acide aminés suivante GGSILSGFTLEFLEHAFSV).

5.3.2.2. Dans le riz

Les protéines de riz sont considérées comme étant hypoallergéniques car elles ne contiennent pas de gluten principal responsable des allergies liées aux céréales, cependant on retrouve des allergies liées à l'inhibiteur α-amylase ayant un poids moléculaire de 14 à 16 kDa (Pauli 2011; González-De-Olano, Pastor-Vargas *et al.* 2012). L'allergie aux protéines de riz est particulièrement fréquente au Japon mais très rare dans les autres régions du Monde. Elles peuvent donc être utilisées dans l'objectif de réduire le risque allergénique.

5.3.3. Diminution de l'allergenicité des protéines

5.3.3.1. Les protéines de soja et de riz pour diminuer le risque d'allergie

Malgré leurs caractéristiques, les protéines de soja sont moins immunoréactives que la plupart des autres protéines consommées par l'Homme (Pediatrics 2000; Cordle 2004). Comparativement au lait de vache, les protéines de soja représentent, d'un point de vue immunoréactivité, une alternative intéressante. Parmi les enfants allergiques au lait de vache, 8 % développent une allergie au protéines de soja alors que 2 % d'entre eux réagissent lors de l'ingestion de protéines hydrolysées de lactosérum de vache (Klemola, Vanto *et al.* 2002). Concernant la règlementation européenne, et plus spécifiquement l'incorporation de protéines végétales dans les préparations infantiles, celle-ci autorise l'utilisation de protéines de lait de vache ou de chèvre, d'isolat protéique de soja et l'utilisation d'hydrolysat de protéines d'origines et de poids moléculaires non spécifiés (European Food Safety Authority 2014). A ce jour, la seule source de protéines végétales natives (non hydrolysées) autorisée en Europe, pour ce type d'application, est donc le soja. Les protéines de riz, bien que généralement beaucoup moins utilisées à ce jour, sont une alternative intéressante aux protéines classées comme allergènes. Elles connaissent un intérêt croissant avec l'apparition de concentrés et d'hydrolysats de protéines de riz sur le marché.

5.3.3.2. Les méthodes de réduction de l'allergenicité

Les protéines de lait représentant la première source d'allergie. Des méthodes de dénaturation par chauffage ou par hydrolyse par protéase à partir de caséine ou de lactosérum existent depuis plusieurs années (Saperstein 1965) ; (Mahmoud, Malone *et al.* 1992) ; (Fritsché 1998; Klemola, Vanto *et al.* 2002). Ces produits sont cependant considérés comme plus chers, notamment dans les pays en développement où les produits à base de soja représentent une alternative intéressante (Li, Zhu *et al.* 2013). Bien que les protéines de soja engendrent moins fréquemment une réaction allergique chez le nourrisson (Pediatrics 2000), il convient de trouver des méthodes pour réduire cette allergenicité. Ces dernières sont présentées dans le Tableau I-19. Les méthodes biochimiques représentent la majeure partie des travaux sur la diminution de l'allergenicité et sont mentionnés dans plusieurs brevets.

Tableau I-19. Méthodes utilisées afin de diminuer l'allergenicité des protéines de soja

Méthode	Matière première	Référence
Physique		
Extrusion	Hypocotyles de soja	(Saitoh, Urushibata *et al.* 2000)
Haute pression	Isolat protéique de soja	(Li, Zhu *et al.* 2012)
	Graine de soja, tofu	(Peñas, Gomez *et al.* 2011)
Chimique		
Extraction alcoolique	Graines de soja	(Sissons, Nyrup *et al.* 1982)
Glycation *in vitro*	Isolat protéique de soja	(Van de Lagemaat, Manuel Silván *et al.* 2007)
Biochimique		
Hydrolyse enzymatique	Protéines de soja	(Tsumura, Kugimiya *et al.* 1999) (Fritshe, Bovetto 2006)
Fermentation	Produits commerciaux fermentés	(Frias, Song *et al.* 2008) (Song, Frias *et al.* 2008) (Lee, Lee *et al.* 2004) (Amnuaycheewa, de Mejia 2010)

Afin de produire des ingrédients hypoallergéniques, deux alternatives sont envisagées :

- la production d'un hydrolysat de protéines de soja, à partir d'isolat protéique, mais pour laquelle une attention particulière est portée sur la réduction de la teneur en isoflavones

- la production d'hydrolysat protéique de riz où l'effort de recherche doit être concentré au préalable sur la purification des protéines afin d'obtenir un produit à plus de 90 % de protéines même si, à ce jour, l'utilisation du terme hydrolysat n'impose pas nécessairement une telle teneur. L'hydrolyse enzymatique des protéines végétales est la méthode privilégiée pour atteindre ces objectifs.

5.4. L'hydrolyse enzymatique des protéines végétales

5.4.1. La réaction d'hydrolyse des protéines

La réaction d'hydrolyse correspond à la rupture de la liaison peptidique entre deux unités d'acide aminé. Pour l'exemple, cette réaction réalisée sur un tripeptide est présentée Figure I-16.

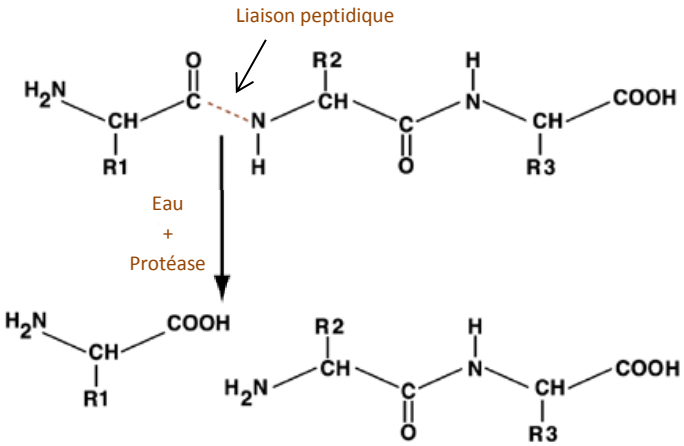


Figure I-16. La réaction d'hydrolyse par protéase sur un tripeptide

5.4.2. Différents types de protéases

Les protéases sont les enzymes les plus utilisées dans l'industrie et les plus représentés sur le marché. L'hydrolyse de la liaison peptidique peut avoir lieu aux extrémités des polypeptides ou à l'intérieur des chaines, on parle respectivement d'exopeptidase et d'endopeptidase. Les exopeptidases sont dissociées en deux catégories suivant la nature du substrat qu'elles hydrolysent, les aminopeptidases et les carboxypeptidases qui clivent respectivement les parties N-terminale ou C-terminale. D'après la base de données MEROPS (base de données britannique sur les peptidases) les endoprotéases sont classées selon leur mécanisme d'action en 7 catégories : Aspartique, Cystine, Glutamique, Métallo, Asparagine, Sérine et Thréonine (González-Rábade, Badillo-Corona *et al.* 2011). Ces acides aminés correspondent à des résidus particuliers sur les sites catalytiques de l'enzyme en question (non pas sur le substrat de l'enzyme).

5.4.3. Autres intérêts de l'hydrolyse enzymatique des protéines

L'hydrolyse des protéines peut être réalisée chimiquement, par acide ou base, mais elle est dans ce cas peu contrôlable et le profil en acides aminés peut être fortement modifié, avec la dégradation possible d'acides aminés comme le tryptophane dans les conditions acides fortes. Il peut se produire la réduction de la teneur en cystine, arginine, thréonine, sérine, isoleucine et lysine en conditions basiques (Tavano 2013). Ceci s'ajoute à la formation de lysoalanine et orlanthionine classés comme potentiellement toxiques. L'avantage de l'hydrolyse enzymatique *a contrario* permet l'utilisation de conditions plus douces tout en évitant des réactions secondaires. Ceci participe à l'obtention d'hydrolysats ayant des valeurs nutritionnelles très proches des protéines natives. La spécificité de chaque protéase peut permettre de tendre vers la maîtrise des caractéristiques chimiques et nutritionnelles des hydrolysats de protéines. Cependant l'hydrolyse totales des protéines en peptides est jusqu'à ce jour impossible du fait de à la présence complexe et parfois mal identifiée d'inhibiteurs, de cofacteurs et de phénomènes d'autolyse.

Outre la diminution de l'allergie, d'autres propriétés sont recherchées par l'action des protéases (Tableau I-20).

Tableau I-20. Effets recherchés des protéases sur les propriétés fonctionnelles d'un aliment (Tavano 2013)

Propriétés fonctionnelles visées	Mécanismes mis en jeux
Solubilité	Hausse du nombre des extrémités ioniques N et C-terminales Diminution de la surface hydrophobe
Pouvoir émulsifiant	Pour de faibles degrés d'hydrolyse, solubilité accrue par hydrolyse mais présence nécessaire de peptides plus grands conférant des propriétés amphiphiles
Gélification, pouvoir moussant	Possible avec hydrolyse partielle, association des filaments protéiques
Réduction de l'allergénicité	Dégradation des épitopes, hydrolyses poussées des protéines avec poids moléculaire sous 5000 Da ou 3000 Da
Saveur, fabrication de fromage	Non déterminé, très complexe
Libération de peptides bioactifs	Libération de fragments différents de ceux produits lors de la digestion

Dans les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit, la réduction de l'allergénicité est la principale fonction visée mais la solubilisation des protéines est aussi importante pour la commercialisation de ce type d'ingrédient destiné à être introduit dans des préparations alimentaires infantiles à solubiliser. De plus, l'hydrolyse peut apporter une meilleure digestibilité pour des hydrolysats de soja ou de riz (Xia, Wang *et al.* 2012; Li, Zhu *et al.* 2013).

5.4.4. Les hydrolysats hypoallergéniques

Une première approche de l'étude du profil de poids moléculaire permet de pouvoir caractériser les produits potentiellement hypoallergéniques comme cela est mentionné dans le Tableau I-20. Avant l'utilisation d'études coûteuses, de type études *in vitro* et cliniques, il convient de déterminer les profils de poids moléculaires induits par l'hydrolyse des protéines. Le profil de poids moléculaires est déterminé classiquement par électrophorèse SDS-PAGE et par exclusion stérique (appelée Gel Permeation Chromatography ou Size Exclusion Chromatography). La diminution du pouvoir allergène des hydrolysats dépend du degré d'hydrolyse, de la proportion en peptides de faibles poids moléculaires, et peut être influencée par les méthodes de séparation post-hydrolyse (élimination de protéines résiduelles de haut poids moléculaire). Plusieurs types de préparation existent (Maldonado, Gil *et al.* 1998; El-Agamy 2007; Du Toit, Meyer *et al.* 2010) :

- les formules avec un taux d'hydrolyse dit partiel dont les poids moléculaires sont compris entre 8000 et 20000 Da
- les formules ayant un taux d'hydrolyse « poussé » ou « extensif » avec des poids moléculaires sous le seuil de 5000 Da ou 3000 Da (Du Toit, Meyer *et al.* 2010)
- les formules constituées d'acides aminés

Seuls les hydrolysats poussés et les formules avec acides aminés peuvent être considérés comme hypoallergéniques (Du Toit, Meyer *et al.* 2010). Une hydrolyse partielle peut entrainer l'augmentation de l'exposition de certains épitopes et donc favoriser l'allergie. Parmi les différentes sources de protéines, les hydrolysats de caséine existent depuis une soixantaine d'années et plus tardivement ce sont les hydrolysats de lactosérum puis de protéines végétales qui sont apparus sur le marché.

Afin de pouvoir porter une allégation « hypoallergénique » la directive 2006/141/EC impose notamment que :

- « la quantité de protéines immunoréactives mesurée à l'aide de méthodes généralement acceptées est inférieure à 1 % des substances contenant de l'azote dans les préparations ».
- « La préparation pour nourrissons est tolérée par plus de 90 % des nourrissons souffrant d'hypersensibilité aux protéines qui sont à la base de l'hydrolysat» ce qui correspond à la définition clinique de l'hypoallergénicité (Du Toit, Meyer *et al.* 2010).

L'EFSA établit que les hydrolysats de protéines utilisés pour une application hypoallergénique doivent avoir fait preuve de cette allégation de manière concluante par des études cliniques. Elle précise que l'étude du profil de poids moléculaire ne suffit pas seulement à prouver l'hypoallergénicité. Afin de pouvoir démontrer une réduction d'un risque allergique pour les produits pour nourrissons des études cliniques sont nécessaires. De plus, ce type de produits peut être délivré uniquement sous prescription médicale après étude par un médecin.

6. Conclusion de chapitre

Afin de développer des ingrédients protéiques hypoallergéniques pour le marché de la nutrition infantile, les hydrolysats de protéines de soja et de riz sont envisagés en tant qu'alternative aux protéines de lait de vache. Par l'étude et la synthèse bibliographique certains challenges et verrous technologiques ont pu être identifiés.

La première condition à ce développement est l'utilisation de produits ayant une teneur en protéines très haute (supérieure à 90 % sur poids sec). Les procédés de production d'isolats protéiques à partir de soja sont matures et existent depuis plusieurs années. Une première approche consiste donc à les utiliser comme matière première. Concernant le riz, l'isolement des protéines est un premier challenge à relever car il n'existe pas d'isolats protéiques en tant que tels à plus de 90 % de protéines. Des voies intéressantes de concentration ont été identifiées dans la littérature et rares sont celles qui mènent à la production d'isolats, aucunes d'entre elles. Les teneurs en protéines les plus hautes sont celles faisant l'objet d'une hydrolyse des polyssacharides pariétaux par l'action de différentes enzymes dont l'utilisation doit être envisagée. Dans ce projet de thèse, les matières premières protéiques issues de l'industrie du sirop de glucose, ou le son de riz, représentent des sources intéressantes de protéines sur lesquelles la stratégie de recherche et développement peut se baser.

Le deuxième objectif à relever consiste en la réduction de la teneur en phytoestrogènes du soja qui représentent un risque potentiel pour la nutrition infantile. Il implique un développement analytique puis l'étude de procédés d'extraction ou de purification. Le seuil idéal de 50 µg/g d'isoflavones sur base sèche a été fixé à partir de précédentes recommandations. Au vu de la teneur en isoflavones dans les isolats protéiques, ce seuil implique l'élimination de près de 98 % des isoflavones ce qui et donc l'utilisation de méthodes d'extraction ou de purification très performantes. Cela induit aussi l'utilisation de méthodes d'analyses maitrisées pour le suivi des 12 formes d'isoflavones à partir des matières premières de soja et lors des procédés d'extraction. D'autant plus qu'elles n'ont pas les mêmes

propriétés et ont des distributions et des teneurs très variables. De plus, les formes conjuguées sont thermolabiles et sujettes à des transformations enzymatiques. Dans cet objectif, les méthodes d'analyses ont été décrites et synthétisées, ce qui a pu révéler à la fois une certaines disparités quant au choix du solvant et aux méthodes de préparation, mais aussi une difficulté à doser l'ensemble des formes conjuguées d'isoflavones. La préparation d'échantillon et l'analyse doivent être étudiés pour permettre une analyse rapide et suffisamment fiable lors de l'étude de l'élimination des isoflavones sur la base de méthodes ayant déjà montrées leur efficacité.

Concernant les procédés d'extraction des isoflavones, l'extraction conventionnelle solide-liquide par éthanol semble être une méthode simple et efficace, déjà utilisée pour la production de concentrés protéiques de soja. Les méthodes plus modernes ont été aussi mises en avant avec l'extraction par liquides pressurisées, dont l'eau en conditions sub-critique et le CO_2 supercritique, montrant dans les deux cas l'utilisation d'alcool en tant que cosolvant pour atteindre de meilleurs rendements. Ces méthodes ont été peu optimisées et ne semblent pas avoir été appliquées sur isolat protéique de soja. La nature protéique et l'hydrolyse de la matrice solide pourraient avoir un impact important sur l'extractabilité des isoflavones car des interactions diverses existent entre ce type de polyphénols et les protéines végétales. Certains auteurs supposent la présence d'interaction hydrophobes entre notamment les isoflavones malonyles et les protéines. Trop peu de données existent sur le sujet pouvoir définir clairement le type d'interaction. Les isoflavones et les protéines de soja pourraient représenter un modèle intéressant pour l'étude des interactions entre polyphénols et matrice protéique.

La purification sur résine chromatographique a aussi été décrite et une synthèse du type d'adsorbant utilisé a été effectuée concernant la rétention des isoflavones de soja, qui est en général utilisée dans un objectif de production d'extrait et donc avec une première étape d'extraction. L'élimination des isoflavones par cette voie directement à partir d'une solution aqueuse de protéines de soja n'est pas mentionnée. Elle est citée une seule fois mais concernant une autre matière première. Un premier verrou technologique est mis en évidence, le passage d'une solution plus ou moins concentrée en protéines au travers d'une résine sans blocage ou colmatage.

Au-delà de la purification des protéines de soja et de riz, l'objectif final de ces travaux de recherche est la production d'ingrédients hypoallergéniques. L'hydrolyse par protéase montre plusieurs avantages, notamment l'utilisation de conditions douces et la maitrise des degrés d'hydrolyse plus ou moins élevés en fonction du traitement. Afin d'obtenir la dégradation des protéines allergènes par diminution de leurs poids moléculaires, l'hydrolyse doit conduire à la formation de peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 5000 Da ou 3000 Da selon les auteurs. Ces deux seuils sont donc considérés comme des objectifs à atteindre. L'hydrolyse permet aussi d'augmenter la solubilité des protéines et leur digestibilité. La maîtrise des méthodes d'analyses pour caractériser les profils de poids moléculaire est la clé pour pouvoir développer ce type de produit.

Dans la littérature et à notre connaissance, très peu de cas font mention de l'élimination des isoflavones dans les produits de soja par des méthodes chromatographiques. Au contraire, les isoflavones sont souvent des composés d'intérêt en vue d'un enrichissement ou d'une purification. Des travaux dans ce sens ont cependant pu être identifiés dans un brevet où la matière première était le tofu (caillé

protéique de soja). Une résine anionique (FPA91Cl, polystyrène avec groupements diméthyl éthanol ammonium) permet la rétention des isoflavones et des nucléotides amers (Suh, Ostrom *et al.* 2002). Cette purification est effectuée en six passages. La particularité de cette étude consiste en l'utilisation d'un contre ion carbonate de sodium qui permet de rester dans une gamme de pH acceptable tout en respectant l'application alimentaire. Les auteurs insistent sur le choix de la résine qui doit être une résine anionique forte et de type 2. Cependant, des problèmes fréquents sont rencontrés lorsqu'un tel procédé est utilisé avec des solutions protéiques (Johns, Suh *et al.* 2000). On peut constater de faibles rendements de récupération en protéines et une incapacité de la solution protéique à passer au travers du lit de résine engendrant une augmentation de la pression dans le cas d'un circuit clos ou d'une chute importante du débit en mode gravitaire.

Chapitre II. Matériels et méthodes

1. Caractérisation des matières premières

1.1. Présentation des matières issues du riz et du soja

Les matières protéiques sur lesquelles ont été étudiées l'isolement de la fraction protéique sont présentées Figure II-1. L'hydrolyse enzymatique a été étudiée sur le son de riz et sur les concentrés protéiques de riz S63 et R79. L'étude de l'extraction des isoflavones a été effectuée sur un isolat protéique de soja commercial Figure II-2. Un concentré protéique utilisé pour le dosage des isoflavones est présenté sur la même figure.

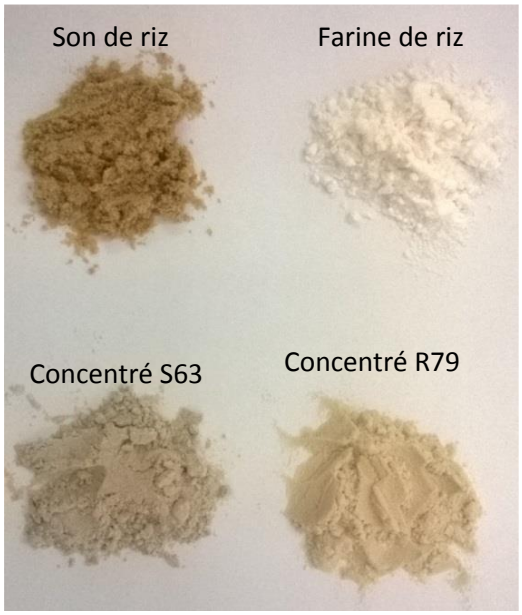


Figure II-1. Les produits commerciaux de riz utilisés

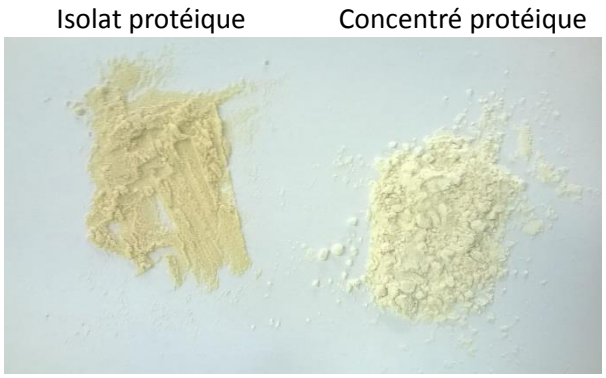


Figure II-2. Isolat et concentré protéique de soja utilisés dans ces travaux

1.2. Matière sèche et matière minérale

La matière sèche est obtenue par séchage d'un échantillon de matière compris entre 0,5 g et 2 g placé dans un four à 103 °C jusqu'à l'obtention d'une masse stable. Ces mesures sont effectuées en duplicata ou triplicata dans des creusés en porcelaine ou coupelle en aluminium. Après séchage l'ensemble est placé dans un dessiccateur. Le calcul s'effectue par la relation suivante :

$$\% MS = \frac{m_{creuset\ après\ séchage} - m_{creuset\ vide}}{m_{matière\ introduite}} \times 100$$

Sur extrait liquide le même protocole est réalisé mais dans une étuve ventilée.

Pour le calcul de la matière minérale, le creusé est placé dans un four à 500 °C pendant 5h minimum, une cendre blanche est obtenue. Une nouvelle pesée est effectuée après refroidissement, la matière minérale sur base sèche est obtenue par le rapport suivant :

$$\% MM = \frac{m_{creuset\ après\ carbonisation} - m_{creuset\ vide}}{m_{matière\ sèche\ introduite}} \times 100$$

La masse carbonisée perdue correspond à la matière organique.

1.3. Teneur en protéines par la méthode du Kjeldahl

La teneur en protéines a été déterminée d'après la norme française NF V 18-100 par la méthode du Kjeldahl. Une étape de minéralisation de l'azote organique par l'acide sulfurique est réalisée à 400°C pendant 1h sur un bloc Tetacor Digestor 2020 avec 12,5 mL d'acide sulfurique sur 0,1 à 1 g de matière en fonction de la teneur en protéines. Une étape d'alcalinisation et distillation par la soude est ensuite effectuée échantillon par échantillon *via* le système Tecator-Foss Kjeltec 8400. Une solution de soude à 40% est délivrée dans chaque tube avant distillation. L'ammoniac transféré est piégé par une solution d'acide borique à 4%. La titration s'effectue par l'analyseur Kjeltec 8400 avec une solution HCl 0,1N et des indicateurs colorés, le vert de bromocrésol et le rouge de méthyle.

Le bilan réactionnel suivi par titration est le suivant :

$$CHO\text{-}N\ (protéines) + HCl \rightarrow Cl^- + NH_4^+$$

La teneur en protéines est calculée par l'utilisation d'un facteur de conversion du taux d'azote en taux de protéines (1/α) généralement établi à 6,25 pour les protéines végétales et utilisé pour les produits commerciaux de soja et de riz où α correspond à la teneur en azote des protéines. Toutefois, ce facteur est différent dans la littérature concernant les protéines de riz, ainsi il est fixé à 5,95 dans l'ensemble des travaux effectués sur le riz présentés dans ce manuscrit et reste à 6,25 sur soja. La relation suivante permet de calculer la teneur en protéines :

$$\%\, Protéines = \%\, Azote \times \frac{1}{\alpha} = \frac{\left(V_{eq} - V_{blanc}\right) \times \ Titre_{HCl}}{M_N \times m_{prise\ d'essaix} \times \%MS \times \alpha}$$

V_{eq} est le volume d'HCl utilisé pour la titration pour un échantillon exprimé en litre et V_{blanc} pour un échantillon sans échantillon, M_N pour la masse molaire de l'azote.

1.4. Dosage des sucres par HPIC

Le dosage des sucres totaux a été effectué par hydrolyse à l'acide sulfurique et dosage par HPIC couplé à un détecteur par ampérométrie pulsée à partir de la méthode NREL/TP-510-42618 avec quelques modifications.

L'hydrolyse s'effectue premièrement avec ajout de 1 mL d'acide sulfurique à 72 % sur un échantillon de 100 mg dans un tube en verre PYREX clos. Une pré-hydrolyse est effectuée sur 60 minutes à 30 °C dans un bain marie. Une deuxième hydrolyse est effectuée après dilution par eau déminéralisée de l'acide jusqu'à 4%. Elle s'effectue sur 2 h à 90 °C dans un bain marie. Des témoins d'hydrolyse sont effectués en parallèle dans les mêmes conditions par une solution de sucres (D(+)glucose, D(+)xylose, D(+)galactose, L(+)arabinose, and D(+)mannose) ayant une concentration proche de 100 mg/L. Après la deuxième hydrolyse, les échantillons sont refroidis dans un bain de glace et neutralisés avec ajout de NaOH 4 %, puis complétés jusqu'à 25 mL dans une fiole jaugée. Après filtration au travers de filtres seringue de type acétate de cellulose 0,45 µm, 200 µL d'extraits sont préparés et dilués dans 1,8 mL de solution d'étalon interne de fucose à 60 g/L. La séparation chromatographique s'effectue par injection de 25 µL d'échantillon au travers d'une colonne échangeuse d'anions Dionex CarboPac® PA1 4 x 250 mm précédée d'une pré-colonne Dionex CarboPac 4 x 50 mm. Le gradient d'élution par NaOH est présenté Figure II-3, un débit de 1 mL/min est utilisé, l'injection s'effectue au temps t0 sur le graphe.

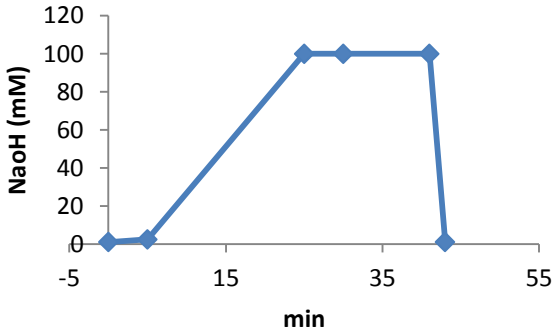


Figure II-3. Gradient utilisé pour la séparation des sucres sur colonne anionique Carbopac PA1

La détection est réalisée par ampérométrie pulsée sur le système Dionex ICS-3000. Les standards de sucres sont fournis par Sigma-Aldrich. L'ordre d'élution est le suivant : fucose, arabinose, galactose, glucose, xylose et mannose. Leur concentration pour la droite d'étalonnage varie de 1 à 300 mg/L dans de l'eau ultrapure miliQ.

1.5. Dosage de l'amidon dans les produits du riz

Le dosage de l'amidon sur les matières premières de riz s'effectue par l'utilisation d'un kit de dosage Megazyme International Ireland, Total Starch (Amyloglucosidase/α-Amylase Method K-TSTA 07/11) correspondant à la méthode AOAC 996.11. Après un double lavage de l'échantillon par éthanol 80% durant 5 min à 100 °C puis à température ambiante, et centrifugation pour éliminer les sucres simples, deux étapes enzymatiques intercalées d'une centrifugation 5000 g sur 15 min sont réalisées :

1) Digestion par Amylase à pH 5, 80 °C, 12 min puis Amyloglucosidase 30 min à 50 °C

2) Réaction du co-produit H_2O_2 avec l'acide p-hydroxy benzoïque en présence de peroxydase 30 min à 50 °C (réactif GOPOD)

Le dosage s'effectue par lecture optique sur spectrophotomètre du produit de réaction qui est la quinoneimine de couleur rose, à 510 nm. Une solution de D-glucose à 1 mg/L est utilisée en tant que standard par introduction de 0,1 mL dans 3 mL de réactif, le blanc est effectué de la même façon mais avec 0,1 mL d'eau Ultra pure miliQ. La teneur en amidon est finalement calculée par la relation suivante :

$$\%\, Amidon = \Delta_A \times F \times \frac{FV}{0{,}1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{w} \times \frac{162}{180}$$

Δ_A est l'absorbance mesurée par rapport au blanc ; F est le rapport 100 (µg de D-glucose)/ absorbance pour 100µg de glucose ; FV est le volume final ; 0,1 pour le volume d'échantillon analysé ; 1/1000 pour passer des µg en mg ; 100/W le facteur pour exprimer l'amidon en tant que pourcentage et *w* la masse en mg de produit analysé ; 162/180 pour prendre en compte l'ajustement entre masse molaire du D-glucose et de D-glucose anhydre.

2. Dosage des isoflavones par HPLC-UV

2.1. Choix du solvant de référence

Le mélange de solvant choisi a été basé sur la méthode de Murphy (Murphy, Barua *et al.* 2002) constitué de 10 mL d'acétonitrile, 7 mL d'eau ultrapure et 2 mL d'acide chloridrique à 0,1 N. Ce mélange a été testé sur les matières protéiques de soja dans un système erlenmeyer de 125 mL où 1 à 2 g de produit sont introduits, et mélangé par agitation par barreau aimanté avec une vitesse de 250 rpm sur 2 h avec contrôle toutes les 20 min (récupération de la matière déposée sur les parois) suivi d'une centrifugation de 6000 g pendant 10 min. Cette méthode a fait l'objet de comparaison avec et sans évaporation et resuspension dans du MeOH 80 %. L'extraction au MeOH 80% est effectuée avec le même ratio de solvant. Le surnageant est filtré par filtre seringue de type PTFE 0,22 µm avant injection sur HPLC.

2.2. Système de mélange pour la préparation de l'échantillon

Le système d'agitation a été comparé au système par vortex qui a été finalement choisi pour sa rapidité d'exécution, le même solvant de type Murphy a été utilisé. Un à deux grammes de produit sont introduits dans le tube de centrifugation clos, une agitation d'une minute est effectuée avec un agitateur vibrant Vortex suivie par une sonication de 5 min à partir de produits secs. Pour les produits solubilisés de type hydrolysats protéiques de soja qui sont analysés en sortie de colonne de résine adsorbante, seulement le mélange par vortex a été effectué après ajout de 10 mL d'hydrolysat liquide, 7 mL d'acétonitrile et 2 mL d'HCl 0,1 N. Une centrifugation de 6000 g pendant 10 min directement après extraction a été effectuée. Le surnageant a été filtré par filtre seringue de type PTFE 0,22 µm avant injection sur HPLC.

2.3. Appareillage

Le système utilisé pour l'analyse est constitué d'une pompe quaternaire Dionex P680, d'un passeur Dionex ASI-100, d'un compartiment colonne thermostaté Ultimate 3000, et d'un détecteur UV-DAD ThermoScientific Ultimate 3000.

2.4. Méthode de séparation

2.4.1. Comparaison entre colonne

Deux colonnes ont été testées avec le développement de deux gradients. La Synergi Max RP-C18 (150 mm x 3 mm, 4 µm, 80 Å) a permis la séparation des 12 formes avec une durée d'analyse de 60 minutes et un débit de 0,8 mL/min avec le gradient d'élution présenté Figure II-4.

La Kinetex XB-C18 (100 mm x 3 mm, 2.6 µm, 100 Å) a permis la séparation des 12 formes sur un temps plus court, environ de moitié, et avec un débit de 0,550 mL/min (composition core-shell). Le gradient développé pour cette colonne est présenté Figure II-5. Cette colonne a montré cependant une sensibilité plus forte au colmatage vis-à-vis des protéines, des lavages plus fréquents ont dû être effectués. Pour les travaux présentés dans ce manuscrit cette colonne a été utilisée pour la détermination des formes d'isoflavones et les premiers tests de rétention des isoflavones sur colonne de résines chromatographiques. Après quoi, c'est la colonne Synergi qui a été utilisée pour l'ensemble des travaux.

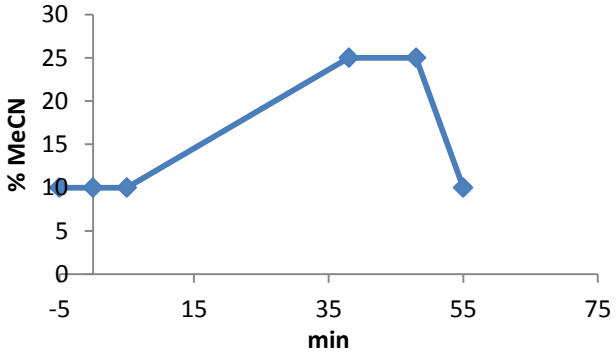


Figure II-4. Gradient d'élution utilisé pour la colonne Synergi Max RP-C18

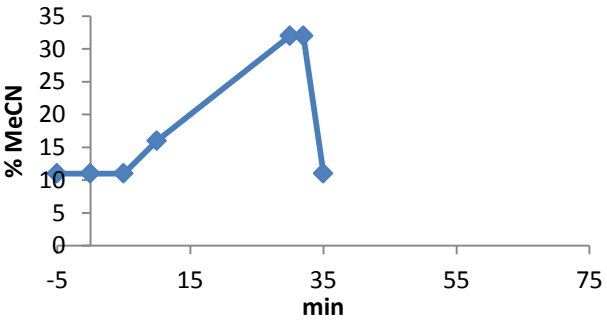
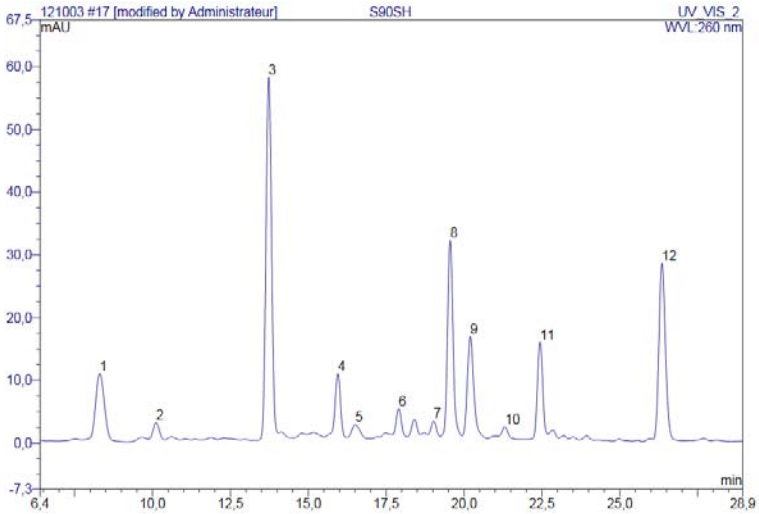


Figure II-5. Gradient d'élution utilisé pour la colonne Kinetex XB-C18

Un exemple chromatogramme obtenu avec l'identification des 12 formes est présenté Figure II-6.



Numéro de pic	Composé associé
1	Daidzine
2	Glycitine
3	Génistine
4	Malonyl-daidzine
5	Malonyl-glycitine
6	Acétyl-daidzine
7	Acétyl-glycitine
8	Malonyl-génistine
9	Daidzéine
10	Glycitéine
11	Acétyl-génistine
12	Génistine

Figure II-6.Exemple de chromatogramme obtenu à partir d'un isolat protéique avec les 12 formes identifiées sur la colonne Kinetex XB-C18

A partir de six standards il a été possible d'identifier les trois glucosides simples et (pics 1, 2, 3) et les trois aglycones (9, 10, 12). De plus chaque structure de base présente un spectre d'absorption UV caractéristique, et les formes conjuguées ont la même signature spectrale que leur glucoside correspondant. Cependant la détermination des formes conjuguées plus complexes sans standard est plus délicate. Par un traitement thermique à 120°C sur une nuit les formes malonyles sont dégradées en formes acétyles (Collison 2008) ce qui permet, avec la comparaison de l'ordre d'élution issu de la littérature sur le même type de phase, d'identifier les formes acétyles ou malonyles. Ainsi l'intensité relative du pic associé à la Malonyl-génistine diminue et celle du pic de l'Acétyl-génistine augmente, de même pour les autres formes.

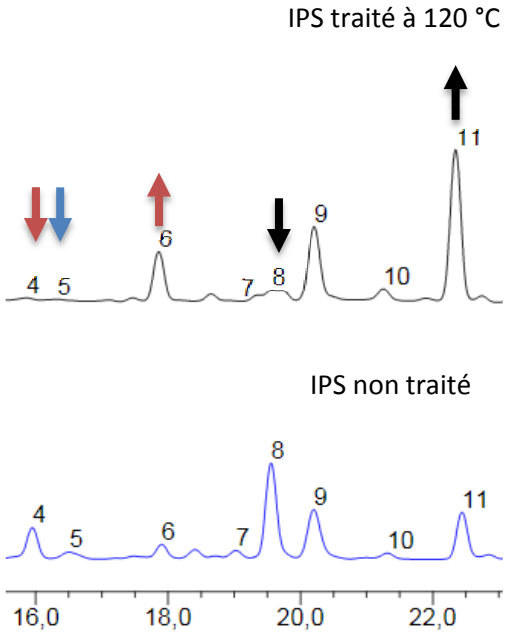


Figure II-7. Identification des formes conjuguées malonyles et acétyles par traitement thermique sur isolat protéique de soja.

Ces changements sont illustrés par une comparaison de l'intensité relative des pics avant et après traitement thermique (Figure II-7). Les formes malonyles perdent en intensité, elles sont associées aux pics 4, 5 et 8. Les formes acétyles correspondantes (même spectre d'absorption UV) sont associées aux pics 6 et 11. Même si l'acétyl-glycitine reste difficile à identifier, le pic 7 a le même spectre d'adsorption UV que la glycitine et est positionné à cette place selon l'ordre de rétention dans d'autres études.

2.4.2. Limite de détection et de quantification

Le premier objectif de ces travaux de recherche étant d'atteindre des teneurs en isoflavones sous les 50 µg/g ou approchant cette valeur, il a été important de s'assurer que ces valeurs soient détectables. Ainsi les limites de détection et de quantification ont été déterminées pour chaque isoflavones et présentées dans la partie résultat (Chapitre III.1.3.3.3). A partir d'un hydrolysat protéique de soja produit après 8 h d'hydrolyse, un dosage est effectué. Le bruit de fond est mesuré entre deux pics éloigné de 2 min, son amplitude (hauteur) multipliée par 3 donne le seuil de détection et par 10 le seuil de quantification. Les standards utilisés lors d'un deuxième passage sont dilués afin de s'approcher le plus possible des seuils (hauteurs) de détection et de quantification. Pour chaque standard, cette hauteur est traduite par une aire qui permet de calculer les concentrations limites de détection et de quantification. D'après ces paramètres il a été possible de doser des teneurs résiduelles en isoflavones relativement basses. Cette méthode a été considérée comme notre référence dans l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse.

2.4.1. Conservation de l'échantillon

Pour une analyse de la teneur totale en isoflavones l'échantillon peut être conservé plusieurs jours à 4°C. Cependant l'expérience a montré que pour le suivi des formes d'isoflavones un maximum de 48 h devait être respecté car les formes glucosides sont transformées en formes aglycones même en présence d'acétonitrile dans le solvant.

2.5. Standards et calcul de la teneur en isoflavones en équivalent aglycones

Les standards utilisés sont les trois aglycones (Génistéine, Glycitéine et Daidzéine) et les trois β-glucosides (Génistine, Glycitine et Daidzine) fournis par l'entreprise Extrasynthèse, Lyon. Les gammes étalon sont construites par des solutions d'étalons en mélange de 0,1 mg/L à 20 mg/L avec cinq dilutions différentes. Toutes les droites d'étalonnage obtenues ont un coefficient de corrélation linéaire très haut supérieur à 99,9%. Afin de reporter les formes conjuguées malonyles et acétyles sur les courbes étalons déterminées par les formes β-glucosides correspondantes, un facteur F_M de conversion est utilisé correspondant au rapport des masses molaires entre la forme conjuguée et son équivalent glucoside (Tableau II-1).

Tableau II-1. Les facteurs de conversion pour l'étalonnage

Référence glucoside	Facteur de conversion acétyle	Facteur de conversion malonyle
Daidzine	1,101	1,207
Glycitine	1,094	1,193
Génistine	1,097	1,199

Pour exprimer toutes les formes en équivalent aglycones (ce qui est effectué de façon conventionnelle pour ce type de composés), un facteur F_A de conversion en équivalent aglycone est utilisé (Tableau II-2).

Tableau II-2. Les facteurs de conversion pour exprimer les teneurs en isoflavones équivalent aglycones

	Aglycone	Glucoside	Acetyl glucoside	Malonyl glucoside
Daidzéine	1,000	0,611	0,555	0,506
Glycitéine	1,000	0,637	0,582	0,534
Génistéine	1,000	0,625	0,570	0,521

Ainsi la relation suivante est utilisée pour le calcul de la teneur en isoflavones exprimée en ppm (µg/g sur produit sec) :

$$IF_{eq\ aglycones}\ (\mu g/g) = \frac{\frac{(Aire - b)}{a} \times \mathrm{D} \times V}{m_{éch}} \times F_M \times F_A \times P$$

L'aire correspondant à un pic est ramenée sur les coefficients de la droite d'étalonnage, b l'ordonnée à l'origine de la courbe et a le coefficient de la droite ce qui donne une concentration d'isoflavones en mg/L *; D* est le facteur de dilution *; V* est le volume total en litre utilisé pour l'extraction *;* $m_{éch}$ exprimé ici en Kg est la masse de l'échantillon analysé ; F_M et F_A sont les facteurs de corrections décrits plus haut et *P* pour la pureté des standards communiquée par le fournisseur. Pour le suivi des concentrations en isoflavones dans un extrait la même relation est utilisée hormis la masse de l'échantillon et le volume d'extraction.

2.6. Dosage après hydrolyse acide

Afin de pouvoir répondre au problème de la rareté des standards une hydrolyse acide permet de transformer l'ensemble des isoflavones sous leur forme aglycone. La même extraction est réalisée que la méthode Murphy (section 2.1.). A l'issu de l'extraction, une centrifugation est réalisée à 6000 g durant 10 min puis 3 mL de chaque surnageant est ensuite prélevé et déposé dans des tubes en Pyrex clos. 3 mL de solution HCl 5 N sont ensuite déposés dans chaque tube et l'hydrolyse est conduite à 80 °C durant 2 h. Après refroidissement dans un bain de glace, la neutralisation s'effectue par ajout de NaOH 5 N. L'extrait est ensuite filtré sur filtre seringue PTFE 0,22 µm puis injecté en HPLC.

3. Extraction des isoflavones par éthanol

3.1. Planification expérimentale en réacteur de 500 mL

L'étude par planification expérimentale a été effectué dans un système de type réacteur agité, un tricol d'une capacité de 500 mL en verre Pyrex sur lequel a été positionné un réfrigérant de type Liebig. Un moteur et palle d'agitation ont permis le mélange durant la durée des points du plan d'expérience (2 h) et jusqu'à 8 h pour l'étude cinétique qui a été réalisée par prélèvements de 1 mL d'extrait. Un bain d'huile siliconée thermostaté avec plaque d'agitation a permis l'homogénéisation de la température autour des parois du tricol. La vitesse d'agitation a été fixée à 200 rpm (Figure II-8).

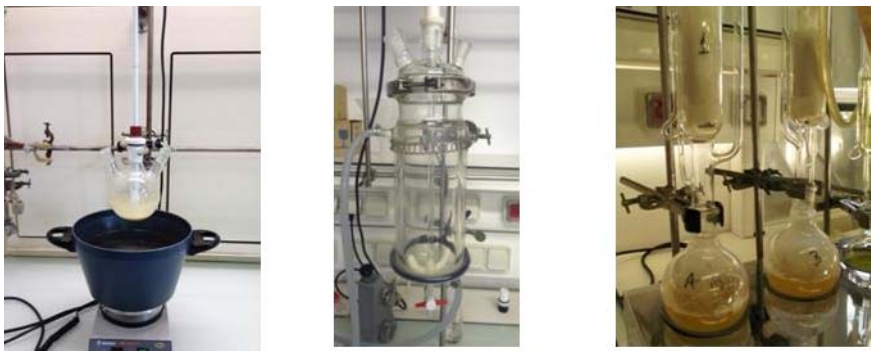


Figure II-8. Systèmes utilisés pour l'étude de l'extraction à l'éthanol par planification expérimentale et extraction multi-étagée. A gauche le système pour la planification expérimentale, au milieu le système de 2 L pour l'extraction multi-étagée et à droite le système multi-étagée de type Soxhlet

Vingt grammes d'isolat protéique de soja ont été introduits dans le réacteur avec 200 mL de solvant d'extraction éthanolique dont la concentration est préparée préalablement par éthanol 96% et eau déminéralisée.

Pour le plan d'expériences de Doehlert la gamme de température choisie a été de 30 à 70 °C et la teneur en éthanol dans le solvant d'extraction de 20 à 80 %. Après extraction une centrifugation de 10 min à 6000 g a été effectuée, le surnageant a été ensuite filtré sur filtre seringue de type PTFE 0,22 µm avant analyse par HPLC-UV décrite précédemment.

Pour le plan d'expériences, les calculs matriciels et les surfaces de réponses sont réalisés par Microsoft Excel 2010.

3.2. Essais d'extractions multi-étagée sur réacteur agité de 2 L et Soxhlet

Les essais d'extraction multi-étagée ont été effectués sur une échelle plus grande dans un réacteur agité d'une capacité de 2 L à double enveloppe. Cent grammes d'isolat protéique ont été introduits avec 1 L de solvant d'extraction éthanolique suivant l'expérience. Un moteur agité avec palle en téflon avec une vitesse de 300 rpm a été utilisé pour le mélange durant l'extraction. Le réacteur utilisé (Photo du milieu

Figure II-8) est couplé à un bain marie thermostaté avec circulation de l'eau dans la double enveloppe. Après extraction une centrifugation de 10 min à 6000 g est réalisée, les culots de centrifugation sont utilisés pour une extraction suivante après retrait des surnageants et prélèvement d'une fraction de matière résiduelle comme présenté dans le schéma suivant. Les extraits éthanoliques sont filtré sur membrane PTFE 0,22 µm par filtre seringue et dosés après dilution dans de l'eau ultrapure pour rentrer dans la gamme d'étalonnage. Les échantillons des fractions résiduelles sont séchés dans une étuve ventilée à 50 °C jusqu'à stabilisation de la masse. Une extraction par le solvant Murphy est effectuée sur la matière sèche résiduelle. Afin de déterminer les rendements de récupération les teneurs en matières sèches sont mesurées par la méthode décrite en section 1.2.

Le rendement d'extraction est calculé par le dosage de l'extrait éthanolique :

$$Rdt\ IF_{ext}\ (\%) = \frac{m_{IF}\ extrait}{m_{IF}\ introduite} \times 100$$

Ou par le dosage de la matière résiduelle :

$$Rdt\ IF_{rés}\ (\%) = \frac{m_{IF}\ introduite - m_{IF}\ résiduelle}{m_{IF}\ introduite} \times 100$$

L'extraction sur Soxhlet est réalisée avec 200 mL d'un mélange éthanolique à 80 % sur 40 g d'isolat protéique enveloppé dans un papier filtre Whatman. Le ratio solide-liquide ainsi utilisé dans la partie haute du Soxhlet est d'environ 1/3. Trois durées sont testées de 2 h à 8 h correspondant à un nombre de cycles de 6 à 30. Les matières initiales et épuisées issues de l'extraction multi-étagée sur réacteur de 2 L sont extraites.

3.3. Mise à l'échelle industrielle sur Tournaire à fond filtrant de 500 L

L'extraction à échelle industrielle s'effectue sur une plateforme Tournaire qui comporte un extracteur à fond filtrant d'une capacité de 340 L et une unité de distillation d'une capacité de 200 L (Figure II-9). L'éthanol utilisé ici est de l'éthanol technique à 96% non dénaturé donc très proche de l'éthanol alimentaire. L'objectif est d'effectuer une extraction avec un ratio solide/liquide de 1/3 équivalant à l'extraction en Soxhlet. Pour avoir à disposition une quantité de 60 L d'éthanol pour chaque extraction, une quantité de départ plus importante est choisie (200 L). Pour la première extraction la totalité du solvant est utilisée pour maximiser son utilisation, ainsi 20 kg d'isolat protéique sont déposés dans la cuve avec 200 L d'éthanol pour une première extraction de 20 min à 50°C pour préchauffer l'éthanol et maitriser la température de l'extraction. L'extrait est transféré dans la cuve de distillation. Afin de pouvoir déclencher les extractions suivantes rapidement, les premiers 60 L de distillat sont utilisés pendant la fin de la distillation de l'extrait. Ce ratio de 1/3 a permis de pouvoir fonctionner sur les unités

en parallèle avec des cycles d'extraction de 20 min. L'absence d'agitation est due à la fragilité de la toile (problématique ponctuelle associée au système disponible) et a pour but de solubiliser le moins possible les protéines. Soixante litres d'éthanol ainsi distillés sont introduits pour les extractions successives 2 à 14. Chaque extraction a une durée de 20 min et peuvent être effectuées successivement. Les 14 extractions représentent ainsi une durée d'environ 5 h de temps effectifs. La distillation de 60 L a aussi une durée de 20 à 30 min environ elle s'effectue à 60 °C.

Des prélèvements effectués sur trois zones distinctes en haut du gateau protéique sont réalisés après chaque extraction. La matière est ensuite séchée en étuve ventilée à 50°C puis extraite par la méthode de référence de type Murphy décrite précédemment. Après chaque distillation l'extrait ainsi concentré est dilué, filtré et analysé par HPLC-UV comme décrit précédemment.



Figure II-9. Extracteur à fond filtrant Tournaire

La matière finale est homogénéisée par malaxage et séchée pendant 3 jours après avoir été répartie sur des plateaux en PVC, elle est protégée par une toile en nylon. La matière finale est dosée par les méthodes de référence pour sa teneur en isoflavones et sa matière sèche finale par plusieurs prélèvements mélangés et extraits trois fois pour analyse.

4. Extraction par fluides pressurisés

Un appareil Dionex ASE ™ 350 a été utilisé pour l'étude qui permet d'atteindre des conditions d'eau sub-critique avec une pression de 1500 psi fixée par l'appareil. Les extractions ont été effectuées dans une cellule d'extraction en acier inoxydable de 10 mL. Le matériau a été mélangé avec 10 g de sable comme agent de dispersion inerte pour éviter l'agrégation des protéines. Un filtre d'acétate de cellulose a été placé au fond de la cellule au-dessus du fritté. L'extraction a été effectuée avec de l'eau ultrapure, comme suit : chargement de la cellule dans le four et fermeture pour étanchéité, remplissage avec de l'eau jusqu'à la pression de consigne, chauffage pendant une durée statique variable définie selon le plan d'expériences, rinçage à l'eau (100% de la cellule d'extraction de volume) et purge avec de l'azote. Chaque extrait est récupéré dans un vial collecteur situé en continuité du circuit.

Avant dosage de l'extrait aqueux par HPLC-UV, une séparation solide-liquide est nécessaire. Elle est réalisée sur chaque extrait par une précipitation des protéines par modification du pH à 4,5 avec HCl 1N (point isoélectrique des protéines de soja) avant centrifugation à 6000 g pendant 10 min. Les surnageants sont filtrés au travers d'une membrane en acétate de la cellulose de 0,22 pm de type filtre seringue. Un exemple de série d'extraits est présenté en Figure II-11 et la cellule d'extraction utilisée est présentée Figure II-10. La matière sèche avant centrifugation et celle du surnageant sont aussi mesurées.

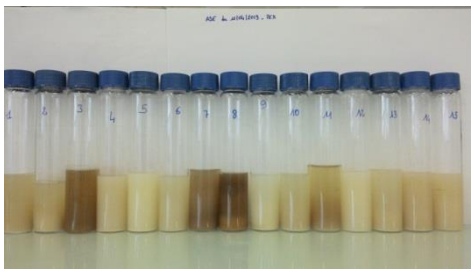


Figure II-11. Extraits obtenus pour chaque point du plan d'expérience exemple de la farine de soja



Figure II-10. Cellule d'extraction ASE en acier inoxydable

L'extraction par CO_2 est décrite directement dans le chapitre Chapitre III.4. Elle a été réalisée à l'atelier des fluides supercritiques de Nyons.

5. Rétention des isoflavones de soja sur résines chromatographiques

5.1. Noms et caractéristiques des résines utilisées

Les résines d'adsorption et échangeuses d'ions utilisés sont présentés dans le Tableau II-3 et le Tableau II-4.

Tableau II-3. Les résines adsorbantes utilisées pour la rétention des isoflavones

Nom commercial	Fabricant	Nature du polymère	Taille des particules (mm)	Surface spécifique (m^2/g)	Porosité (cm^3/g)
FPX66	Dow Rohm & Haas	Macroréticulé Aromatique	0,6-0,75	700	1,4
XAD7HP	Dow Rohm & Haas	Acrylique Aliphatique	0,56-0,71	380	0,5
DIAION HP20	Mitsubishi Chemical DIAION	Styrène DVB	0,25-0,85	500	1,3

Tableau II-4. Les résines échangeuses d'ions utilisées pour la rétention des isoflavones

Type	Fabricant	Nom commercial	Nature du polymère	Capacité d'échange (m_{eq}/mL)
Anionique forte Type 1	Dow Rohm & Haas	Ambersep 900 OH	Styrène DVB Ammonium IV	0,8
Anionique forte Type 1	Dow Rohm & Haas	FPA90 Cl	Polystyrène Ammonium IV	1
Anionique forte Type 2	Dow Rohm & Haas	FPA91 Cl	Polystyrène Ammonium IV	1
Cationique	Dow Rohm & Haas	HP336	Acrylique Carboxyle	3,9

5.2. Système batch pour la rétention des isoflavones

Pour l'ensemble des essais effectués en batch (hormis pour les essais sur différents hydrolysats décrits plus bas), les résines sont rincées à l'eau déminéralisée durant 1 h avec agitation magnétique puis filtrées sur toile de nylon 50 µm. Selon l'expérimentation 2 à 30 g de résine humide ont été introduits dans des erlenmeyers d'une capacité de 125 mL ou 500 mL dans le cas de l'étude cinétique et des essais préliminaires concernant la comparaison entre différents types d'hydolyse. Pour la comparaison des différents hydrolysats, les essais ont cependant été conduits sur 100 g de résine. Une quantité variable d'hydrolysat protéique de soja a été introduite selon le volume équivalent au volume de résine choisi (ou Bed Volume (BV)). Par exemple, pour l'étude sur 50 BV d'hydrolysat, 100 mL d'hydrolysat ont été mis en contact avec 2 g de résine soit 2 mL de résine humide (la densité de la résine humide étant très proche de 1). Les agitations magnétiques avec barreau aimanté ont été conduites à 100 rpm environ sur des durées variables selon l'expérimentation. Après la durée impartie pour l'adsorption des isoflavones, la solution est filtrée sur toile de nylon 50 µm. Les filtrats sont extraits avec le mélange acétonitrile/hydrolysat/HCl (10/7/2) comme décrit dans la section 2 avant centrifugation, filtration et dosage par HPLC-UV.

5.3. Grandeurs et modèles utilisés

La capacité d'adsorption/d'échange est calculée de la façon suivante :

$$q = \frac{(C_0 - Ceq)V}{m}$$

C_0 est la concentration initiale en isoflavones (mg/L), *Ceq* la concentration à l'équilibre, *V* est le volume en litre de la solution et *m* la masse de résine en gramme de masse humide introduite.

Le taux d'adsorption est calculé comme suit :

$$(\%)\ Taux\ adsorption = \frac{m_{IF}\ initiale - \ m_{IF}\ résiduelle}{m_{IF}\ initiale}$$

$m_{IF}\ résiduelle$ étant la masse totale d'isoflavones présente dans le filtrat après une durée variable

d'adsorption. Les modèles cinétiques, isothermes d'adsorption et les méthodes de linéarisation sont présentés dans le Tableau II-5.

Tableau II-5. Linéarisation des modèles utilisés et paramètres associés

Type de modèle	Nom	Equation du modèle	Linéarisation	Paramètres
Isotherme d'adsorption	Irréversible	$qe = constante$		
	Henry	$qe = K_H Ce$	$qe = f(Ce)$	$\boldsymbol{K_H}$
	Langmuir	$qe = \frac{Q_{mL} a_L C_e}{1 + a_L C_e} = \frac{K_L C_e}{1 + a_L C_e}$ $\frac{1}{q_e} = \frac{1}{K_L C_e} + \frac{1}{Q_{m_L}}$	$\frac{1}{qe} = f(\frac{1}{Ce})$	Constante de Langmuir (affinité d'un soluté pour l'adsorbant) $\boldsymbol{K_L}$; Capacité max $\boldsymbol{Q_{m_L}}$
	Freundlich	$q_e = K_F C_e^{b_F}$ $log\ qe = log\ K_F + b_F\ log\ Ce$	$\log q_e = f(\log\ C_e)$	Constantes de Freundlich Coefficient d'adsorption $\boldsymbol{K_F}$ $(\mathrm{mg/g}\ (1/\mathrm{mg})^{\boldsymbol{b_F}})$
Diffusion	Weber-Morris	$q_t = k_{int} t^{1/2}$	$q_t = f(t^{\frac{1}{2}})$	Constante de vitesse de diffusion intra-particulaire $\boldsymbol{k_{int}}$
	Boyd	$\ln(1 - \frac{q_t}{q_e}) = -R^l t$	$Bt = f(t)$ $Bt = -0{,}4977 - \ln(1 - \frac{q_t}{q_e})$ $F = \frac{q_t}{q_e}$	Taux de soluté adsorbé $\boldsymbol{F}$
Réaction d'adsorption	Pseudo-premier ordre	$\frac{\mathrm{d}q_i}{\mathrm{d}t} = k_{p1}(q_e - q_t)$	$\log(q_e - q_t) = f(t)$	Constante de vitesse $\boldsymbol{k_{p1}}$ ($\mathrm{min^{-1}}$)
	Pseudo-second ordre	$\frac{\mathrm{d}q_i}{\mathrm{d}t} = k_{p2}(q_e - q_t)^2$	$\frac{t}{q_t} = f(t)$	Constante de vitesse $\boldsymbol{k_{p2}}$ ($\mathrm{L.mg^{-1}.min^{-1}}$)
	Elovich	$\frac{\mathrm{d}q}{\mathrm{d}t} = a\mathrm{e}^{-\alpha q}$	$\ln(t) = f(q_t)$	Constante de désorption $\boldsymbol{a}$; taux initial d'adsorption $\boldsymbol{\alpha}$

5.4. Conditionnement des résines anioniques

Les premiers essais sur colonne de résine FPA91Cl sont effectuées sur 200 mL à 400 mL de résine (volume apparent dans une colonne de 5 cm de diamètre) après un lavage en excès d'eau, un passage d'eau conditionnée à pH 9 (ou au même pH que celui utilisé pour le processus d'adsorption) jusqu'à obtenir le pH souhaité dans le filtrat. Pour l'essai sur lit de 8 L de résine le même protocole est appliqué.

Concernant les essais de différents contre-ions sur FPA 91 Cl, quatre ions ont été testés CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, HO^- et Cl^-. Ceci par l'utilisation de solution à 2 % (m/m) de Na CO_3, Na SO_4, NaOH, puis sans modification du contre ion. Après rinçage par 3 à 4 BV d'eau déminéralisée, un volume de solution équivalent à 5 BV est passé au travers de la colonne de résine à 1 BV/h puis rincé à l'eau déminéralisée en excès (>5 BV) avant passage de l'hydrolysat préalablement amené à pH 9 par NaOH 1N.

5.5. Adsorption en mode dynamique sur résine FPA91 et XAD7HP

Les essais sur colonne de résine XAD7HP ont été menés au travers d'une colonne en verre 5 cm x 40 cm, le lit de résine humide était de 400 mL, la résine est versée et mesurée dans une éprouvette graduée contenant de l'eau déminéralisée qui a le même diamètre que la colonne puis transférée dans celle-ci. L'hydrolysat a été maintenu en agitation et transféré en haut de la colonne par une pompe péristaltique, le débit a été ajusté et suivi par un débitmètre en sortie de colonne. Le volume mort après colonne était de 40 mL, il a été pris en compte dans le suivi de la teneur en isoflavones et matière en sortie dans le filtrat. Le passage de la solution s'effectue par gravimétrie, l'hydrolysat est maintenu au-dessus du lit de résine entre 0 et 50 mL, la résine est toujours maintenue en solution, la force du moteur de la pompe étant ajustée pour maintenir ce niveau. Le système utilisé est présenté ci-après Figure II-12.



Figure II-12. Système chromatographique utilisé pour l'étude de la rétention des isoflavones sur résine d'adsorption

Pour le suivi de la matière sèche et des isoflavones des fractions d'environ 15 mL sont prélevées en fonction du temps de la durée de passage. Le volume passé est recalculé en tenant compte du temps de passage, du débit et du volume mort après colonne. Les isoflavones sont dosées après dilution dans le solvant de type Murphy, traitées puis analysées selon la description Section 2.

La matière sèche est réalisée par perte à la dessiccation décrite aussi dans cette section. Un suivi de pH est effectué sur ces fractions lors de l'utilisation de résines anioniques.

Le filtrat global est récupéré dans un bidon de 10 L et a pu être dosé après mélange pour déterminer la teneur globale en isoflavones (et non par fraction) et ceci pour différents volumes totaux traités de 8 BV a 25 BV.

Plusieurs débits ont été testés par ouverture de la vanne en sortie de colonne et contrôle au débitmètre en temps réel. L'ouverture de la vanne a été ajustée afin de maintenir le débit choisi afin de contrer d'éventuelles pertes de charges, en particulier lors de l'utilisation de pH inférieur à 9.

5.6. Séchage par atomisation

A partir des essais sur l'échelle 8 L une partie des filtrats (issu de XAD7HP et FPA91Cl) est séchée par atomisation d'une part et par perte à la dessiccation à 103 °C d'autre part. Les isoflavones étaient dosées sur ces deux types de produits secs, et sur les filtrats liquides (les résultats observés étant les mêmes). Pour l'atomisation le système Mini Spray Dryer B-290 de Büchi (Flawil, Suisse) est utilisé. Les conditions d'atomisation sont les suivantes : la température d'entrée (T_{inlet}) est de 119 ± 4 °C, la température de sortie (T_{outlet}) de 70 ± 5 °C, le débit de la pompe de 20 % (330 mL/h), le débit d'air de 400 L/h, la pression d'air de 0,635 MPa. Les microparticules sont récupérées dans le récipient de collecte et dans le cyclone, puis stockées dans un flacon fermé.

6. Etude du profil de poids moléculaire et autres indicateurs d'hydrolyse

6.1. Séparation par HP-SEC (Exclusion stérique)

6.1.1. Méthode de solubilisation

Les extractions ont été effectuées avec deux types de solvants, dans des erlenmeyer clos avec du parafilm sur 2 h par agitation magnétique soit au tampon phosphate (Na_2HPO_4 0,05 M ; 0,05 M NaH_2PO_4 ; 0,15 M NaCl) (Qi, Yu *et al.* 2006; Jung, Mahfuz *et al.* 2009; Xia, Wang *et al.* 2012) seul ou avec addition de SDS pour une concentration finale de 2 % (m/V). Les solubilisations ont été réalisées à 30 °C dans un bain marie avec une plaque agitante magnétique, les solutions sont centrifugées à 6000 g durant 10 min. Les surnageants sont filtrés au travers d'un filtre seringue en acétate de cellulose de 0,22 µm. La matière dosée est introduite à hauteur de 200 mg dans 20 mL de solvant.

6.1.2. Système chromatographique HP-SEC

Le système HPLC-UV utilisé est le même que celui utilisé pour le dosage des isoflavones présenté en section 2. La séparation des fractions protéiques s'effectue à 30°C au travers d'une colonne Agilent SEC-3, 100 Å, 4,6 x 300 mm précédé d'un filtre en ligne RRLC, 4,6 mm, fritté 0,2 µm. La détection s'effectue à 220 nm, l'appareillage (passeur, chambre thermostatée, détecteur) est le même que celui décrit précédemment (Section 2.3.).

6.1.3. Calibration

Les standards suivant fournis par Sigma-Aldrich, avec leurs poids moléculaires associés, ont été utilisés pour déterminer la courbe de calibration :

Vitamine B_{12} (1355 Da), Aprotinine (6500 Da), Cytochrome c (12400 Da), Anhydrase Carbonique (29000 Da), Albumin (66000 Da), Alcool-Déhydrogénase (150000 Da), b-Amylase (200000 Da). Les deux dernières ont été exclues des courbes de calibration car elles ne suivaient pas la relation linéaire *f(t)=log M* du fait probablement que la colonne utilisée ne soit pas sélective pour les hauts poids moléculaires. Chaque standard est injecté deux fois.

6.1.4. Séparation et détection

La séparation s'effectue avec le tampon phosphate décrit précédemment avec un débit de 0,5 mL/min sur une durée de 46 min, la detection s'effectue à 220 nm.

6.1.5. Calculs

Le principe général utilisé pour dresser le profil de poids moléculaire repose sur le fait que l'absorption UV est supposée proportionnelle à la concentration en protéines. Pour chaque chromatogramme obtenu, le logiciel Chroméléon découpe l'aire totale en un nombre défini de bandes (slices). Le temps moyen de chaque bande est ramené sur la courbe de calibration *f(t)=log M* et permet de calculer un poids moléculaire moyen pour chaque bande. L'aire apparente de chaque bande est ramenée sur l'aire totale du chromatogramme. Les aires relatives ainsi obtenues, associées à leur poids moléculaire moyen permettent de dresser un profil de poids moléculaire compris entre 3000 Da (choisi dans le cadre du projet et au-dessus du standard le plus petit) et 66000 Da (standard le plus haut retenu).

La relation suivante est utilisée par le logiciel Chromeleon 6.8 (Extension Pack Version 2.0) :

$$\boldsymbol{M = \frac{\sum n_i M^{n+1}}{\sum n_i M_i^n}}$$

Le détail est présenté dans le Tableau II-6 fourni par le logiciel.

Tableau II-6. Détermination des grandeurs de poids moléculaires par le logiciel

Symbol / Name	Theoretical Formula Using n_i	Theoretical Formula Using w_i	Practical Formulas Using Detector Signal	
M_n Number-average molecular weight (1st moment)	$\frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i}$ (1)	$\frac{\sum_i w_i}{\sum_i w_i / M_i}$ (5)	$\frac{\sum_i H_i}{\sum_i H_i / M_i}$ (9)	$\frac{\sum_i A_i}{\sum_i A_i / M_i}$ (13)
M_w Weight-average molecular weight (2nd moment)	$\frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i}$ (2)	$\frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i}$ (6)	$\frac{\sum_i H_i M_i}{\sum_i H_i}$ (10)	$\frac{\sum_i A_i M_i}{\sum_i A_i}$ (14)
M_z Z average molecular weight (3rd moment)	$\frac{\sum_i n_i M_i^3}{\sum_i n_i M_i^2}$ (3)	$\frac{\sum_i w_i M_i^2}{\sum_i w_i M_i}$ (7)	$\frac{\sum_i H_i M_i^2}{\sum_i H_i M_i}$ (11)	$\frac{\sum_i A_i M_i^2}{\sum_i A_i M_i}$ (15)
M_{z+1} Z+1 average molecular weight (4th moment)	$\frac{\sum_i n_i M_i^4}{\sum_i n_i M_i^3}$ (4)	$\frac{\sum_i w_i M_i^3}{\sum_i w_i M_i^2}$ (8)	$\frac{\sum_i H_i M_i^3}{\sum_i H_i M_i^2}$ (12)	$\frac{\sum_i A_i M_i^3}{\sum_i A_i M_i^2}$ (16)

6.2. Electrophorèse SDS-PAGE

Une étape de solubilisation précède la migration sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Les fractions liquides de types hydrolysats ou les matières premières solides sont diluées dans le solvant de type 2x Laemmli Sample Buffer de chez Biorad contenant (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2,1 % SDS, 26,3 % (m/v) glycérol, et 0,01 % de bleu de bromophénol avec addition extemporanément de 50 µL de BME dans 950 µL dudit tampon). Le mélange est introduit dans un tube vissé avec un même volume équivalent de solution protéique ou hydrolysat préalablement préparée avec une concentration de 4 g/L de protéines. Les tubes sont placés dans un bain marie à 90 °C pendant 5 min. Les gels utilisés pour l'électrophorèse sont des gels gradients préfabriqués de 4 à 20 % d'acrylamide Mini-PROTEAN® TGX™ Gel ou des gels fabriqués en laboratoire avec les solutions en kit (TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions). Un dépôt de 20 ng de protéines par puit est réalisé après solubilisation, refroidissement et centrifugation des extraits protéiques. La migration s'effectue dans un système Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell, à 200 V. La coloration s'effectue par la solution Biorad « Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution » durant 30 minutes avec agitation lente sur plaque agitante et une décoloration par la solution « Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain Soln » (MeoH, acide acétique) jusqu'à décoloration du fond de gel et avec trois changements de solution.

6.3. Degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse est mesuré par la méthode de l'OPA (Nielsen, Petersen *et al.* 2001) est calculé de la sorte :

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} * 100\%$$

$$h = \frac{(serine - NH2 - \beta)}{\alpha\ megv}/g\ protein$$

Pour le soja les constantes α et β sont de 0,970 et 0,342 et pour le riz sont égales à 1,00 et 0,40 (conseillées pour des matières non examinées et utilisées par exemple sur les protéines de blé)

Le réactif OPA est préparé avec : 7,620 g de di-Natétraborate décahydraté et 200 mg de Na-dodécyl-sulfate (SDS), 150 mL d'eau déminéralisée, 160 mg o-phtaldialdéhyde 97% (OPA) dissouts dans 4 mL éthanol. La solution de l'OPA a ensuite été transférée à la solution mentionnée ci-dessus par rinçage à l'eau déminéralisée ; 176 mg de dithiothréitol 99% (DTT) ont été ajoutés à la solution. La solution a été ramenée jusqu'à 200 mL avec de l'eau déminéralisée. Le standard de serine est utilisé avec 50 mg de dilué dans 500 mL d'eau déminéralisée (0,9516 méq/L).

La solution d'échantillon a été préparée comme suit : 0,1 g d'extrait ont été dissouts dans 100 mL d'eau déminéralisée ; 400 µL de standard sérine ou d'échantillon sont mélangés avec 3 mL de réactifs OPA pendant 5 s. Le mélange est lu après 2 min à 340 nm dans le spectrophotomètre.

6.4. Mesure de la solubilité des protéines dans la matière première

Les solubilités sont mesurées par une mise en solution dans de l'eau déminéralisée avec changement de pH avec NaOH 1N ou HCl 1N de pH2 à pH11 dans des tubes de 40 mL avec 0,2 g de matière dans 20 mL d'eau. Les tubes sont agités à température ambiante (30 min) horizontalement sur plaque agitante à 400 rpm avant centrifugation à 6000 g 10 min. Les surnageants sont collectés et dosés par Kjeldahl pour déterminer la quantité de protéines solubilisées ramenée sur la quantité de protéines introduites présentes dans les 0,2 g de matière.

Pour les autres solubilités, hors caractérisation, le dosage se fait après centrifugation après le procédé utilisé (par exemple après hydrolyse enzymatique) puis le surnageant est dosé de la même façon mais peut être extrapolé sur le liquide initial (solubilité absolue).

7. Hydrolyses enzymatiques

7.1. Echelle laboratoire sur 2 g dans des tubes agités

L'isolement des protéines à partir des concentrés ou de la farine s'effectue par l'hydrolyse des polyssacharides pariétaux. Le système utilisé pour le screening des traitements est un tube de centrifugation clos dans lequel sont déposés 2 g de produits dans 10 à 40 mL d'eau déminéralisée et une quantité d'enzyme correspondant à ce qui est conseillé par les fournisseurs ou équivalent si cette donnée n'est pas connue. Ces quantités associées aux activités enzymatiques sont présentées dans le Tableau II-7. Afin d'éviter la solubilisation des protéines, le pH est fixé à 4,5 pour la plupart des traitements ou pH 6 comme indiqué dans la partie Résultat. Les tubes sont placés horizontalement dans un bain marie avec agitation par plateau, la température standard qui couvre l'ensemble des activités est 50 °C. Des essais sont aussi menés à des températures plus hautes comme mentionnés dans la partie résultat.

Le traitement par protéase sur les deux matières nouvelles développées, concentré et isolat protéique, (AI-S76 et AI-R90) s'effectue dans le même système précédemment décrit après une production sur 100 g de matière initiale (aussi présenté dans le tableau suivant).

Tableau II-7. Enzymes utilisées pour l'hydrolyse des polyssacharides sur farine et concentrés protéiques de riz et par protéase sur les matières protéiques de riz et de soja

Activités	**Nom commercial**	**Fournisseur**	**Activité**	**Ratio E/S***				
				R79	S63	Farine	Son	Isolat
Amylases	BAN480L	Novozymes	480 KNU-B/g	34 µL/2 g	68 µL/2 g	102 µL/2 g		
	Fungamyl 800L	Novozymes	800 FAU/g	50 µL/2 g	100 µL/2 g	75 µL/ 2 g		
	Termamyl 120	Novozymes	120 U/mg	-	-	102 et 408 µL/2 g		
	AMG 300L	Novozymes	300 U/mL	-	-	75 et 200 µL/2 g		
β-glucosidase	β-glucosidase (100348)	MP Biomedicals	3811 u/mg	-	-			0,125 % (m/m)
	Beta Glucosidase 16L	Biocatalysts	10 u/g	-	-			10 mL/50 g
Cellulolytiques/ hemi-cellulolytiques	Viscozyme L	Novozymes	100 FBGU/g	10 µL/2 g	20 µL/2 g	10 µL/2 g		-
	Cellulase 13L	Biocatalysts		10 µL/2 g	40 µL/2 g	10 µL/2 g		-
	Hémicellulase	Sigma (H2125)		20 mg/2 g	40 mg/2 g	20 mg/2 g		-
	Xylanase endo-1,4-β-xylanase	Sigma (X2629)		40 mg/2 g	40 mg/2 g	-		-
	Xylanase Pentopan mono BG	Novozymes	2500 U/g	40 mg/2 g	40 mg/2 g	-		-
	Depol 20L	Biocatalysts		15 µL/2 g	30 µL/2 g	-		-
Phytase	Phytase de blé	Sigma (P1259)		100 mg/2 g			100 mg/2 g	
Protéases	Promod 278 MDP	Biocatalysts					0,5 % (m/m P)	0,5 % (m/m P)
	Alcalase	Novozymes	2,4 AU/g	2 % (m/m P)	2 % (m/m P)	-	-	-
	Flavourzyme 500L	Novozymes	500 LAPU/g	3 % (m/m P)	3 % (m/m P)	-	-	-

**Ratios de référence utilisés à petite échelle 2 g et conservés sur mise à l'échelle en réacteur agité de 50 à 100 g*

Après chaque hydrolyse d'une durée de 4 h, une désactivation des enzymes a lieu dans un autre bain marie à 85°C pendant 15 min de plongée, refroidi dans un bain de glace puis centrifugé 10 min à 6000 g. Le lavage s'effectue par addition de 20 mL d'eau préalablement chauffée à 85°C sur le culot après centrifugation. L'ensemble est mélangé vigoureusement par vortex durant 30 secondes. Une deuxième centrifugation du même type est réalisée ensuite avant récupération totale du culot protéique isolé.

7.2. Hydrolyse en réacteur agité

Le réacteur utilisé ici est le même que celui pour l'extraction des isoflavones sur 2 L (Section 3.1

Figure II-8). Cent grammes de matière sont introduits dans le réacteur avec 1 L d'eau déminéralisée, une agitation par palle est effectuée à une vitesse de 100 rpm durant 4 h. La désactivation s'effectue sur une durée de 30 min (durée observée comprenant la montée en température). Le lavage s'effectue ici aussi sur les culots de centrifugation, dans des pots de 250 mL et sont agités manuellement et vigoureusement durant 1 min avant d'être centrifugés. Ce même réacteur est utilisé pour le traitement des matières protéiques de riz

7.3. Comparaison de différents traitements d'hydrolyse

Les traitements d'hydrolyse sont conduits dans des erlenmeyer avec agitation magnétique dans un bain marie pour des durées et températures variables, 50 g d'isolat sont dissouts dans 500 mL d'eau déminéralisée et la solution subie l'un ou l'autre des traitements suivants :

- pH 2 avec HCl 1N, agitée à 85 °C pendant 12 h (Hydrolyse acide forte)
- pH 2 avec HCl 1N, agitée à 85 °C pendant 2 h (Hydrolyse acide douce)
- pH 8 avec NaOH 1N, agitée 45 °C avec ajout de 0,5 % de Papaïne 0,5 u/mg et 0,5 % de Protex 500 DU/mg (m/m) suivie d'une désactivation à 85 °C 10 min (Protéase)
- Premier traitement suivi du troisième (Acide forte et Protéase)
- Aucun traitement (Sans hydrolyse)

Les hydrolysats sont ramenés à pH 8. Chaque solution est mise en contact avec 100 mL de résine XAD7HP pendant 1 h avec agitation magnétique douce (< 100 rpm). Le mélange est ensuite filtré sur toile de nylon pour en récupérer un filtrat. La résine reprise et mise en agitation avec 100 mL d'eau déminéralisée puis filtré une seconde fois, le rinçage est mis de côté et la résine est ensuite mise en suspension dans 200 mL d'éthanol à 96 %, agité 30 min et filtré. Chaque fraction est dosée par HPLC-UV et pour leur contenu en matière sèche par perte à la dessiccation.

7.4. Hydrolyse des protéines de soja avant rétention des isoflavones sur résine

Pour les études de rétention des isoflavones à partir d'hydrolysat protéique de soja tous les hydrolysats sont produits par l'action d'une endoprotéase Promod 278 MDP (700 U/g) de chez Biocatalysts à hauteur de 0,5 % (m/m) sur matière traitée sèche. Avant ajout d'enzyme, et quel que soit le volume produit, un ratio solide/liquide de 1/10 est utilisé à partir d'isolat protéique de soja commercial et une pré-solubilisation est effectuée à 50 °C durant 30 min tout en amenant le pH à 8. L'enzyme sous forme sèche est diluée dans quelques mL d'eau déminéralisée puis transférée avec rinçage dans la solution. La solution est maintenue sous agitation dans un réacteur agité de 2 L à 5 L,

avec une vitesse de 200 rpm à 300 rpm, et durant une durée qui est fonction du traitement mais qui est généralement de 8 h notamment pour les essais d'adsorption en mode dynamique. En fin de traitement la protéase est désactivée à 85 °C durant 15 min. La solution est ensuite diluée par un ou deux volumes équivalents d'eau déminéralisée puis ramenée au pH désiré (souvent 9) avec une solution de soude à 1 N. Lors des mises à l'échelle industrielle sur 64 L, l'hydrolyse a été effectuée dans une cuve de 200 L avec agitation par circulation, le même protocole a été réalisé, la dilution a été effectuée dans des fûts de 100 L. Pour l'échelle 100 L les traitements ont été effectués au Centre de Valorisation des Glucide d'Amiens dans un réacteur de 4 m^3.

Chapitre III. Extraction solide-liquide des isoflavones de soja par méthodes conventionnelles et fluides pressurisés

1. Introduction

Afin de développer un isolat protéique de soja avec une teneur réduite en isoflavones, sous le seuil des 50 ppm (µg d'isoflavones par g de protéines), une première approche a consisté à l'extraction solide-liquide des isoflavones par solvant, à partir de matières protéiques de soja.

Ce type d'extraction a servi premièrement pour le développement d'une méthode d'analyse par HPLC-UV afin de pouvoir quantifier rapidement et précisément la teneur des différentes isoflavones aux vues des problématiques discutées dans le premier chapitre. Les différentes formes d'isoflavones font l'objet d'un suivi analytique pour la caractérisation des matières premières puis pour le suivi de l'efficacité des procédés.

L'extraction solide-liquide a été étudiée en tant que procédé de production d'isolats protéiques appauvris en isoflavones, dans un système conventionnel avec mélange hydroalcoolique. En l'occurrence, l'extraction éthanolique a fait l'objet d'une optimisation à petite échelle par plan d'expérience, et d'une adaptation à échelle industrielle sur extracteur de type Tournaire à fond filtrant. L'élimination des isoflavones a aussi été étudiée au travers de méthodes plus modernes, en particulier des extractions par fluides pressurisés, qui respectent certains principes de la chimie vertes et compatible avec une application alimentaire.

Une troisième partie de ce chapitre décrit l'extraction des isoflavones par eau pressurisée à partir de farine et d'isolat protéique et a été étudiée par une approche d'optimisation par plan d'expériences, à échelle laboratoire *via* un système ASE (Accelerate Solvent Extraction). Enfin, des essais complémentaires par extraction au CO_2 supercritique sont aussi présentés.

1.1. Caractérisation globale et teneur en isoflavones par HPLC-UV

1.2. Les matières premières utilisées

Plusieurs matières ont été envisagées au départ pour leur prépondérance sur le marché des ingrédients de soja : différentes farines dégraissées, des concentrés et des isolats protéiques de soja toutes sous forme de poudre sèche. Ces matières ont des teneurs en protéines différente (Tableau III-1) et sont caractérisées par des méthodes décrites Chapitre II.1. Les teneurs en protéines dans les concentrés de soja sont de l'ordre de 60 % et celles des isolats sont de 85 % (90 % sur matière sèche). Les teneurs en minéraux sont relativement fortes compte tenu des procédés de fractionnement subis par la matière.

Tableau III-1. Caractérisation des matières premières de soja

	Concentrés		Isolats		Farines		
	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1
Humidité (%)	4,3 ± 0,6	7,07 ± 0,44*	4,77 ± 0,31	6,26 ± 0,12	8,03 ± 0,09	7,00 ± 0,04	7,12 ± 0,11
Protéines (%)**	58,9 ± 1,5	63,6 ± 0,5	82,1 ± 1,8	83,3 ± 0,3	49,36 ± 2,0	51,15 ± 2,1	50,3 ± 1,5
M Minérale (%)**	5,54 ± 0,02	6,76 ± 0,21	4,39 ± 0,25	6,21 ± 0,10	7,05 ± 0,15	7,2 ± 0,18	6,8 ± 0,22
Protéines (%) (fournisseur)	70,60	68,00	92,50	90,00	55	55	50
M Minérale (%) (fournisseur)	-	6,00	-	7,50	-	-	-

**Ecart-types basés sur 3 Répétitions ; ** données sur matières sèches ; dosages des protéines par Kjeldahl (N 6,25). Les lettres désignent les différents produits et le numéro décrit le lot pour un même produit commercial, ici un seul lot par produit est utilisé*

1.3. Dosage des isoflavones dans les matières premières

1.3.1. Problématique identifiée

Un premier travail a consisté à établir un protocole basé sur une extraction avec un mélange acétonitrile, et eau acidifiée proposé par Murphy sur poudre sèche (Murphy, Barua *et al.* 2002). Cependant, étant donné la rareté des formes conjuguées disponibles auprès des fournisseurs de standards et de leur nature instable, une première technique d'hydrolyse acide des formes conjuguées d'isoflavones a été testée sur plusieurs matières premières et ont montré trop de variabilité. Ainsi, la séparation et l'identification des 12 formes d'isoflavones (sans hydrolyse) a été mises en place à partir d'autres travaux (Collison 2008) ; ces aspects sont discutés dans Chapitre II.2.
L'autre problématique rencontrée par ces méthodes réside dans la préparation de l'échantillon proposée dans la littérature car elle est relativement lourde et donc peu adaptée à un suivi de procédés de production (extraction de 2 h, transferts, centrifugation, évaporation, resuspension avant filtration et injection). Pour parvenir à une méthode de préparation plus rapide, des traitements différents de l'échantillon analytique ont été étudiés en conservant cependant le solvant d'extraction de type Murphy et l'identification chromatographique des 12 formes proposée par Collison. Ces traitements ont été testés à la fois à partir de formes sèches ou liquides d'isolats protéiques, en s'assurant que les lots soient homogènes. Une méthode finale comprenant la méthode d'extraction, la préparation de l'échantillon et la séparation chromatographique a été mise au point et utilisée pour l'ensemble des travaux de recherche présentés dans cette thèse.

1.3.2. Méthode avec hydrolyse par le dosage des structures de base

La méthode par hydrolyse acide a déjà été étudiée dans la littérature (Nakamura, Tsuji *et al.* 2000). Elle permet d'utiliser les standards des trois aglycones (structures de base) pour l'étalonnage. Avant hydrolyse les teneurs en aglycones sont nulles ou représentent au plus 5 ppm (µg/g) soit 3,4 % pour les concentrés alors qu'elles représentent environ 30 % à 40 % pour les isolats indiquant (Tableau III-2). Bien que cette méthode de traitement permette de doser l'ensemble des isoflavones avec seulement trois standards, l'erreur analytique est trop importante atteignant près de 30 % en particulier sur les isolats protéiques. Il a donc été nécessaire d'utiliser une méthode sans hydrolyse qui permette de doser l'ensemble des formes.

Tableau III-2. Dosages des isoflavones effectués sur différentes matières protéiques de soja par la méthode d'extraction Murphy (MeCN 53%, eau acidifiée) suivie d'une étape d'hydrolyse acide

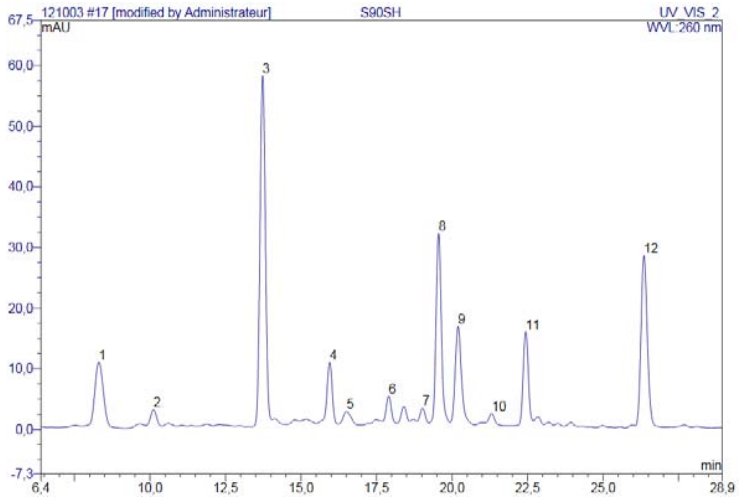
Type produit	Produit	Avant hydrolyse (µg/g)	Après Hydrolyse (µg/g)
Concentrés	A1	0	50 ± 1
	A2	0	66 ± 15
	B1	5	144 ± 14
Isolats	C1	257	808 ± 271
	D1	341	1018 ± 289
	D2	294	916 ± 77
Farines	E1	775	794 ± 94
	F1	143	1830 ± 91

Ecart-types effectués sur 3 extractions. Les lettres désignent différents produits et les numéros associés décrivent le lot

1.3.3. Méthode sans hydrolyse avec identification des 12 formes

1.3.3.1. Séparation chromatographique

L'identification et la séparation des 12 formes retrouvées dans le soja ont été conduites après optimisation du gradient d'élution sur des colonnes de types phase inverse C18 et en utilisant les 6 standards aglycones et β-glucosides (Figure III-1). De plus, le développement de la séparation sur colonne de type Core-Shell a permis une séparation rapide et une résolution de pics plus optimale comparativement à une colonne plus traditionnelle avec une durée de séparation réduite de 33 % (les détails des gradients et des colonnes sont présentés dans Chapitre II.2.4). L'attribution des pics aglycones et glucosides a été établie par comparaison aux standards. Les formes les plus complexes ont été identifiées par l'allure des spectres UV, les longueurs maximales d'adsorption et par l'utilisation d'un traitement thermique permettant de suivre la dégradation des formes malonyles et formes acétyles.



1	Daidzine
2	Glycitine
3	Génistine
4	Malonyl-daidzine
5	Malonyl-glycitine
6	Acétyl-daidzine
7	Acétyl-glycitine
8	Malonyl-génistine
9	Daidzéine
10	Glycitéine
11	Acétyl-génistine
12	Génistéine

Figure III-1.Exemple de chromatogramme obtenu à partir d'un isolat protéique avec les 12 formes d'isoflavones identifiées

1.3.3.2. Influence de l'extraction dans un système par agitation magnétique et de la préparation de l'échantillon

Afin de déterminer quels sont les facteurs intervenant dans l'erreur analytique, plusieurs traitements ont été modifiés à partir d'un solvant Murphy et d'un système par agitation magnétique classique. L'équilibre de l'échange a été contrôlé par l'utilisation d'une durée d'extraction supérieure à 2 h (durée recommandée par les méthodes d'analyse précédemment citées). Cette dernière a montré que la teneur en isoflavones ne varie plus après 2 h d'extraction. Cependant l'écart expérimental semble en être fortement réduit passant de 118 µg/g à 7 µg/g, montrant que ce système d'agitation induirait de fortes variations sur 2 h (Tableau III-3) dans les conditions testées et sur isolat protéique. Ensuite, l'échantillonnage a montré qu'il n'y a pas de différences dans un même lot (même sac avec trois prises d'essai au milieu et trois prises en fond de sac).

Tableau III-3. Effet de la durée d'extraction, de la prise d'essai et du traitement de l'extrait sur la teneur en isoflavones

Paramètre étudié	Essai	Teneur en isoflavones (µg/g)
Cinétique*	Mélange (2h)	927 ± 118
	Mélange (4h)	962 ± 7
Echantillonnage**	Echantillons internes	916 ± 40
	Echantillons superficiels	922 ± 20
Post-traitement***	Pas de resuspension	932 ± 21
	Resuspension MeOH 80 %	935 ± 92

** Trois extractions avec deux durées différentes par agitation magnétique ; **Deux types d'échantillonnage effectués dans des lots ensachés de 20 Kg ; ***Resuspension par évaporateur rotatif du surnageant après centrifugation. Valeurs exprimés sur base sèche*

Afin de raccourcir le protocole de préparation, les étapes d'évaporation et de resuspension dans du MeOH 80 % ont été éliminées, l'effet de ces étapes sur la répétabilité n'est pas significatif dans notre système et avec ce type de matière.

Pour s'assurer du choix du solvant qui est discuté fréquemment dans la littérature (Chapitre I.3.2) aucune différence significative n'est observée entre l'extraction acétonitrile de type Murphy et un mélange méthanol/eau 80 % à partir de l'isolat protéique testé (Tableau III-4). Les essais de mélange par agitation au vortex couplés à un traitement par sonication ont permis d'établir un protocole rapide pour l'extraction des isoflavones qui ne s'éloigne pas des résultats obtenus avec le système conventionnel, une sonication de 5 min étant suffisante (Méthodes décrites Chapitre II.2.2). Outre la rapidité du traitement, un des avantages de cette amélioration consiste en l'utilisation de tube de centrifugation pour l'extraction ce qui facilite la manipulation et évite les transferts de solution. Cette modification de protocole, comparée à une agitation par barreau aimanté est rarement mentionnée bien qu'elle ait été étudiée et validée à partir de jus de soja avec une étape à 40 °C (Zafra-Gómez, Garballo *et al.* 2010). De plus, la sonication a déjà montré son efficacité dans des systèmes proches concernant ces composés (Luthria, Biswas *et al.* 2007).

Tableau III-4. Effet du traitement de l'échantillon sur le dosage des isoflavones

Solvant	Produit	Mélange	Teneur en isoflavones (µg/g)
MeOH 80%	Isolat sec	Barreau 2 h	1491 ± 11
Murphy (MeCN 53 %, eau acidifiée)	Isolat sec	Barreau 2 h	1517 ± 109
	Isolat sec	Vortex 1 min	1504 ± 207
	Hydrolysat liquide*	Vortex 1 min	1515 ± 43
	Isolat sec	Vortex 1 min Sonication 5 min	1606 ± 24
	Isolat sec	Vortex et sonication 15 min	1584 ± 96

**Hydrolysat liquide obtenu par traitement endoprotéase selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes*

Ainsi, ces comparaisons ont montré la possibilité de doser des hydrolysats liquides, lesquels ont été fréquemment analysés durant l'étude de la rétention des isoflavones sur résines chromatographiques (Chapitre V.3). Finalement la durée totale d'extraction est passée de 120 min à 6 min et la séparation solide-liquide a pu être effectuée directement. Ceci a permis de pouvoir doser les isoflavones plus rapidement et facilement pour le suivi des procédés d'extraction

1.3.3.3. Limite de détection de la méthode

Le premier objectif de ces travaux de recherche étant d'atteindre des teneurs en isoflavones inférieures à 50 ppm (Teneur en isoflavones en µg/g exprimée sur matière sèche), il a été important de s'assurer que ces valeurs résiduelles soient détectables. Ainsi les limites de détection et de quantification ont été déterminées pour chaque isoflavones et présentées dans le tableau suivant (Tableau III-5).

Tableau III-5. Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) des différentes isoflavones dans un extrait d'isolat protéique de soja

	LD (µg/g)*	LQ (µg/g)
Daidzine	4,8	16
Glycitine	5,1	17
Genistine	3,5	12
Malonyl-Daidzine	4,8	16
Malonyl-Glycitine	5,1	17
Acétyl-Daidzine	4,8	16
A-Glycitine	5,1	17
Malonyl-Genistine	3,5	12
Daidzéine	3,9	13
Glycitéine	3,1	10
A-Genistine	3,5	12
Genistéine	2,6	9

** Calculs des LD et LQ basés sur l'approche graphique. LD 3 fois supérieures à l'amplitude du bruit de fond et LQ 10 fois à partir d'un échantillon d'hydrolysat de soja typiquement dosé durant ces travaux*

D'après ces paramètres de détection il a été possible de doser des teneurs résiduelles en isoflavones inférieures à 50 µg/g. Cette méthode a été considérée comme notre référence dans l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse.

1.3.3.4. Dosage des isoflavones dans les matières premières de soja disponibles

A partir de la méthode précédente les isoflavones sont dosées sur plusieurs types de produits commerciaux de soja et sur différents lots pour un même produit, les résultats sont présentés Tableau III-6. Outre l'origine et les conditions de cultures de la plante, les procédés de concentrations induisent généralement des dégradations et donc des variations en termes de distribution des différentes formes d'isoflavones de soja (Rostagno, Villares *et al.* 2009). Ces voies de dégradations ont déjà été identifiées (Figure III-2) et peuvent avoir lieu durant les procédés ou lors de la conservation d'échantillons analytiques. La teneur totale en isoflavones est fortement réduite dans les concentrés protéiques.

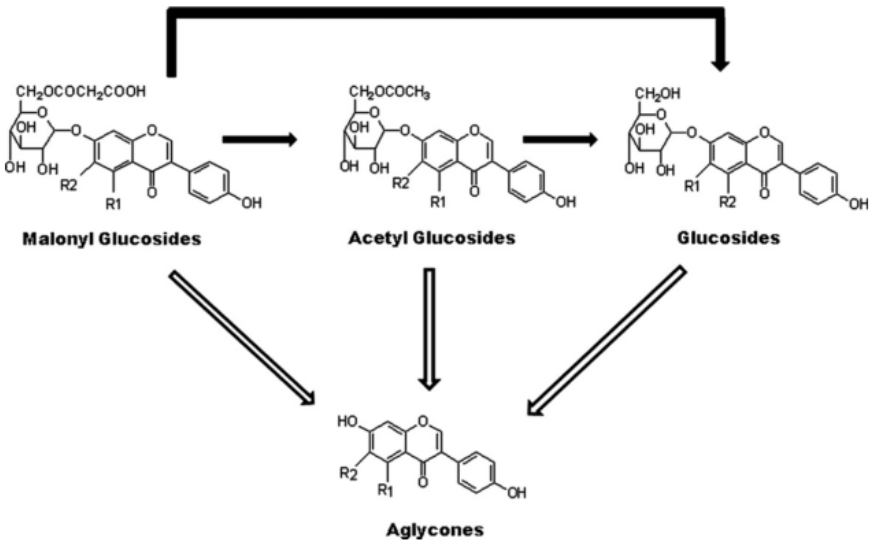


Figure III-2. Les voies connues de dégradations des formes conjuguées d'isoflavones (Rostagno, Villares et al. 2009)

Les « farines » analysées, qui représentent le produit le moins raffiné, ont des teneurs comparables mais peuvent varier sur la distribution des différentes formes avec la présence ou non d'aglycones si bien que l'une contient près de 70 % d'aglycones et l'autre quasiment aucuns (Tableau III-6) indiquant qu'un traitement différent a été appliqué probablement de nature thermique sur la farine E1. D'après la littérature, ce sont les formes malonyles qui sont majoritaires dans le soja natif ce qui signifierait que la farine G1 s'en rapproche le plus (Rostagno, Villares *et al.* 2009).

Les « concentrés » ont les teneurs les plus faibles en isoflavones. Ceci est dû au procédé de production qui fait intervenir une étape d'extraction aqueuse ou hydroalcoolique (non communiqué par le fournisseur ici) qui est décrit dans le chapitre bibliographique Chapitre I.2.1.2. Il y a en outre une absence des formes aglycones qui peut être expliquée soit par l'utilisation d'une farine ne contenant pas d'aglycones ou par le fait que ces formes soient plus facilement extraites.

Parmi les « isolats » on compte trois lots du même produit (Isolats D1 à D3) et un produit supplémentaire d'un autre fournisseur (C1). Ils contiennent près de 30 % d'isoflavones aglycones ce qui est dû au procédé de production (solubilisation alcaline, précipitation, séchage), ces derniers entrainent aussi l'apparition de formes acétyles qui sont rares à partir de matières peu transformées. Pour le même produit, la teneur en isoflavones peut être très variable allant de 983 µg/g à 1606 µg/g (µg/g) sur base sèche. Afin de réduire la teneur en isoflavones dans les isolats, cette particularité devra être considérée lors de futures productions industrielles car d'un isolat à l'autre la proportion

d'isoflavones à extraire change fortement. Dès que cela a été possible, le lot D3 a été utilisé car il contient la plus forte teneur en isoflavones.

Il est important de rappeler que toutes les données de dosage d'isoflavones dans ce manuscrit sont exprimées en équivalent aglycones. Ceci permet d'être conforme aux autres travaux de recherche, aux recommandations des autorités sanitaires et surtout cela permet de tenir compte des masses moléculaire différentes entre les formes de base aglycones et les formes conjuguées (Chapitre II.2.5).

Tableau III-6. Teneurs des différentes isoflavones en µg/g sur base sèche (µg/g) et en équivalents aglycones dans les trois types de matières premières disponibles

	Isolats				**Concentrés**			**Farines**	
	D1	**D2**	**D3**	**C1**	**A1**	**A2**	**B1**	**E1**	**G1**
Daidzéine	127,3 ± 3,4	129,5 ± 0,9	132,0 ± 3,4	149,9 ± 3,1	ND	ND	4,6 ± 0,5	322,6 ± 5,1	ND
Glycitéine	16,3 ± 2,4	19,6 ± 0,5	ND	20,1 ± 1,7	ND	ND	ND	85,4 ± 1,5	ND
Genistéine	164,3 ± 2,5	164,5 ± 0,1	212,0 ± 1,0	182,4 ± 1,1	ND	ND	5,1 ± 0,1	479,2 ± 3,4	7,0 ± 0,1
Daidzine	75,2 ± 2,0	60,7 ± 12,1	100,0 ± 6,3	96,6 ± 2,6	6,4 ± 0,4	7,8 ± 1,2	35,6 ± 0,1	39,2 ± 1,3	66,4 ± 5,9
Glycitine	10,6 ± 0,1	12,2 ± 0,6	10,0 ± 2,7	18,7 ± 0,6	ND	38,9 ± 0,8	6,1 ± 0,5	23,2 ± 3,2	14,2 ± 0,0
Génistine	295,7 ± 5,3	279,7 ± 02,4	511,0 ± 3,3	348,5 ± 2,9	23,2 ± 0,4	10,8 ± 3,0	85,7 ± 1,3	132,4 ± 2,5	204,3 ± 8,5
Acétyl-daidzine	31,3 ± 1,4	30,5 ± 0,9	43,0 ± 1,9	46,9 ± 3,1	6,4 ± 0,0	4,2 ± 0,1	9,3 ± 0,3	ND	4,4 ± 6,2
Acétyl-glycitine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acétyl-génistine	70,0 ± 1,0	67,1 ± 1,2	113,0 ± 0,7	85,3 ± 1,8	10,3 ± 0,4	7,4 ± 0,2	13,5 ± 0,0	35,7 ± 0,6	13,0 ± 0,7
Malonyl-daidzine	49,5 ± 2,6	57,7 ± 0,9	111,0 ± 7,2	168,6 ± 7,8	12,5 ± 0,3	15,0 ± 4,3	16,3 ± 0,2	ND	292,2 ± 19,0
Malonyl-glycitine	8,1 ± 0,4	ND	ND	17,3 ± 1,51	ND	ND	ND	ND	28,7 ± 0,5
Malonyl-génistine	185,4 ± 3,7	161,6 ± 4,5	375,0 ± 5,9	375,0 ± 5,9	22,1 ± 0,8	34,0 ± 0,3	25,1 ± 0,5	36,2 ± 0,6	477,5 ± 28,0
Total	**1033,6 ± 15**	**983,2 ± 10**	**1606,2 ± 24**	**1572,3 ± 25**	**80,9 ± 2,0**	**117,9 ± 8,0**	**201,3 ± 2,0**	**1153,9 ± 12**	**1107,8 ± 56**

Extractions effectuées en triplicata avec solvant Murphy et système rapide de mélange par vortex et sonication

2. Extraction éthanolique des isoflavones

2.1. Objectif et démarche expérimentale

L'extraction alcoolique apparait comme la méthode pouvant être extrapolée de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle. L'objectif de ces travaux est d'optimiser l'extraction d'isoflavones de soja à partir d'isolats protéiques et de comprendre l'influence des paramètres d'extraction à partir de cette matrice végétale. Pour rappel, le seuil établi est une teneur résiduelle en isoflavones de 50 µg/g (sur produit sec) en partant d'isolats de 1000 à 1600 µg/g.

Un plan d'expériences de Doehlert à deux paramètres (température d'extraction et ratio d'éthanol dans le solvant d'extraction) a été mis en place. Deux types de réponses ont été étudiés, l'extraction des aglycones et l'extraction des isoflavones totales, permettant de mettre en évidence des différences de capacité d'extraction en fonction de la nature de ces composés et de définir les conditions optimales d'extraction.

La cinétique d'extraction des différentes formes d'isoflavones et des extractions multi-étagée a été réalisée. Ensuite des essais d'extraction multi-étagée dans un réacteur agité ont été réalisés sur les conditions définies par l'optimisation à petite échelle. Une mise à l'échelle sur 20 kg d'isolat a ensuite été conduite et adaptée à un extracteur Tournaire à fond filtrant.

2.2. Comportement cinétique

La cinétique d'extraction des isoflavones a été suivie pour l'utilisation d'éthanol à 80 % et une température de 50 °C durant 6 h. Son évolution rapide indique un équilibre d'échange atteint dès 45 min d'extraction (Figure III-3). La diffusion ne semble donc pas être limitante dans cette extraction solide-liquide. Cette cinétique est similaire pour l'ensemble des 12 formes d'isoflavones suivies, leur proportion respective correspond, de plus, à celle décrite par la caractérisation HPLC-UV faisant intervenir de l'acétonitrile.

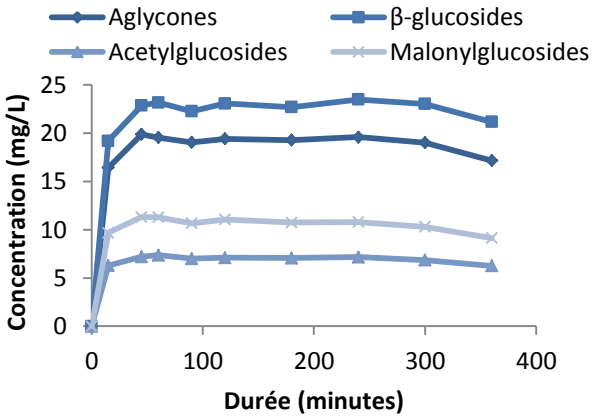


Figure III-3. Cinétique d'extraction des isoflavones au cours d'une extraction à l'éthanol à 80 % pour une température de 50 °C

En fin d'extraction la teneur en isoflavones chute légèrement soit à cause d'une dégradation soit du fait d'une cristallisation des isoflavones qui peut entrainer une perte de signal. En effet l'isolement des isoflavones de soja par cristallisation dans l'éthanol a déjà été montrée (Harjo, Wibowo *et al.* 2006). Pour l'approche expérimentale une durée de 2 h a été utilisée.

2.3. Première approche par planification expérimentale

La planification expérimentale a été conduite sur les contours de la matrice de type Doehlert (Figure III-4) afin de pouvoir utiliser la démarche par surface de réponse avec un nombre d'expériences limité. Le protocole d'extraction est décrit en Chapitre II.3.1. L'extraction est réalisée sur 2 h en partant de 20 g d'isolat protéique avec un ratio solide-liquide de 1/10. Le solvant hydroalcoolique varie de 20 % à 80 % d'éthanol et la température de 30 °C à 70 °C.

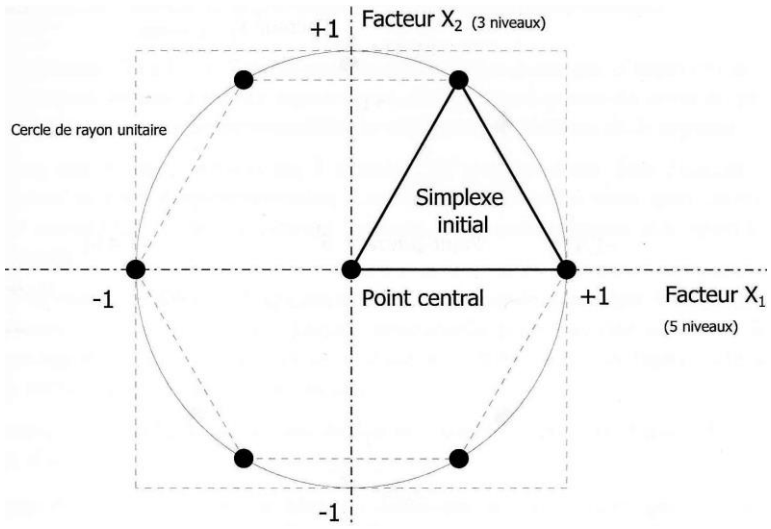


Figure III-4. Plan d'expériences de Doehlert pour deux facteurs

Un modèle quadratique est utilisé faisant intervenir le facteur X_1 pour le paramètre température et X_2 pour celui de la teneur en éthanol. Leurs coefficients sont linéaires a_1 et a_2 ; quadratiques a_{11} et a_{22} ou sont associés à l'interaction des paramètres a_{12} (équation 1).

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 + a_{11}{X_1}^2 + a_{22}{X_2}^2 \qquad (1)$$

Les valeurs prédites et mesurées des rendements d'extraction des isoflavones, les aglycones seuls ou les isoflavones totales, sont présentées pour les 7 conditions différentes et 3 répétitions sur les conditions centrales (Tableau III-7).

Tableau III-7. Les différents niveaux des variables choisies pour le plan de Doehlert avec les réponses prédites et mesurées

T°C (X1)	% EtOH (X2)	X1	X2	Rdt IF Aglycones		Rdt IF Totales	
				M* (%)	P (%)	M (%)	P (%)
50	50	0	0	63,1	65,5	56,3	62,2
70	50	1	0	64,1	62,9	59,4	50,2
60	80	0,5	0,866	78,3	79,6	70,2	79,4
40	80	-0,5	0,866	79,8	78,6	51,4	42,2
30	50	-1	0	62,0	63,2	11,0	20,2
40	20	-0,5	-0,866	24,7	23,4	27,5	18,3
60	20	0,5	-0,866	20,8	22,0	1,8	11,0
50	50	0	0	67,3	65,5	57,4	62,2
50	50	0	0	66,1	65,5	73,0	62,2

**Rdt pour rendements mesurés (M) ou prédits (P), IF pour isoflavones*

Les valeurs mesurées sont corrélées aux valeurs prédites par le modèle quadratique induisant des coefficients de corrélation de 99 % pour les IFA (isoflavones aglycones) et 87 % pour les IFT (isoflavones totales exprimées en équivalent aglycones) ce qui démontre que le modèle décrit bien l'extraction des isoflavones aglycones. Pour les isoflavones totales cette corrélation est moins bonne probablement parce que l'analyse concernant l'ensemble des isoflavones a été effectuée plus tardivement induisant de légères variations. L'analyse statistique par le test de Fisher démontre la validation du modèle appliqué aux formes aglycones.

Pour l'extraction des isoflavones totales les rendements d'extraction sont compris entre 2 % et 73 %. L'étendue des rendements en isoflavones de type aglycones est de 20,8 % à 79,8 %, des valeurs plus basses sont obtenues à partir de teneurs en éthanol faibles (20 %). La teneur en éthanol est un paramètre significatif contrairement à celui de la température. De la même façon l'intéraction entre les paramètres n'influence pas l'extraction des isoflavones (IFA ou IFT) significativement.

Tableau III-8. Coefficients des modèles quadratiques du plan d'expériences et significativité

	Rdt IFA		Rdt IFT	
Coefficients	Valeur	*p value*	Valeur	*p value*
a0				
a1	-0,0019	*0,9032*	0,1499	*0,1836*
a2	**0,3252***	***0,0002***	**0,2665***	***0,0549***
a11	-0,0241	*0,3649*	-0,2701	*0,1446*
a22	**-0,1862***	***0,0038***	-0,2370	*0,1836*
a12	0,0139	*0,6609*	0,2567	*0,2369*
Fisher*	F_{table} = 18,51 **R^2=0,99**	**F_m = 3,95**	F_{table} = 18,51 R^2= 0,87	F_m = 34,24

*IFA pour Isoflavones Aglycones et IFT Isoflavones Totales ; F_{table} valeur de la table de Fisher pour un degré de confiance de 5 %; F_m valeur mesurée ; * en bleu les coefficients significatifs avec un degré de confiance de 5 % (p<5 %)*

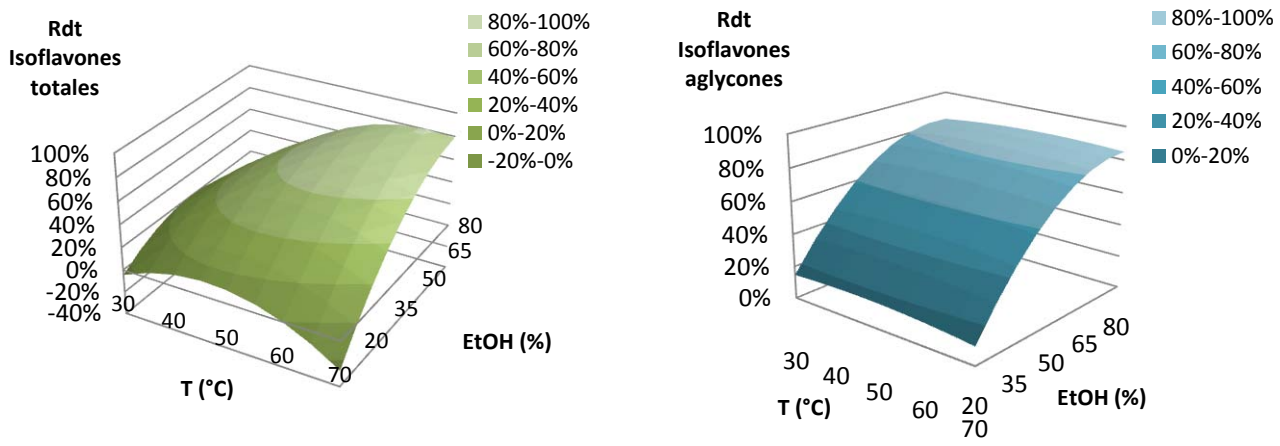


Figure III-5. Surface de réponse des modèles quadratiques représentant le rendement en extraction en fonction de la température de l'extraction et de la teneur en éthanol

Les coefficients associés à la teneur en éthanol sont proches pour les deux types de réponses (Tableau III-8). Parmi les coefficients quadratiques, seul celui de teneur en éthanol a une influence, particulièrement dans le cas des isoflavones aglycones en tant que réponse du modèle, ce qu'il est possible de visualiser par les courbes de surface de réponse (Figure III-5). Bien que le modèle global ne soit pas validé statistiquement, il semble que la température ait un effet positif sur l'extraction des isoflavones totales avec un optimum à 64 °C.

La surface de réponse décrit visuellement une influence de la teneur en éthanol, qui est légèrement plus importante pour les structures aglycones, une teneur à 80 % d'éthanol étant l'optimum dans les deux cas ce qui a déjà été montré à partir de cotylédons germés de soja (Cho, Lee *et al.* 2009). Aucune température optimale ne peut être définie pour les formes aglycones puisque ce paramètre n'a que très peu d'influence quelle que soit son niveau. Cela indiquerait que la température aurait une influence sur

l'extraction des formes conjuguées seulement (malonyles, acétyles, glucosides). Ces formes n'auraient donc probablement pas les mêmes interactions vis-à-vis de la matrice qui est modifiée avec l'augmentation de la température comme cela est décrit dans paragraphe suivant. Les proportions de formes aglycones et formes conjuguées dans les isolats traités, variables selon les conditions de stockage, l'origine du produit ou pour un même produit, pourront influencer fortement l'extraction au vu de leurs différents comportements. Il semble cependant nécessaire, d'après son influence sur l'extraction des isoflavones totales, d'utiliser une température supérieure à 50 °C.

2.4. Influence des paramètres sur la perte en matière protéique

Si la solubilisation de la matière protéique (matière sèche récupérée dans le surnageant après centrifugation) est introduite en tant que réponse du modèle quadratique, ce qui correspond aussi à la perte engendrée par l'extraction éthanolique, le modèle est validé avec une corrélation de 98 % entre valeurs prédites et mesurées (Tableau III-9), et validé statistiquement avec le test de Fisher avec un seuil de confiance de 5 % (Tableau III-10).

Tableau III-9. Rendement en matière sèche lors de l'extraction, valeurs mesurées et prédites par le modèle

T°C (X1)	% EtOH (X2)	Rdt MS mesuré (%)	Rdt MS prédit (%)
50	50	32,0 %	34,1 %
70	50	40,1 %	41,7 %
60	80	19,8 %	18,2 %
40	80	16,5 %	18,1 %
30	50	27,6 %	26,0 %
40	20	22,8 %	24,4 %
60	20	41,5 %	39,9 %
50	50	34,0 %	34,1 %
50	50	36,4 %	34,1 %

Les deux paramètres ont une influence significative sur la perte en matière protéique, et l'interaction entre les paramètres joue aussi un rôle. L'augmentation de la température entraine la solubilisation de la matrice alors que l'augmentation de la proportion d'éthanol permet de diminuer cette solubilisation. Une augmentation de la teneur en éthanol à tendance à diminuer l'impact de la température sur la perte en matière protéique. Par exemple, pour une teneur en éthanol de 20 % la perte en matière protéique passe de 15 % à près de 50 % en fonction de la température. Pour une teneur de 80 % d'éthanol cette variation n'est plus visible, elle reste autour de 18 % même pour les températures élevées. Ces variations sont identifiables par la surface de réponse correspondante (Figure III-6).

Tableau III-10. Coefficients du modèle quadratique du plan d'expériences et significativité pour une réponse correspondant au rendement de matière sèche extraite

Coefficients	Valeur du coefficient	*p value*
a0		
a1	0,0784	***0,018***
a2	-0,0807	***0,016***
a11	-0,0023	*0,9363*
a22	-0,1189	***0,0200***
a12	-0,0887	*0,075*
Fisher*	F_{table} = 18,51 **R^2= 0,98**	**F_m = 10,19**

*F_{table} valeur de la table de Fisher pour un degré de confiance de 5 %; F_m valeur mesurée ; * en bleu les coefficients significatifs avec un degré de confiance de 5 % (p<5 %)*

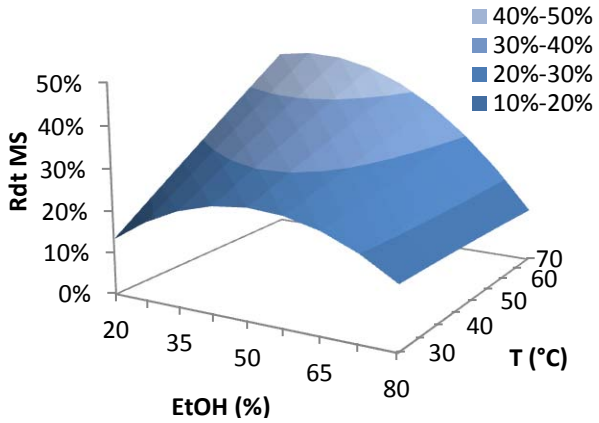


Figure III-6. Surface de réponse des modèles quadratiques concernant la perte en matière protéique lors de l'extraction des isoflavones par éthanol

Cette importante solubilisation de la matière pour les températures les plus hautes peut être due à des phénomènes d'hydrolyses de protéines qui ont lieu lorsque l'eau est majoritairement présente dans le mélange de solvant et qui diminuent lorsque la teneur en éthanol augmente. De plus, les protéines ont tendance à précipiter avec l'éthanol ce qui permet de limiter ces pertes. Les protéines de soja (essentiellement la glycinine et la β-conglycinine) sont des globulines, de par cette nature, elles ne sont pas solubles dans les solvants alcooliques.

Dans le but d'optimiser l'élimination des isoflavones, le rendement maximum en isoflavones n'est pas le seul paramètre à suivre, la perte en matière protéique est importante et proportionnelle à la teneur en eau intégrée dans le mélange hydroalcoolique. Pour une application industrielle, et en particulier en partant d'un produit raffiné relativement coûteux tel que l'isolat protéique, il est indispensable de limiter au maximum les pertes. Une teneur en éthanol au moins égale à 80 % devra donc être choisie, il est

préférable d'utiliser une température supérieure à 50 °C au vu du rendement en isoflavones totales, cependant la perte en protéines augmente avec la température.

La teneur finale en isoflavones totales dans les matières épuisées après extraction est de 207 à 368 µg/g ce qui reste encore éloigné de l'objectif à atteindre qui est de 50 µg/g. Il a donc été envisagé d'étudier l'extraction multi-étagée sur les conditions préalablement mises en place.

2.5. Extraction multi-étagée en réacteur de 2 litres et Soxhlet

Pour éliminer les isoflavones par extraction éthanolique trois étages d'extraction ont été réalisés sur isolat protéique de soja dans un réacteur de plus grande capacité (2 L) avec 120 g de matière au départ (Figure III-7) et sur les conditions définies précédemment (2 h ; 50 °C ; 80 % éthanol) le détail de la méthode est présentée Chapitre II.3.2. Deux types de dosage ont été effectués, des analyses sur la matière résiduelle après séchage (méthode de référence à l'acétonitrile) et des analyses effectuées sur l'extrait éthanolique après centrifugation. Ainsi, le rendement d'extraction du premier étage est égal 68,4 % à partir de l'analyse de l'extrait et 25,3 % des isoflavones de départ restent présentes dans le résidu, ou culot protéique (Tableau III-11). Ce taux d'extraction est très proche de celui défini sur les mêmes conditions du plan d'expériences pour une température de 50 °C et la teneur résiduelle est approximativement la même (278 µg/g). Bien qu'il n'ait pas été validé statistiquement, pour une température de 50 °C et 80 % d'éthanol le modèle donnait un rendement de 65 % d'isoflavones totales ce qui est proche de la valeur décrite ici. La perte en matière sèche (équivalent protéines) était de 18 % environ, elle est ici de 11,4 % pour le premier étage d'extraction.

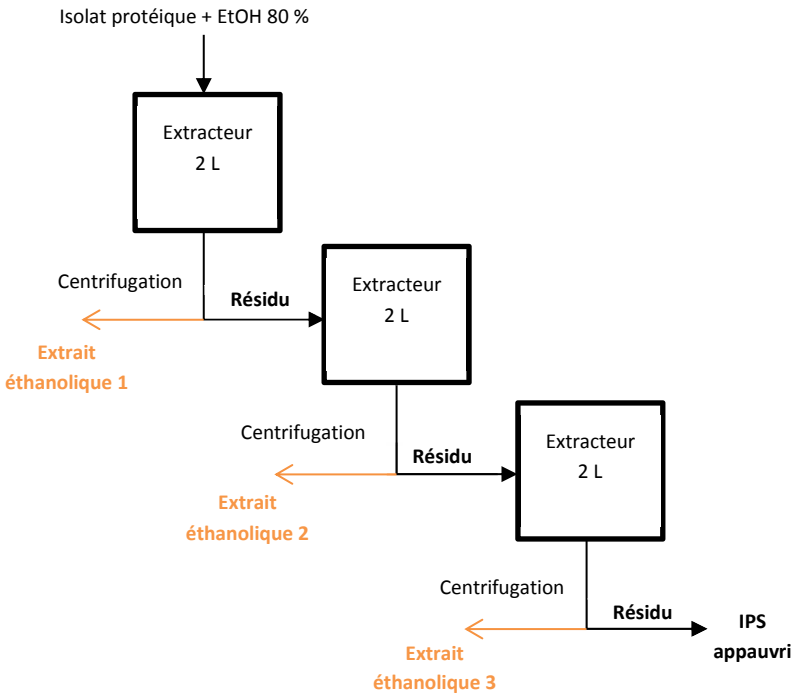


Figure III-7. Schéma du procédé d'extraction multi-étagée

Tableau III-11. Bilan de récupération en isoflavones et matière sèche dans les résidus et les extraits éthanoliques

	IF résiduelles µg/g (µg/g)	Rdt IF résiduelles MeCN (%)	Rdt IF extraites EtOH (%)	Rdt MS residu protéique (%)
Initial	1033			
Extraction 1	278	25,3	68,4	88,6
Extraction 2	101	28,6	96,9	83,4
Extraction 3	34	29,8	98,1	88,5
Global	34	3,5	98,3	66,9

Il faut noter cependant que le bilan d'extraction en isoflavones (résiduel plus extrait) est de 94 % sur le premier étage et il est déséquilibré sur les deux étages suivants avec des bilans de 126 % et 128 % (quantité résiduelle d'isoflavones et quantité extraite ramenées sur quantité introduite). Ceci montrerait qu'une quantité d'isoflavones reste sous-estimées lors de l'analyse de la première matière résiduelle avec mélange acétonitrile conventionnel. Ces isoflavones non analysées sont cependant extraites par l'éthanol par la suite ce qui entraine des écarts si élevées pour les étages 2 et 3. Ce résultat pourrait s'expliquer par le changement de structure de la matrice protéique rendant difficile l'accès des isoflavones au solvant de type acétonitrile (extraction MeCN/Eau/HCl sur la fraction résiduelle).

Au final, sur l'ensemble de l'extraction de 3 étages, le rendement d'extraction éthanolique représente 98,3 % des isoflavones introduites (masse totale d'isoflavones extraites ramenée sur la masse initiale d'isoflavones caractérisées par le solvant de référence Murphy). Le bilan massique de récupération d'isoflavones sur l'ensemble des trois extractions est de 100,8 %.

L'extraction multi-étagée a permis la production d'un isolat appauvri en isoflavones sous le seuil de 50 µg/g (µg/g) sur produit sec. La perte en matière protéique est cependant importante à hauteur de 33 % et la quantité d'éthanol à traiter est conséquente.

Pour répondre à ces deux problématiques, il a donc été envisagé d'augmenter la teneur en éthanol pour éviter les pertes en protéines. De plus, ceci n'implique pas *a priori* de perte en rendement isoflavones au vu des résultats (Figure III-5). Afin de pouvoir permettre l'extraction sur plusieurs étages avec une quantité de solvant réduite, une étape de distillation du solvant entre chaque étage est envisagée. Un système classique de type Soxhlet permet de répondre à cette problématique et reste cohérent avec la teneur en éthanol souhaitée supérieure à 80 %. L'extraction multi-étagée dans un système statique, de type Soxhlet, a permis d'atteindre des teneurs résiduelles équivalentes à celles obtenues en réacteur agité (Tableau III-12).

Tableau III-12. Teneur résiduelle en isoflavones après un traitement par Soxhlet en fonction du nombre de cycles effectués

Durée	Nombre de cycles	Teneur résiduelle (µg/g)	Rdt MS
2 h	6	338	> 99 %
4 h	12	106	> 99 %
8 h	30	20	> 99 %

Après 2 h d'extraction (6 cycles de 20 minutes) la teneur résiduelle est de 338 µg/g alors qu'elle était de 278 µg/g après un étage d'extraction de 2 h en réacteur agité. Après 4 h la teneur résiduelle est la même que celle obtenue après 2 étages d'extraction en batch (de 2 h chacun). En Soxhlet, chaque cycle d'extraction est moins efficace mais la durée totale de traitement, nécessaire pour atteindre un seuil sous les 50 µg/g, est la même.

L'avantage de ce type d'extraction a été la très faible perte en protéines associée à un bon rendement en isoflavones. L'isolat protéique étant une matière relativement coûteuse, pour une application industrielle cette caractéristique a été déterminante pour la suite du projet.

2.6. Mise à l'échelle industrielle

2.6.1. Contraintes et adaptation au système Tournaire à fond filtrant

Après optimisation à petite échelle, une extraction a été conduite sur un extracteur de 200 litres de type Tournaire à fond filtrant sur un nombre important de cycles à partir de 20 kg d'isolat protéique. La stratégie adoptée a été d'utiliser le système à disposition au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (Figure III-9) afin de se rapprocher du système multi-étagé précédent. Afin de pouvoir effectuer plusieurs cycles d'extraction avec une quantité limitée de solvant, une distillation de l'extrait a été effectuée après chaque extraction afin d'en récupérer l'éthanol, ce dernier pouvant être introduit pour l'extraction suivante (de la même façon que le système Soxhlet de laboratoire).

Des essais de passage sur toile de nylon ont été effectués à petite échelle (même toile que le Tournaire à fond filtrant avec un maillage de 50 µm) : le sous-tirage de l'extrait est plus facile avec de l'éthanol à 96 % contrairement à un mélange à 80 % initialement testé en réacteur agité de laboratoire après lequel la séparation solide liquide s'effectuait par centrifugation. Cette teneur en éthanol permet de perdre moins de protéines comme cela a été montré sur les systèmes précédant. Comme décrit à échelle laboratoire une température de 50 °C permet d'atteindre la zone optimale d'extraction. De plus elle permet ici de préchauffer le solvant pour qu'il soit plus rapidement distillé après sous tirage et transfert dans l'unité de distillation.

Ainsi des distillations et extractions ont pu être effectuées simultanément en utilisant une cuve de stockage d'éthanol entre la partie distillation et extraction (Figure III-8).

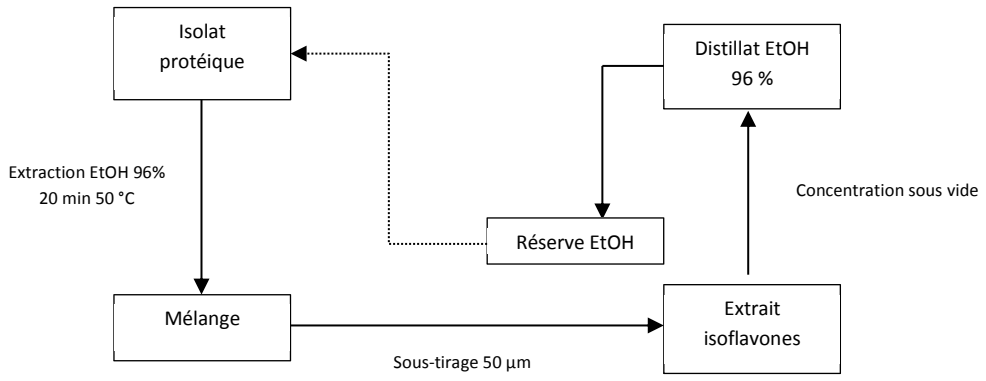


Figure III-8. Schéma simplifié de l'extraction multi-étagée par Tournaire à fond filtrant

Au départ le ratio solide-liquide avait été fixé à 1/10, donc 200 L ont été utilisés pour la première extraction de 20 min. Dans un deuxième temps, l'extrait a été soutiré puis transféré dans la cuve de distillation. Cette étape a montré la possibilité de distiller l'extrait rapidement, pour une durée équivalente à la durée d'extraction. Il a donc été possible de distiller environ 50 à 60 L. Cette quantité d'éthanol a été choisie par la suite pour les extractions suivantes (2 à 14) ce qui a permis que les durées d'extraction et de distillation de l'extrait soient proches permettant de fonctionner en simultanément. Ainsi pour les extractions suivantes un ratio de 1/3 a été utilisé.

La plateforme utilisée pour cette mise à l'échelle est présentée Figure III-9. La cuve d'extraction de 240 L est située sur la partie gauche et la cuve de distillation sur la partie droite, les parties hautes correspondent essentiellement au système réfrigérant.



Figure III-9. Plateforme de l'extracteur Tournaire à fond filtrant et de l'unité de distillation associée

Après 14 cycles d'extraction de 20 min, la matière récupérée présentait un aspect compact et blanchi, l'isolat protéique étant jaunâtre au départ. Le bilan de récupération en isolat appauvri en isoflavones est très haut avec un rendement de récupération de matière sèche de 94 %.



Figure III-10. Isolat protéique appauvri en isoflavones récupéré en fin d'extraction éthanolique multi-étagée

Au total près de 98 % des isoflavones ont été éliminées. La teneur résiduelle en isoflavones par dosage HPLC-UV en triplicata et après homogénéisation de la matière est de 37 ± 3 µg/g de produit sec.

Les extraits récupérés étaient jaunâtres (couleur caractéristique des isoflavones) avant évaporation puis rouge après concentration durant la distillation (couleur de certaines poudres commercialisées) avec une phase plus dense de couleur verte (Figure III-11).



Figure III-11. Exemple d'extrait éthanolique issu de l'extraction après concentration par distillation

La pureté en isoflavones dans l'extrait éthanolique varie de 1 à 4 % sur matière sèche totale en fonction de l'étage d'extraction. La valorisation de cet extrait ne fait pas partie des objectifs de ces travaux de recherche. Cependant il est supposé contenir les isoflavones mais aussi d'autres composés tels que les saponines de soja qui sont souvent co-extraites et sont toutes deux solubles dans l'éthanol (Murphy 2008). Ces deux types de composés devraient donc faire l'objet d'une étude de valorisation si le choix de la méthode industrielle s'oriente vers l'utilisation d'une extraction éthanolique.

2.6.2. Suivi de l'extraction par dosage de l'extrait

Après chaque distillation, les extraits concentrés sont récupérés puis dosés par HPLC-UV. Le suivi de la quantité d'isoflavones montre qu'après 3 extractions la quantité extraite dépasse la quantité initiale déterminée par une étape d'extraction conventionnelle par solvant de type acétonitrile (Figure III-12).

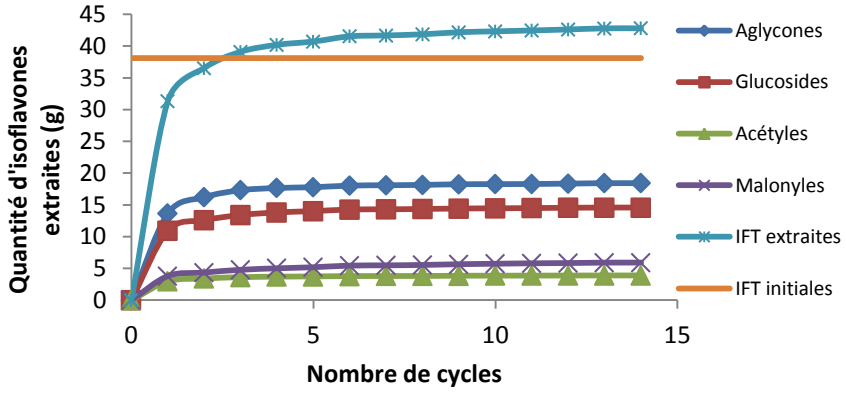


Figure III-12. Quantité cumulée d'isoflavones extraites après chaque étage d'extraction sur Tournaire à fond filtrant. IFT pour isoflavones totales

Le premier étage d'extraction entraine un rendement de 81,6 % (ramené sur méthode de référence) et représente 73 % des isoflavones totales extraites par l'éthanol au bout des 14 cycles. Ce résultat montrerait qu'il est possible d'extraire une quantité d'isoflavones plus importante que celle déterminée par l'extraction de référence, près de 12 % en plus. Des études ont déjà montré que les extractions conventionnelles réalisées en une seule étape peuvent sous-estimer la teneur en isoflavones (Achouri, Boye *et al.* 2005). Après 5 étages d'extraction ces derniers montraient que le rendement en isoflavones augmentait de 147 %, 103 % et 107 % par rapport à une seule étape d'extraction, extractions menées avec acétonitrile, éthanol et méthanol, respectivement à partir d'isolat protéique de soja. Une autre, plus récentes montre que les ratios solide-liquide couramment utilisés tels que 2/19 (2 g dans 19 mL de solvant) sous-estiment la teneur en isoflavones de 20 à 50 % à partir d'isolats protéiques de soja préparés ou commerciaux (Malaypally, Ismail 2010).

2.6.3. Teneur résiduelle en isoflavones

Le suivi de la teneur en isoflavones dans le gateau protéique est difficile du fait des vapeurs d'éthanol et de l'accessibilité de la matière. De plus, la compaction de la matière qui a lieu avec l'utilisation de cette teneur en éthanol limite les possibilités de prélèvements seulement à la partie superficielle de la matière. Le suivi de la teneur n'a pas pu être effectué après chaque extraction. La teneur résiduelle en isoflavones dosée à partir de trois prélèvements est présentée Figure III-13. Afin d'atteindre une teneur résiduelle inférieur à 50 µg/g, il est nécessaire d'effectuer 11 cycles d'extraction. Au total 98% des isoflavones ont été extraites.

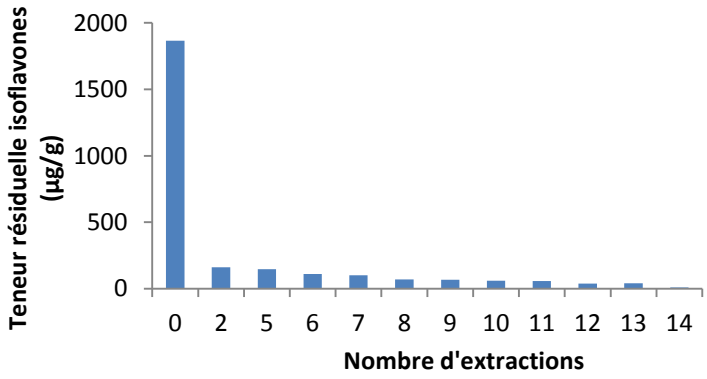


Figure III-13. Teneurs résiduelles en isoflavones totales en fonction du nombre d'étage d'extraction

Le produit final après homogénéisation et séchage (méthode décrite Chapitre II.3.3) est dosé à 37 µg/g après 14 cycles, alors qu'il est à 9 µg/g par prélèvement en haut du gateau protéique indiquant que l'extraction n'était pas homogène (impossibilité d'appliquer une agitation du fait de la fragilité de la toile de filtration vis-à-vis du produit relativement compact). On retrouve dans le produit final les formes malonyles, alors qu'elles n'étaient pas majoritaires au départ. Ces formes malonyles et glucosides, plus polaires, sont probablement plus difficiles à extraire par rapport aux autres composés, dans ces conditions et avec de l'éthanol à 96 % (Figure III-14). Elles pourraient aussi avoir plus d'affinité vis-à-vis de la matrice protéique.

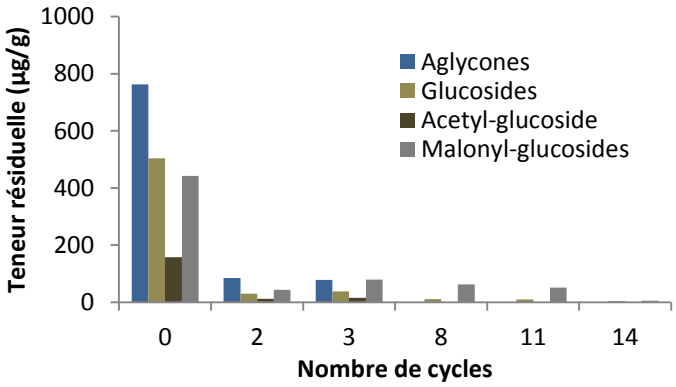


Figure III-14. Suivi de la teneur résiduelle des différentes formes d'isoflavones dans l'isolat protéique en fonction du nombre d'étage d'extraction sur la partie superficielle de la matière

En considérant les analyses sur extraits éthanoliques seulement, les taux d'extraction des formes d'isoflavones ne sont pas les mêmes. Le rendement des formes malonyles est de 65 % alors qu'il est de 74 à 76 % pour les autres formes concernant le premier étage d'extraction. Ceci confirme la plus faible extractabilité de formes malonyles dans ce type de solvant.

2.7. Synthèse

De l'échelle laboratoire à échelle industrielle il a été possible de produire un isolat protéique de soja appauvri en isoflavones avec une teneur inférieur au seuil idéal fixé à 50 ppm (µg/g) en équivalent aglycones par une extraction multi-étagée à l'éthanol. Le plan d'expériences sur une échelle de 20 g a permis de modéliser et d'étudier l'extraction des isoflavones mais aussi la solubilisation de la matière protéique. Ces données complétées par des extractions multi-étagées réalisées en réacteur agité et en Soxhlet ont permis de montrer qu'une forte teneur en éthanol est nécessaire afin de ne pas perdre trop de protéines tout en maintenant une efficacité d'extraction suffisante pour atteindre l'objectif d'extraire plus de 98 % des isoflavones. Sur la mise à l'échelle de 20 kg, 94 % de la matière a ainsi pu être récupérée. L'utilisation d'un extracteur Tournaire à fond filtrant associé à une unité de distillation a permis de réaliser l'extraction et la distillation de l'extraction en parallèle. Quatorze cycles ont été effectués représentant une durée totale de 4 h 40 d'extrait. Cette durée pourrait être optimisée par l'utilisation d'une agitation durant l'extraction et par des soutirages plus important jusqu'à retrait complet du solvant, ce qui n'a pas pu être réalisés à ce stade pour éviter la solubilisation de protéines et leur entrainement respectivement. Un système agité pourrait permettre d'homogénéiser la matière puisqu'il a été montré que la répartition des isoflavones résiduelles est hétérogène (meilleure extraction sur les parties superficielles).

3. Etude de l'extraction des isoflavones par eau pressurisée sur système ASE

3.1. Objectifs et démarche expérimentale

Peu de travaux ont montré l'étude des isoflavones de soja par eau pressurisée. Cependant, deux d'entre eux ont démontré l'efficacité de cette méthode sur système ASE (Accelerate Solvent Extraction) pour l'extraction des isoflavones à partir de fèves de soja lyophilisées et par un mélange hydroalcoolique de 70 % d'éthanol (Rostagno, Palma *et al.* 2004) ou par ce même solvant mais avec 5 % de DMSO en supplément à (Luthria, Biswas *et al.* 2007). Bien qu'elle n'était pas optimisée et avait comme seul objectif d'analyser le contenu en isoflavones, l'extraction en eau pressurisée dans ces études a permis d'atteindre seulement 23,6 % et 18,2 % de rendement d'extraction. L'objectif de ce travail est d'étudier par une approche d'optimisation le potentiel de l'eau présurisée sur l'extraction des isoflavones à partir de matières plus ou moins riches en protéines de soja. L'objectif est de comprendre l'influence du temps d'extraction, du ratio solide-liquid et de la température sur l'extraction des isoflavones à échelle laboratoire et sur un système normalement dédié à la préparation d'échantillons analytiques (ASE). Ceci a été conduit sur un isolat protéique (isolat D3) et sur une farine de soja (farine E1) avant d'envisager une adaptation sur une échelle plus importante.

Un plan d'expériences de Doehlert à trois facteurs a été utilisé. Les différentes étapes d'extraction et de post-traitement sont décrites Chapitre II.4.

3.2. Planification expérimentale

Comme cela a été décrit précédemment pour l'extraction éthanolique, un plan d'expériences, à trois paramètres cette fois, a été conduit. L'équation quadratique suivante est utilisée en tant que modèle :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 + a_{11}{X_1}^2 + a_{22}{X_2}^2 + a_{33}{X_3}^2$$

où Y est le rendement d'extraction par eau présurisée des isoflavones, X_i sont les variables associées aux trois paramètres et a_i, a_{ik} et a_{ii} sont les coefficients linéaires, d'interactions, et quadratiques. La gamme de température choisie (X_1) est comprise entre 40 et 200 °C (afin de couvrir les conditions à la fois classiques et subcritiques de l'eau), la durée statique dans la cellule d'extraction (X_2) varie de 2 à 14 min et la quantité de matière traitée est comprise entre 0,35 g et 1,65 g ce qui correspond à un ratio solide-liquide (X_3) de 1 % à 7 % environ d'après la quantité de solvant passée au travers de la cellule proche de 25 mL (7% étant le ratio maximal possible pour éviter les colmatages d'après les premières expériences).

A partir des points déterminés par le plan d'expériences, 15 extractions ont été réalisées sur chaque matière première suivies de dosages HPLC-UV. Les rendements en isoflavones totales mesurés et prédits et les niveaux des variables associées sont présentés au Tableau III-13.

Tableau III-13. Valeurs prédites et mesurées des rendements d'extraction en isoflavones pour les différents niveaux de variables du plan d'expériences de Doehlert à partir d'isolat protéique et de farine de soja

Variables			Variables codées			Farine		Isolat	
T (°C)	Durée statique (min)	Ratio S/L (%)	X_1	X_2	X_3	Rdt mesuré (%)	Rdt prédit (%)	Rdt mesuré (%)	Rdt prédit (%)
120	8	4	0	0	0	54,9	53,2	35,2	30,6
200	8	4	1	0	0	22,1	27,9	18,6	21,3
160	14,0	4	0,5	0,866	0	55,7	53,3	40,1	34,3
80	14,0	4	-0,5	0,866	0	52,4	59,5	29,7	30,9
40	8,0	4	-1	0	0	48,3	42,5	22,2	19,5
80	2,0	4	-0,5	-0,866	0	52,5	54,9	28,8	34,6
160	2,0	4	0,5	-0,866	0	53,5	46,4	34,1	32,9
160	10,0	7	0,5	0,289	0,816	30,3	27,0	11,9	14,9
80	10,0	7	-0,5	0,289	0,816	42,2	40,9	11,7	13,3
120	4,0	7	0	-0,577	0,816	32,7	37,4	11,2	6,6
160	6,0	1	0,5	-0,289	-0,816	71,3	72,6	49,8	48,1
80	6,0	1	-0,5	-0,289	-0,816	70,0	73,3	50,8	47,9
120	12,0	1	0	0,577	-0,816	86,7	82,1	34,8	39,4
120	8,0	4	0	0	0	54,1	53,2	29,3	30,6
120	8,0	4	0	0	0	50,4	53,2	27,4	30,6

Les rendements d'extraction mesurés sont compris entre 22,1 % et 86,7 % à partir de la farine et de 11,2 % to 50,8 % à partir d'isolat protéique. Les valeurs prédites et mesurées sont corrélées avec des coefficients de 93 et de 92 % et le modèle est validé statistiquement par le test de Fisher avec un seuil de confiance de 5 %. Le test de Student montre la significativité des coefficients avec un seuil de confiance de 5 % (Tableau III-14). Seul le ratio solide-liquide a une influence sur l'extraction des isoflavones.

Tableau III-14. Coefficients des modèles quadratiques du plan d'expérience et significativité

	Coefficients	Valeurs	
		Farine	isolat
	a0	53,15	30,61
Température	a1	-7,33	0,93
Durée	a2	3,31	-0,66
Ratio S/L	a3	-25,06*	-20,53*
Intéractions	a12	1,33	2,94
	a13	-8,59	-0,21
	a23	-0,26	17,42
Coefficients quadratiques	a11	-17,96*	-10,22
	a22	6,49	6,82
	a33	6,46	-2,54
	R square	0,93	0,92

**p value < 5 %*

3.3. Surface de réponse des modèles

Les surfaces de réponse associées au modèle sont présentées Figure III-15 où il est établi que le ratio solide-liquide est le facteur limitant l'extraction des isoflavones bien qu'il soit très petit (1 % à 7 %). Une légère influence de la température est constatée du fait du coefficient quadratique significatif associé à la température (le signe négatif de ce coefficient engendre une courbure parabolique de la réponse). Les rendements d'extraction optimum des isoflavones sont de 63,7 % à partir de l'isolat protéique et de 85,8 % à partir de la farine. Ces optimums sont confirmés par des extractions effectuées sur conditions optimales : 120 °C, 14 min, 0,35 g à partir de la farine puis 114 °C, 2 min et 0,35 g à partir de l'isolat.

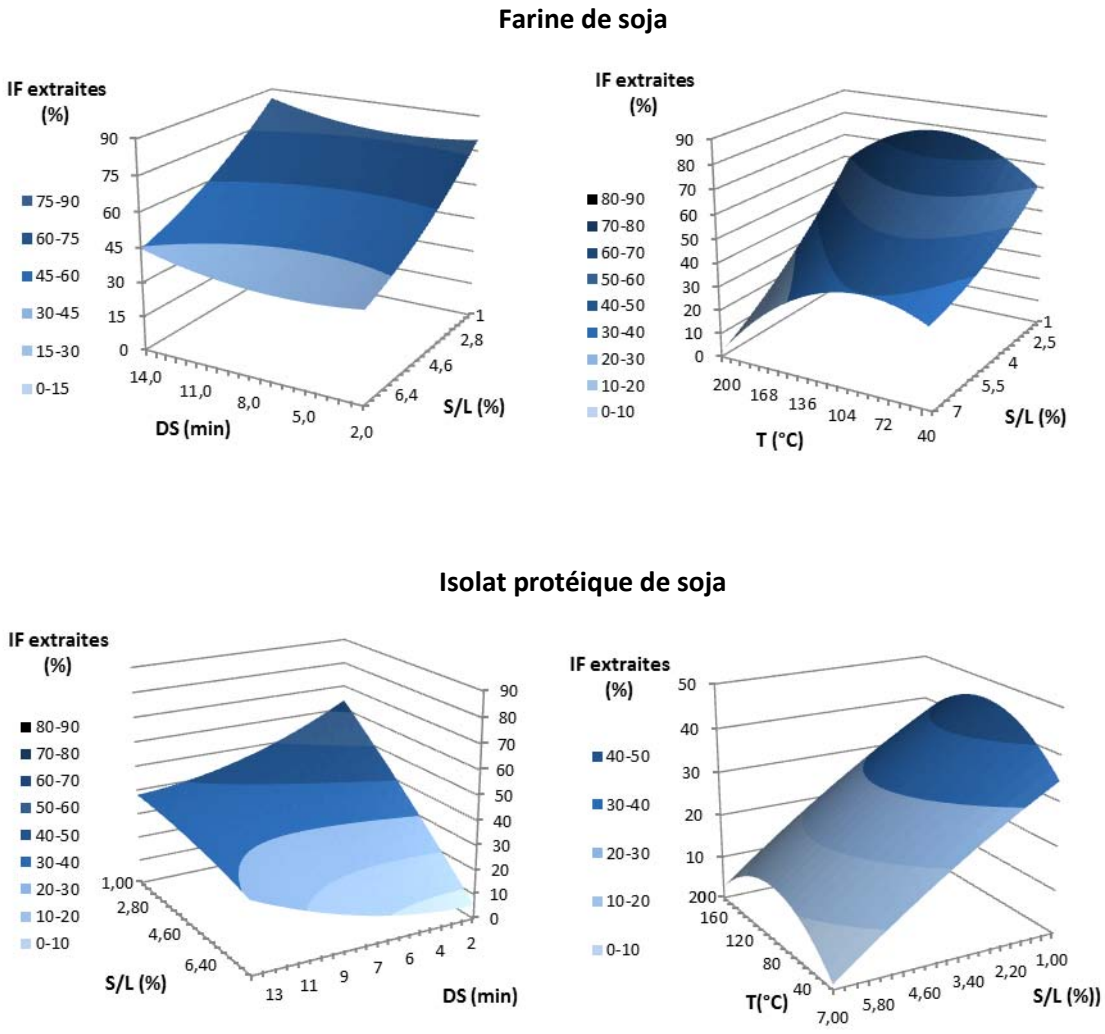


Figure III-15. Surfaces de réponse du modèle d'extraction représentant l'influence du ratio solide-liquide, de la température et de la durée statique sur les rendements d'extraction des isoflavones à partir de farine de soja en haut et à partir d'isolat en bas.

Trois extractions ont été effectuées sur les conditions optimales, les rendements sont conformes à ce qui était prédit par le modèle, pour les deux matières étudiées (Tableau III-15).

Tableau III-15. Vérification des rendements obtenus sur conditions optimales

Paramètres	Farine	Isolat
Ratio S/L (%)	1	1
Température (min)	122	114
Durée (min)	14	2
Rendement prédit	85.8%	63.7%
Rendement mesuré	85.1 ± 4.5%	61.0 ± 0.7%

** Ecart-type basé sur 3 extractions réalisées en ASE*

Les rendements d'extraction sont plus hauts que ceux décrits dans la littérature pour le même système ASE et avec l'eau pressurisée. Ces derniers donnaient 23,6 % et 18,2 % de rendement d'extraction en isoflavones, à partir de graines de soja broyées et non délipidées (Rostagno, Palma *et al.* 2004; Luthria, Biswas *et al.* 2007; Jung, Murphy *et al.* 2008). Cependant les deux premières études ont été orientées dans un objectif analytique ce qui a poussé les auteurs à choisir des températures basses (60 °C) pour éviter les modifications de profils en isoflavones afin de maintenir la distribution initiale. De plus l'optimisation a été conduite sur d'autres types de solvants. Pour cette température de 60 °C, les conditions subcritiques de l'eau ne peuvent être atteintes, ce qui pourrait aussi expliquer cette différence d'efficacité. L'autre particularité ajoutée à l'étude présentée dans ce manuscrit est l'étape de separation solide-liquide qui fait intervenir une acidification par HCl jusqu'au point isoélectrique des protéines (pH 4,5) suivie d'une centrifugation, la filtration de l'extrait étant très difficile sans cette étape. Comme cela a pu être démontré dans d'autres études, le ratio solide-liquid est le facteur le plus limitant et il doit être très faible pour ne pas diminuer l'efficacité d'extraction, des ratios solide-liquide proches de 1 à 2 % sont utilisés (Rostagno, Palma *et al.* 2004), alors que le ratio optimal démontré ici est de 1 %.

3.4. Influence sur la matrice protéique et impact sur l'extraction des isoflavones

L'agrégation des protéines, puis leur désagrégation par hydrolyse, ont lieu dans les systèmes pressurisés (Pourali, Asghari *et al.* 2009; Sunphorka, Chavasiri *et al.* 2012) ou dans d'autres systèmes à fortes contraintes thermo-mécaniques comme l'extrusion bi-vis (Jung, Mahfuz *et al.* 2009). Cette agrégation peut entrainer l'insolubilité de certaines protéines. La teneur en protéines dans la cellule d'extraction ASE joue donc probablement un rôle déterminant dans l'extraction des autres composés tels que les isoflavones de soja. Pendant l'extraction des isoflavones en mode pressurisé, ce phénomène pourrait expliquer pourquoi le ratio solide/liquide soit si prépondérant dans le résultat final comme cela est montré par le plan d'expériences précédant. De plus, lorsque des essais ont été menés sans addition d'agent de dispersion (sable), l'agrégation de la matrice obstrue le système ce qui rend l'extraction impossible. La dispersion des protéines est indispensable dans ce système. En partant d'isolat protéique de soja, une agrégation plus intense pourrait expliquer un rendement d'extraction d'isoflavones optimal beaucoup plus faible que celui observé à partir de farine de soja.

Pour le plus haut ratio solide-liquide (ratio de 7 % correspondant à 1,65 g de matière introduite dans la cellule), la durée statique d'extraction montre un effet positif sur l'extraction des isoflavones alors que ce n'est pas le cas pour le ratio le plus faible (ratio de 1 % correspondant à 0,35 g introduit dans la cellule) et plus particulièrement à partir de la matière la plus riche en protéine (Figure III-15). La cinétique d'hydrolyse des protéines devient probablement un facteur limitant pour les quantités plus

importantes traitées ce qui a été montré sur protéines de son de riz extraites par eau subcritique (Sunphorka, Chavasiri *et al.* 2012). Pour suivre la solubilisation de la matière, la valeur de la matière sèche totale récupérée dans le surnageant après précipitation et centrifugation de l'extrait a été testée comme réponse du modèle quadratique précédemment présenté. Pour ce type de réponse (solubilisation de la matière), la température est un paramètre significatif, d'après le test de Student avec un seuil de confiance de 5 % (Tableau III-16).

Tableau III-16. Coefficients des modèles quadratiques du plan d'expériences et significativité pour le rendement en matière sèche récupérée dans le surnageant

	Coefficients	Valeurs
	a0	22,34
Température	**a1**	**20,41***
Durée	a2	4,72
Ratio S/L	a3	-5,04
Intéractions	a12	3,45
	a13	21,05
	a23	13,94
Coefficients quadratiques	**a11**	**17,55***
	a22	2,59
	a33	4,24
	R square	92,6 %

**en bleu p value < 5 %*

Malgré la précipitation des protéines à pH 4,5 une quantité importante des protéines reste soluble montrant que le traitement pressurisée, malgré qu'il soit très court (2 à 14 min) induit une forte hydrolyse de la matrice protéique. Les surfaces de réponse du modèle sont présentées Figure III-16. Pour les petits ratios solide-liquide la température et la durée statique ont peu d'effet sur la solubilisation de la matière protéique. Lorsqu'une plus grande quantité de matière est introduite dans la cellule d'extraction, comme c'est le cas avec le ratio 7 %, ces paramètres ont plus d'impact sur la solubilisation, donc sur l'hydrolyse des protéines. Il semble donc que plus la concentration en protéines est importante dans la cellule (mélange avec le sable) plus l'hydrolyse est importante ce qui a déjà été montré sur d'autres matières protéiques (Sunphorka, Chavasiri *et al.* 2012).

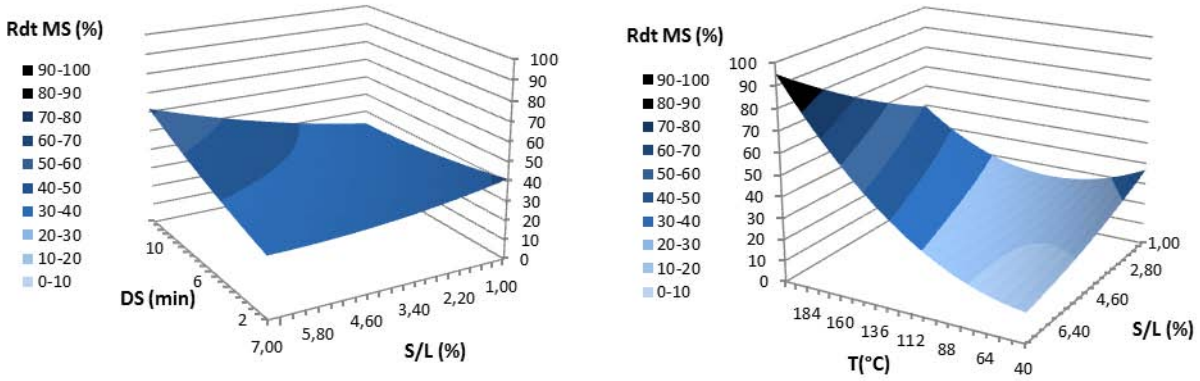


Figure III-16. Surface de réponse du modèle d'extraction représentant l'influence du ratio solide-liquide, de la température et de la durée statique d'extraction

Le rendement en isoflavones ne semble pas suivre l'hydrolyse des protéines à partir de l'isolat protéiques (Figure III-17) surtout à 200 °C où le rendement en isoflavones chute dans ces conditions (14 min et ratio solide-liquide de 4 %). Des expériences supplémentaires devraient être effectuées afin de comprendre l'impact de cette hydrolyse sur le rendement en isoflavones.

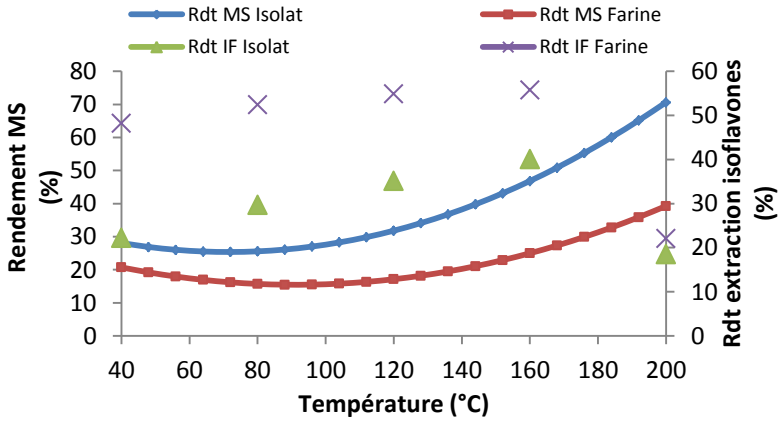


Figure III-17. Influence de la température sur solubilité de la matière première et rendement en isoflavones associés pour un ratio solide/liquide de 4 % et une durée de 14 min

3.5. Dégradation des isoflavones conjuguées

En dépit du fait que l'influence de la température ne soit pas significative sur l'extraction des isoflavones, d'importantes modifications structurales ont été observées. L'impact de la température sur le profil en isoflavones est difficile à interpréter car le changement de température peut modifier le taux d'extraction des isoflavones totales et modifier leur structure simultanément. Cependant, les résultats montrent que les formes malonyl-glucosides perdent leur groupement spécifique et sont transformées en β-glucosides de 40 °C jusqu'à 160 °C (Figure III-18). Au-delà de 160 °C les formes glucosides sont dégradées mais les formes aglycones correspondantes ne sont pas extraites.

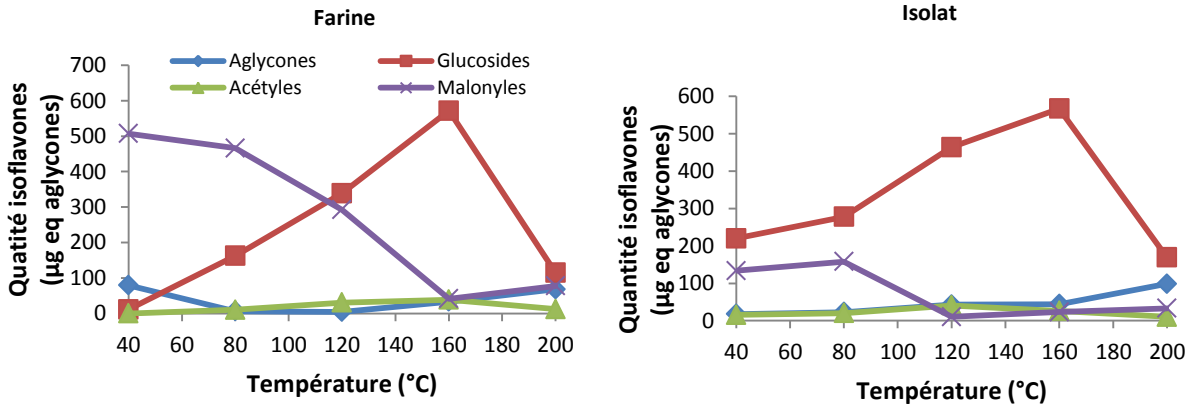


Figure III-18. Influence de la température sur la structure des isoflavones

Dans la farine les quantités initiales en isoflavones étaient de 7 ; 281 ; 18 et 915 µg d'aglycones, glucosides, acétyles and malonyles et de 359 ; 655 ; 147 et 560 µg à partir de l'isolat protéique pour une quantité de matière de 0,35 g introduite dans la cellule. A partir de la farine, à 80 °C les différentes formes sont extraites avec des rendements de 51 à 59 % pour les formes conjuguées, la teneur en aglycones étant très faible au départ leur rendement d'extraction ne peut pas être considéré. A partir de l'isolat protéique et pour la même température (80 °C), les rendements sont plus faibles, 24 % seulement pour les formes malonyles alors qu'il y en a moins dans cette matière (leur taux d'extraction devrait donc être égal ou plus haut dans ce cas). A partir de l'isolat, les formes aglycones sont aussi très peu extraites alors qu'elles représentent plus de 20 % des isoflavones au départ.

Cette différence d'extraction des formes aglycones pourrait expliquer pourquoi l'extraction totale des isoflavones à partir d'isolat protéique est largement moins efficace envers celle de la farine avec 61 % contre 85 % (sur les points optimums). En effet, l'isolat contient près de 20 % d'aglycones contrairement à la farine qui en contient moins de 1 %.

A fortes températures, si les formes glucosides se transforment en formes aglycones comme cela a déjà été montré à 200 °C en ASE (Rostagno, Palma *et al.* 2004) elles seraient moins extraites. Ceci expliquerait aussi pourquoi le rendement global en isoflavones est faible à 200 °C pour les deux matières car les formes glucosides formées entre 80 °C et 160 °C sont dégradées au-delà de 160 °C probablement sous formes aglycones qui ne sont pas extraites avec la même efficacité. Ces formes aglycones sont beaucoup moins polaires que les formes conjuguées ce qui pourrait entrainer une solubilisation plus faible dans l'eau.

L'instabilité des formes malonyles et des formes glucosides dans les systèmes pressurisés a été montré en ASE (Rostagno, Palma, & Barroso, 2004) et dans un système à plus grande échelle de type SFP (Stansted Fluid Power) à partir de jus de soja (Jung, Murphy *et al.* 2008). Les premiers ont montré la dégradation des formes glucosides vers les formes aglycones pour des fortes températures de l'ordre de 200 °C. Le suivi de ces formes, contrairement à notre étude, a été possible car l'extraction n'avait pas lieu avec de l'eau mais avec des solvants organiques permettant d'extraire les isoflavones aglycones.

L'efficacité de l'eau préssurisée pour l'extraction des isoflavones serait donc réellement efficace seulement à partir d'une matière contenant peu de forme aglycones et pour des températures d'utilisation qui évitent leur formation.

3.6. Synthèse

L'optimisation par la méthode du plan d'expériences de Doehlert de l'extraction des isoflavones par eau pressurisée a été réalisée à partir d'isolat protéique et de farine de soja avec des rendements optimums relativement hauts de 63,7 % et 85,8 % respectivement. Le facteur principal intervenant dans l'efficacité d'extraction est le ratio solide-liquide utilisé. Ceci peut être expliqué par plusieurs phénomènes dissociés.

Le premier est le comportement de la matière protéique qui semble jouer un rôle majeur dans cette extraction. L'agrégation de la matière protéique est connue dans ces systèmes pressurisés et sa dispersion au travers d'un agent neutre tel que le sable est nécessaire. Cette agrégation est cependant

suivie d'une hydrolyse importante de la matière qui engendre une probable désagrégation observée par le biais de la solubilisation très marquée de l'isolat protéique.

L'étude des profils d'isoflavones en fonction de la température révèle que les formes malonyles sont transformées en formes glucosides entre 80 °C et 160 °C et ce pour les deux matières étudiées. Au-delà de ces températures, les formes glucosides sont dégradées et le rendement d'extraction global des isoflavones chute. Les glucosides seraient transformés en aglycones. Il est montré que ces formes sont très peu extraites à partir de l'isolat protéique qui en contient environ 20 %. Ceci expliquerait la différence de rendement optimal entre la farine et l'isolat protéique.

L'extraction des formes malonyles, pour des températures basses qui évitent leurs dégradations, montre qu'elles sont retenues lors de l'utilisation d'isolat protéique. Cet aspect pourrait lui aussi expliquer les plus faibles rendements en isoflavones obtenus à partir d'isolat.

Ces résultats montrent d'une part que l'extraction des isoflavones serait limitée aux formes conjuguées plus polaires (glucosides, acétyles, malonyles) et d'autre part que la teneur en protéine influence l'extraction des formes malonyles. L'utilisation de l'eau pressurisée n'est pas envisagée à ce stade pour cette application et dans nos conditions de travail. En effet, le taux d'extraction doit être beaucoup plus élevé pour atteindre le seuil en isoflavones résiduelles fixé à 50 ppm (µg/g). Aussi, le comportement de la matière impose l'utilisation d'un agent de dispersion qui rend difficile la récupération de l'isolat appauvri en isoflavones. L'utilisation d'un système autoclave suivi d'une séparation solide-liquide pourrait cependant répondre à cette dernière problématique. L'impact d'un tel système devrait être plus amplement étudié à la fois pour l'extraction des isoflavones et pour l'hydrolyse des protéines.

4. Essai d'extraction sur CO_2 supercritique

4.1. Objectifs et démarche expérimentale

L'extraction au CO_2 supercritique est habituellement utilisée pour extraire des composés apolaires. Néanmoins, le CO_2 supercritique été étudié pour l'extraction de certains polyphénols dont les isoflavones, comme il est possible de le voir dans la partie bibliographique de ce manuscrit (Chapitre I.4.1.2.2).

L'extraction de la génistéine et de la daidzéine atteint plus de 90 % avec l'utilisation d'éthanol en tant que cosolvant à hauteur de 7,5 % (m/m) à 100 bars et 55 °C (Pyo, Yoo *et al.* 2009). D'autres auteurs atteignent de bons rendements sur aglycones avec aussi l'utilisation de cosolvants (éthanol, méthanol et acétonitrile) et parviennent à extraire 14 % de daidzéine et 37 % de génistéine mais avec l'utilisation d'acétonitrile à hauteur de 10 %. Ils montrent aussi que l'augmentation de la pression engendre une meilleure extractabilité des aglycones, qui est supposée être facilitée par densification du solvant et une désorption plus rapide des isoflavones retenues par la matrice végétale (Araújo, Silva *et al.* 2007), l'extraction sur isolat protéique n'étant pas mentionnée dans la littérature à notre connaissance.

L'ajout d'un cosolvant, ou modificateur, permet d'aider leur solubilisation et leur extraction. Afin de tester l'extraction d'isoflavones de soja, l'éthanol a été choisi en tant que modificateur car sa compatibilité avec l'application visée. Les unités d'extraction à échelle semi-industrielle utilisant le CO_2-SC sont rares. Une unité pilote située à l'Atelier des fluides supercritiques (Nyons, France) a permis d'effectuer des extractions sur 1 kg de matière protéique ou de farine (Figure III-19).

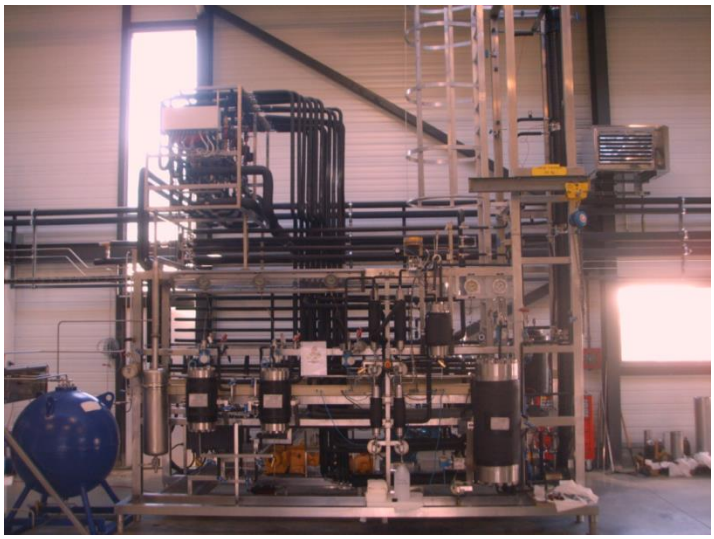


Figure III-19. Photo du pilote utilisé à l'Atelier des fluides supercritiques de Nyons

La disponibilité du pilote ayant été limitée, une condition standard dite « douce » basée sur les travaux de (Pyo, Yoo *et al.* 2009) a été appliquée sur les trois matières : EtOH 7,5 % à 100 bars et 55 °C et une condition « poussée » a aussi été appliquée sur ces matières avec EtOH 15 % à 240 bars et 55 °C (pression limite du pilote et teneur en éthanol élevée comparée à la littérature mais qui reste en dessous

des teneurs utilisées pour l'extraction en batch par éthanol). La matière a été introduite dans une cellule en acier inoxydable de 15 L (Figure III-20).



Figure III-20. Cellule d'extraction utilisée pour l'extraction en CO_2-SC

4.2. Rendement d'extraction selon le type d'isoflavones

Sur les conditions poussées, il a été possible d'atteindre 45,6 % des isoflavones contenues dans la farine de départ (Tableau III-17). Pour l'isolat protéique le rendement global d'extraction est plus faible (24,9 %), alors que la teneur initiale en isoflavones est plus basse (1606 µg/g contre 2145 µg/g) (Tableau III-18). L'influence des conditions plus « poussées » est très marquée, elles permettent d'améliorer les rendements quel que soit le type de structure. Cependant, il y a beaucoup moins d'effet lorsque l'extraction est menée sur isolat protéique.

Tableau I II-17. Ta ux d 'extraction d es isoflavones par C O_2-SC s ur les trois typ es de matières avec deux conditions

	EtOH (%)	Pression (bars)	Rdt Aglycones (%)	Rdt Glucosides (%)	Rdt Acetyles (%)	Rdt Malonyles (%)	Rdt Total (%)
Farine H1	7,5	100	37,8	3,8	11	2,5	5,2
	15	240	66,7	29,7	51,5	50	45,6
Concentré A1	7,5	100	nd	7,0	0	18,4	12,8
	15	240	nd	32,4	0	37,1	33,2
Isolat D3	7,5	100	25,6	6,5	3,6	1,3	10,1
	15	240	65,3	8,3	20,2	8,1	24,9

Tableau III-18. Teneur en isoflavones dans les trois matières premières testées pour l'extraction par CO_2-SC

	Aglycones (µg/g)	Glucosides (µg/g)	Acétyles (µg/g)	Malonyles (µg/g)	Total (µg/g)
Farine H1	125	601	104	1315	2145
Concentré A1	0	58	11	49	118
Isolat D3	344	620	156	486	1606

Les rendements en isoflavones aglycones sont plus hauts, sur les conditions dites « poussées » leur taux d'extraction est d'environ 65 % et 67 % pour des teneurs initiales très différentes. Ce rendement n'est donc pas lié à la teneur initiale car la saturation du solvant n'est pas atteinte. La différence d'extraction des formes conjuguées entre l'isolat et la farine est importante. Alors que les deux matières ont des teneurs similaires en formes glucosides, leurs rendements d'extraction sont très différent avec 30 % à partir de la farine et seulement 8 % à partir de l'isolat. Le même phénomène est observé pour les formes acétyles. Le rendement des formes malonyles est de 50 % à partir de la farine contre 8 % à partir de l'isolat alors que la teneur en malonyles y est trois moins forte.

4.3. Synthèse

Cette étude montre que le CO_2-SC peut être intéressant sur l'extraction de polyphénols comme ceux présents dans le soja mais son efficacité est très dépendante des groupements polaires et chargés liés à la structure polyphénolique. Le comportement de la matière en CO_2-SC comme en eau pressurisée semble être un facteur crucial sur l'extraction des isoflavones. A l'inverse, ce sont les formes les moins polaires qui sont les mieux extraites en CO_2-SC. La solubilité différentielle (log P ou log D pour des pH différents de 7,4) permet de définir l'hydrophobicité d'un composé, elle est calculée par le logarithme de rapport des concentrations du composé étudié après partage dans l'octanol et dans l'eau. Pour les isoflavones étudiées dans ces travaux, cette caractéristique est présentée Tableau III-19. Plus la valeur est petite plus le composé est hydrophile (polaire). Pour rappel les structures des isoflavones sont présentées Chapitre I.3.1.2.

Tableau III-19. Solubilité différentielle des isoflavones de soja indicatrice de la polarité des constituants (Jankowiak, Méndez Sevillano et al. 2015)

		log P pH 7,4	log D pH 4,5
Aglycones	Génistéine	3,08	3,08
	Daidzéine	2,73	2,73
	Glycitéine	2,57	2,57
Glucosides	Génistine	0,81	0,81
	Daidzine	0,46	0,46
	Glycitine	0,30	0,30
Acétyles	Acétyl-génistine	-	
	Acétyl-daidzine	-	
	Acétyl-glycitine	-	
Malonyles	Malonyl-génistine	1,14	-0,02
	Malonyl -daidzine	0,80	-0,31
	Malonyl -glycitine	-	-0,56

Il semblerait que les formes conjuguées d'isoflavones aient une intéraction différente avec l'isolat protéique comparé à la farine. L'explication la plus probable est que les formes conjuguées d'isoflavones interagissent avec à la matrice protéique contrairement aux formes aglycones. Les formes malonyles avaient aussi montré lors de l'étude de l'extraction par eau pressurisée que leur rendement d'extraction était beaucoup plus faible à partir de l'isolat protéique (Section 3.2.3).

Le traitement d'isolat protéique par CO_2-SC dans le but d'éliminer les isoflavones n'est pas envisageable pour une industrialisation compte tenu du faible niveau d'extraction sur des conditions dites poussées (dans les limites du pilote à disposition). La teneur en éthanol et la pression utilisée pourraient être des facteurs très influents, les conditions poussées ne semblent pas suffirent à obtenir de très forts taux d'extraction nécessaires à l'élimination des isoflavones.

5. Conclusion de chapitre

5.1. Influence du profil en isoflavones et notion de polarité

Après le développement d'une méthode rapide de préparation d'échantillons pour analyse HPLC-UV, plusieurs matières premières de soja ont pu être analysées. La teneur en isoflavones ainsi que leur profil varient d'un produit à l'autre et même d'un lot à l'autre. Le profil en isoflavones a eu un impact important sur l'extraction des isoflavones de soja. Lors de l'étude des extractions par solvant, présentée dans ce chapitre, il a été crucial de suivre les différentes isoflavones. Du fait de leurs polarités relativement différentes, leur taux d'extraction peut être variable. Leur thermolabilité et leur instabilité a aussi été un facteur prépondérant, à la fois pour l'analyse (dégradation des formes conjuguées dans un échantillon analytique non présenté ici) et lors de l'étude en conditions subcritiques faisant intervenir des températures élevées (transformation des malonyles en glucosides et aglycones). L'extraction par CO_2-SC, avec l'éthanol en tant que cosolvant, a montré que l'extraction des formes aglycones est importante contrairement aux autres formes conjuguées. L'étude de l'extraction éthanolique de l'échelle laboratoire à échelle industrielle a montré que les formes résiduelles après plusieurs cycles d'extraction étaient les formes malonyles. Avec l'étude par eau pressurisée, qui est un solvant plus polaire (malgré les conditions sub-critique de l'eau), ce sont les formes aglycones qui sont plus difficilement extraites. En partant d'une farine contenant moins d'aglycones il a donc été possible d'extraire 85 % des isoflavones avec l'eau pressurisée. La large gamme de polarité des isoflavones de soja a été le frein principal pour leur élimination.

5.2. Influence de la teneur en protéines : limite à l'extraction d'isolat protéique sur les systèmes pressurisés

Il a été observé premièrement que pour une utilisation en eau pressurisée, les protéines subissent une « agrégation » importante venant perturber l'extraction de cette matière. Le ratio solide-liquide y est, dans ce sens, déterminant. L'ajout d'un agent de dispersion est indispensable à la faisabilité de cette extraction, du moins dans un système ASE. De plus, l'hydrolyse de la matière protéique est très importante ce qui entraine une forte solubilisation des protéines. Cette hydrolyse est plus importante lorsque la quantité de protéines augmente. Même si l'extraction des isoflavones a été possible, l'industrialisation de cette méthode semble difficile à atteindre compte tenu de ces limites rencontrées et du rendement d'extraction faible obtenu.

Un comportement différent des matières a été observé dans la cellule d'extraction utilisée pour le CO_2-SC. En effet, en sortie d'extraction, la farine apparaissait moins dense et des macropores régulièrement répartis était observés ce qui n'était pas le cas pour l'isolat protéique. Ce comportement de la matière protéique vis-à-vis du mélange CO_2-SC/EtOH, bien qu'il soit difficile d'en décrire sa nature exacte, semble représenter une limite technologique importante.

Au travers de l'étude de l'extraction par fluides pressurisés, il a été montré que les formes conjuguées en particulier les formes malonyles sont retenues par la matrice lors de l'utilisation d'isolat protéique, ce qui n'est pas observé à partir de farine de soja alors que la teneur en formes conjuguées y est plus forte.

Des phénomènes d'adsorption sur la matrice protéique des formes malonyles sembleraient freiner leur extraction (liaisons hydrogènes ou ioniques entre les extrémités protéiques et les extrémités acides des malonyles), la charge ionique et le nombre d'atomes d'hydrogène étant supérieur pour les formes malonyles (Figure III-21).

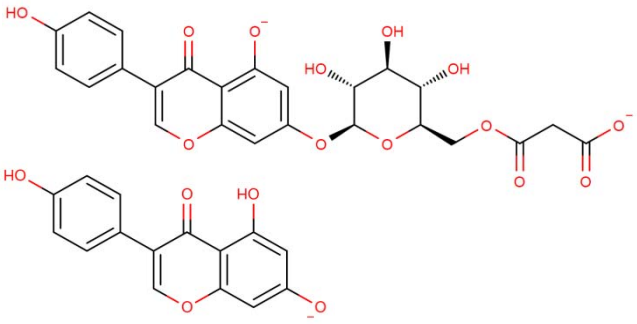


Figure III-21. Représentation des espèces malonyl-génistine et génistéine à pH 7,4

Un traitement enzymatique pour la transformation des formes conjuguées en aglycones pourrait faciliter l'extraction des isoflavones à partir d'isolat protéique. Cette voie devra être plus amplement étudiée.

5.3. Bilan industriel

Les méthodes par liquides pressurisés pour le traitement d'isolat protéique de soja ne présentent pas, à ce stade, des candidates intéressantes pour une industrialisation du fait du comportement de la matière protéique expliqué précédemment ou de l'impact sur cette dernière en particulier l'hydrolyse des protéines en eau pressurisée engendrant une co-extraction importante de matière protéique. De plus, la performance de la méthode choisie doit être, pour cet objectif d'élimination, très importante puisqu'il est nécessaire d'extraire plus de 98 % des isoflavones tout en ayant un très fort taux de récupération protéique. Ces méthodes ne permettent pas d'atteindre ce niveau d'efficacité.

L'extraction éthanolique présente deux avantages, une perte très faible en matière puisque l'éthanol favorise la précipitation des protéines, et l'obtention de rendements d'extraction des isoflavones importants supérieurs à 70 % qui peuvent être améliorés par extraction multi-étagée. Cette dernière a permis de produire à petite échelle un isolat protéique ayant une teneur résiduelle en isoflavones inférieur à 50 ppm (µg/g) avec trois étages d'extraction (masse d'isoflavones en équivalent aglycones sur masse d'isolat sec) ce qui correspond au seuil visé. A échelle industrielle sur Tournaire à fond filtrant un nombre important d'étages mais de courtes durées (20 min) a été nécessaire pour atteindre ce seuil représentant une durée d'extraction de 4h 40, cependant un sous-tirage plus intense pourrait permettre d'en réduire le nombre et donc la durée totale d'extraction. L'utilisation d'éthanol à 96 % a permis de récupérer 94 % des protéines. L'extracteur Tournaire présent au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle a permis d'effectuer une recirculation de l'éthanol par distillation sur des durées équivalentes à celle de l'extraction. Ces travaux ont permis de développer un premier isolat protéique de soja appauvri en isoflavones. Les aspects d'élimination de solvant dans la matière première, de valorisation du coproduit riche en isoflavones et saponines sont à envisager. L'impact de l'éthanol sur les protéines devrait être aussi à considérer.

Chapitre IV. Isolement des protéines de riz et diminution de leur poids moléculaire par hydrolyses enzymatiques

1. Introduction

Un des objectifs principaux de ces travaux était de développer un isolat protéique de riz avec une teneur proche de 90 % de protéines sur le produit final en partant d'un produit concentré en protéine ou d'une matière première à plus faible coût. Ce travail est présenté dans une première partie en tant que préalable au deuxième objectif qui était la réduction de la taille des protéines. Il décrit les résultats obtenus lors de l'isolement de la fraction protéique de riz issue d'hydrolyses des polysaccharides à partir de différentes matières premières plus ou moins riches en protéines dont le contenu est préalablement caractérisé.

Dans une deuxième partie, le développement d'hydrolysats protéiques de riz est présenté. Il a été conduit à partir de deux matières enrichies en protéines préalablement produites par traitements ciblés sur les polyssacharides (un concentré protéique et un isolat protéique de riz). La réduction de la taille des protéines et réalisée par l'utilisation de protéases identifiées antérieurement auprès de fournisseurs et lors d'essais d'hydrolyse sur concentré protéique. Après la mise en place des méthodes HP-SEC (ou GPC) et d'électrophorèse pour les profils de poids moléculaire, l'influence de l'hydrolyse a pu être étudiée. Ces résultats ont été croisés avec d'autres indicateurs tels que le degré d'hydrolyse et la solubilité des protéines. L'objet de ces travaux est de tendre vers des protéines à faible poids moléculaire hypoallergénique sous le seuil de 3000 Da.

2. Isolement préalable des protéines de riz par hydrolyses enzymatiques

2.1. Caractérisation des matières premières choisies

2.1.1. Teneurs globales en macronutriments et minéraux

La teneur en protéines, à l'issue de la caractérisation des matières provenant du riz est conforme aux spécifications des fournisseurs si l'on tient compte du facteur de conversion Kjeldahl (Azote/Protéines) qui est fixé à 6,25 pour les produits commerciaux (présentation des matières et des méthodes de caractérisations Chapitre II.1). En prenant le facteur 5,95, très souvent utilisé dans la littérature pour le riz, les concentrés ont des teneurs en protéines à 63 % et 79 % sur poids sec (Tableau IV-1), le son de riz en contient 15 %. La farine blanche, où la partie superficielle a été retirée (son), contient plus de 90 % de sucres dont une très large majorité est de l'amidon. Le son de riz, qui est principalement constitué des parties externes du grain contient également beaucoup de sucres à hauteur de 20 % mais peu d'amidon. Ces sucres proviennent en réalité des polyssacharides pariétaux (hémicelluloses, cellulose). La différence entre les deux concentrés s'explique en partie par la proportion en minéraux et en lipides puis par la teneur en amidon. Ces matières sont issues de la production de sirop de glucose et sont les résidus protéiques après traitement à l'amylase : il semble donc que le traitement sur l'amidon soit plus poussé sur le produit R79 et qu'il proviendrait d'une matière première délipidée. Le niveau d'abrasion lorsque le son est retiré peut être différent d'un produit à l'autre. S'il n'est éliminé que partiellement, la proportion en lipides et en minéraux en serait modifiée (avant traitement par amylase). De plus, la couleur plus brune du concentré S63 pourrait provenir d'un procédé enzymatique différent ou d'un contenu en fractions de son de riz plus importantes (Figure IV-1). La totalité de la matière contenue dans la farine est

caractérisée. Alors que seulement 10 % de la matière reste non expliquée dans les concentrés protéiques, cela atteint 30 % pour le son de riz.

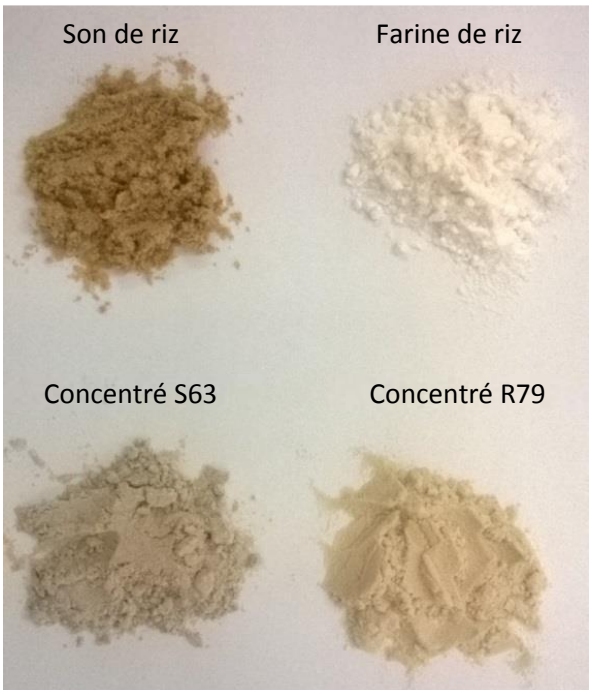


Figure IV-1. Présentation des matières de riz utilisées

Les fournisseurs donnent des teneurs plus fortes en glucides totaux car certaines méthodes officielles (Arr. 08/09/1977) sont basées sur une détermination par différence ($M_{glucides\ totaux} = M_{totale} - M_{identifiée}$).

Tableau IV-1. Composition globale des matières premières de riz utilisées

	MS (%)	**MM (% sur MS)**	**Protéines* (% sur MS)**	**Lipides** (% sur MS)**	**Glucides totaux (% sur MS)**	**Amidon (% sur MS)**
Farine de riz	87,8 ± 0,03	0,3 ± 0,04	6,5 ± 0,10	< 1,5	92,3	84,7 ± 0,2
Concentré S63	95,6 ± 0,05	4,1 ± 0,04	63,3 ± 1,30	5,1	16	9,0 ± 0,45
Concentré R79	91,9 ± 0,75	1,3 ± 0,45	78,9 ± 0,80	1,06	9,7	3,5 ± 0,11
Son de riz	90,0 ± 0,05	10,3 ± 0,04	15,3 ± 0,04	21-23	21	7,8 ± 0,07

* Facteur de conversion 5,95 utilisé ici ; ** données sur les lipides issus des fiches techniques fournisseurs

Bien que peu d'informations aient été identifiées dans la littérature concernant la teneur en lignine, elle a déjà été quantifiée dans des membranes cellulaires issues de différentes fractions de riz (albumen, tissus à aleurone, germe et enveloppe du caryopse) après retrait des protéines et de l'amidon (voir diagramme Chapitre I.1.4.4). Elle constituerait autour de 5 % des tissus à aleurone (présents dans le riz brun et le son de riz) ce qui pourrait expliquer une partie de la matière non identifiée outre les écarts analytiques potentiels. De plus, la méthode utilisée pour le dosage des glucides totaux a été basée sur 4

sucres après hydrolyse (glucose, xylose, arabinose et galactose), les autres sucres ne sont donc pas identifiés ici tels que le rhamnose ou le fructose bien que potentiellement largement minoritaires.

2.1.2. Teneurs en différents glucides

L'analyse de la fraction glucidique montre, comme attendu, que le glucose est dosé dans des proportions similaires à celles de l'amidon à partir de la farine où il constitue près de 94 % des glucides totaux. Il est majoritaire dans les quatre produits (Figure IV-2). Concernant les concentrés protéiques (CPR) le glucose représente 70 % des glucides analysés et 50 % dans le cas du son de riz.

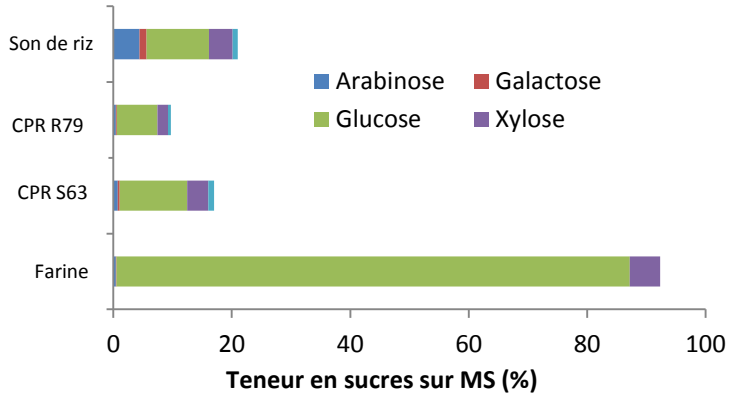


Figure IV-2. Teneurs en glucides sur matière sèche déterminées par HPIC après hydrolyse acide

Le glucose provient principalement de chaine d'amidon, et représente ainsi 97,5 % du glucose dans la farine. Dans le cas du concentré S63, 80 % du glucose provient de l'amidon alors qu'il ne représente que 51 % dans le concentré R79. Cette différence semble appuyer l'idée d'une étape de désamidonation différente selon le produit. Dans le son de riz, le glucose est aussi principalement issu d'amidon (74 %). Ces résultats montrent qu'il est donc possible de retrouver d'autres polysaccharides composés de glucose tels que la cellulose à hauteur de 2 à 3 % sur la totalité du concentré sur base sèche, qui seraient retirés de l'endosperme durant l'abrasion ou bien enchâssé dans la matrice protéique/cellulosique.

La teneur en hémicelluloses a déjà été étudiée dans différentes fractions du riz. Ces polyssacharides de structure sont plus complexes que les autres composés pariétaux, ils contiennent différents hexoses, pentoses ou des acides aminés (Shibuya, Iwasaki 1985). Pour le son riz les hémicelluloses sont principalement constituées d'arabinoses et de xyloses, il est courant d'utiliser le terme arabino-xylane ou galacto-mannane pour les décrire. Le rapport en Arabinose/Xylose concernant le son de riz (Figure IV-2) est similaire à ce que l'on peut retrouver dans la littérature (Shibuya, Iwasaki 1985).

Tableau IV-2. Rapports des teneurs en glucides constitutifs des hémicelluloses dans les produits de riz

Produit	Arabinose/Xylose	Galactose/Mannose
Farine de riz	0,09	Nd
Concentré S63	0,21	0,35
Concentré R79	0,23	0,41
Son de riz	1,11	1,30

Ce rapport est totalement différent à partir des concentrés de protéines de riz car l'arabinose est détecté sous forme de traces seulement.
Les concentrés de protéines de riz contiennent donc de l'amidon et des résidus d'hémicelluloses, de cellulose et de lignine. Outre les hémicelluloses classiques, la présence de composés mixtes de type protéoglycans existe dans le son de riz (Yamagishi, Matsuda *et al.* 1975).

2.2. Hydrolyse des fractions polysaccharidiques pour isoler les protéines de riz à petite échelle

2.2.1. Hydrolyse de l'amidon sur farine de riz

La purification des protéines a été envisagée dans un premier temps par élimination des sucres contenus dans les produits initiaux (farine, concentrés S63 et R79). L'extraction en conditions basiques ne peut pas être envisagée compte tenu de la formation de composés potentiellement toxiques (lysinoalanine) et la dégradation d'acides aminés (Friedman, Levin *et al.* 1984).
Des mélanges enzymatiques capables de catalyser l'hydrolyse de l'amidon mais aussi des composés pariétaux tels que les hémicelluloses et la cellulose sont donc choisis afin d'augmenter la teneur en protéines pour atteindre des valeurs proches de 90 % sur produit final sec.
La très large proportion d'amidon dans la farine entraine, dans certaines conditions, une importante gélification notamment dans les conditions optimales d'utilisation des amylases. La gélification est un processus qui survient après la gélatinisation. Cette dernière dépend fortement de la présence en eau et se déroule en plusieurs étapes dont le gonflement irréversible des grains d'amidon, leur éclatement, leur dispersion (Münzing 1991). Le refroidissement entraine la rétrogradation ou gélification de l'amidon. Des températures généralement supérieures à 60 °C sont nécessaires pour que ce processus soit complet.

Des essais d'hydrolyse ont cependant été effectués à 50 °C afin d'éviter la dénaturation des protéines qui sont la fraction d'intérêt dans cette étude. Pour mettre en évidence cet aspect non quantifiable, la gélification du culot en fin de traitement est présentée sous 4 niveaux (de l'absence de gel (-) à la gélification complète du culot empêchant la récupération de la fraction protéique (++). Des essais d'hydrolyse ont été menés par l'intermédiaire d'amylases (BAN™ et Fungamyl™) de dépolymérase et d'un mélange Viscozyme L™ (méthodes et enzymes plus amplement décrites Chapitre II.7). Ils ont été suivis ou non d'une étape de lavage à l'eau en dessous de la température d'ébullition (85 °C) après centrifugation.

Le rendement de récupération de la fraction protéique et la pureté en protéines du produit final (culot après traitement et centrifugation) sont décrits dans le Tableau IV-3.

Tableau IV-3. Traitements enzymatiques par amylases et mélanges enzymatiques de type cellulolytiques

Traitement	S/L	Pureté protéines (%)	Rdt Protéines (%)	Rdt MS (%)	Gélification du culot (%)
Initial		6,5 ± 0,1			
B + V + lavage	1/10	ND	ND	ND	++
B + F + lavage	1/10	68,3 ± 6,5	83,5 ± 8,5	8,0	+
B + F + V + lavage	1/10	59,5 ± 4,2	93,3 ± 0,7	10,2	+
B + F + D + lavage	1/10	57,4 ± 2,9	92,4 ± 9,1	10,5	+
B + F	1/10	54,1	86,9	8,5	+
B + F	1/20	77,8	82,8	6,8	+

Expériences effectuées en triplicata

+ pour une gélification partielle permettant la récupération d'un jus amylacé après centrifugation

++ pour une gélification forte formant un gel compact et empêchant la séparation de l'amidon et du culot. B = BAN480L Amylase; F = Fungamyl 800L (amylase) ; V = Viscozyme L ; D = Dépolymérase Dépol 20L ; lavage avec eau 80/90°C sur le culot de centrifugation. S/L pour ratio solide/liquide.

Il a été possible de récupérer une fraction protéique contenant autour de 65 % de protéines avec l'utilisation de deux amylases (1,4-α-D-Glucan-glucanohydrolases) issues de sources biologiques différentes (*Bacillus amyloliquefaciens* pour la BAN™ et *Aspergillus oryzae* pour la Fungamyl™), qui permettent dans ces températures relativement basses d'hydrolyser l'amidon sans hydrolyser les protéines. Le rendement en protéines est relativement haut mais la liquéfaction de l'amidon n'a pu avoir lieu que partiellement, des résidus gélifiés empêchent dans certains cas une séparation solide/liquide convenable.

D'autres essais ont montré une influence importante du ratio solide-liquide pour un même ratio substrat/enzyme, la liquéfaction a probablement été plus facile dans le mélange 1/20.

L'étape de lavage du culot après une première centrifugation entraine un gain important en protéines puisque la teneur correspondante passe de 54 % (B + F) à 68 % (B + F + lavage) ce qui montre que l'amidon est dissocié des protéines mais que la séparation solide-liquide est une étape limitante. Afin de diminuer la présence partielle de gel d'amidon (formé par gonflement des grains d'amidon, dénaturation puis gélatinisation) la température d'hydrolyse a été augmentée tout en restant dans une gamme de température qui dénature le moins possible les protéines évitant ainsi leur solubilisation. La température optimale de dénaturation de l'amidon de riz est connue pour être située autour de 80 °C alors que les glutélines (protéines majoritaires du riz blanc) ont une température de dénaturation légèrement supérieure (Figure IV-3).

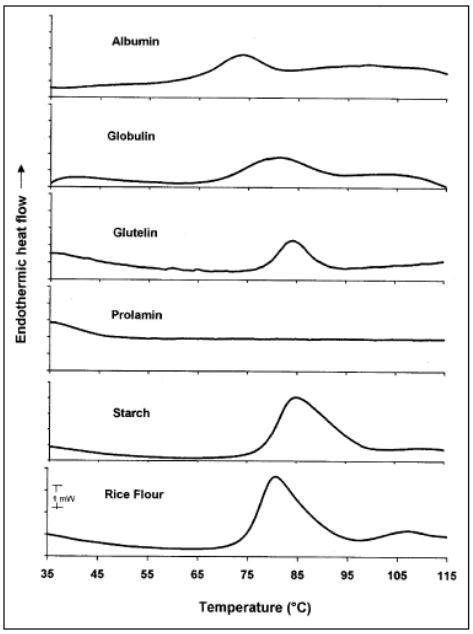


Figure IV-3. Dénaturation des protéines de riz par classe de protéines (Ju, Hettiarachchy et al. 2001)

Des essais d'hydrolyse séquencée ont été réalisés avec *i)* une étape à 70 °C avec la BAN 480 L™ pour initier plus rapidement la gélatinisation de l'amidon *ii)* une étape d'hydrolyse par ajout de Fungamyl™ à 50 °C pour continuer la liquéfaction de l'amidon (Tableau IV-4) à une température par les deux enzymes.

Tableau IV-4. Hydrolyse séquencée par amylases effectuée à 70°C puis à 50°C

Traitements	S/L (%)	Pureté protéines (%)	Rdt Protéines (%)	Rdt MS (%)	Gélification du culot (%)
B (2h) + F (2h)	1/10	73,5 ± 0,9	78,6 ± 1,8	6,9	-
[B (1h) + F (1h)] x2	1/10	81,9 ± 2,5	80,3 ± 0,9	6,4	-
[B (1h) + F (1h)] x2	1/5	79,9 ± 2,7	81,4 ± 1,6	6,5	-
B (1h) + F (1h) + blanc (2h)	1/10	55,1 ± 0,9	81,7 ± 0,7	9,6	-

B= BAN480L à 70 °C; F = Fungamyl 800L à 50 °C; lavage avec eau 80/90 °C sur le culot de centrifugation
Expériences effectuées en triplicata ; S/L pour ratio solide/liquide ; x2 pour traitement répété sur culot

Ce changement de température favorisant la gélatinisation de l'amidon (préalablement importante pour sa liquéfaction par les amylases) a permis premièrement de récupérer de manière répétable un jus amylacé clair et un culot protéique dépourvu de gel d'amidon. Un traitement à 70/80°C seul, en tant que blanc, a engendré une formation d'un gel compact rendant impossible l'accès de l'enzyme vis-à-vis de son substrat même après l'ajout de l'enzyme à 50 °C et sans refroidissement.

Ces essais ont montré que le ratio solide/liquide n'a plus d'influence lorsque le processus de gélatinisation est plus avancé à 70 °C. La répétition du traitement faisant intervenir les amylases entraine une amélioration importante de l'isolement des protéines. Ce résultat montre que le ratio enzyme/substrat est le facteur limitant l'hydrolyse, et ce gain d'environ 10 % n'est pas due à l'action de lavage. En effet, un premier traitement (BAN™ puis Fungamyl™) suivi d'un blanc (ajout d'eau seulement) montre une moindre efficacité avec une pureté de 55,1 % de protéines contre 81,9 % lorsqu'un double traitement est effectué (Tableau IV-4).

Afin d'éviter une perte en protéine trop importante, un pH sur le culot final de 4,5 a été appliqué sur l'ensemble des expériences. Il est possible d'améliorer considérablement l'activité des amylases en travaillant à pH 6 mais le gain en pureté protéique se fait au détriment du rendement protéique (Tableau IV-5). Dans ce cas, le rendement chute de 20 %.

Tableau IV-5. Effet du pH sur l'isolement des protéines par traitement par amylases

Pureté protéines		Pureté protéines (%)	Rdt Protéines (%)	Rdt MS (%)	Gélification du culot (%)
B (1h) + F (1h) + blanc (2h)	pH 4,5	55,1 ± 0,9	81,7 ± 0,7	9,6	-
	pH 6	80,9 ± 1,1	61,9 ± 3,5	5	-

Des amylases dédiées habituellement à la production de sirop issu d'amidon ont été utilisées pour leur résistance à de plus fortes températures (90°C, au-delà de la température de gélatinisation de l'amidon) et pour leur capacité à rompre les liaisons présentes dans l'amidon en bout de chaine (concernant l'AMG amyloglucosidase). Elles n'ont pas montré d'amélioration en termes d'isolement (pureté) et de récupération (rendement) en protéines (Tableau IV-6).

Tableau IV-6. Hydrolyse séquencée par amylases résistantes à des températures supérieures à 70°C

1h 90°C Term + 1h 70°C AMG	Pureté protéines (%)	Rdt Protéines (%)	Rdt MS (%)	Gélification du culot (%)
Term408+AMG200	77,1 ± 2,5	87,7 ± 2,3	7,4	-
Term102+AMG75	72,3 ± 2,7	81,2 ± 3,5	7,3	-

Expériences effectuées en triplicata, tous les résultats et écart-type sont exprimés en % ; Term102+AMG75 même activité enzymatique introduite que les essais précédant sur BAN 480L™. Term408+AMG200 même quantité.

Le pH d'hydrolyse a beaucoup d'influence sur l'isolement et la récupération en protéines, un équilibre entre activité enzymatique et perte en protéine semble être en effet un aspect crucial. Un pH légèrement en dehors de l'activité maximale de l'enzyme (< pH 6) est nécessaire car ce dernier entrainerait trop de perte en protéines.

La production d'un ingrédient de type isolat protéique de riz à partir de farine blanche a été possible avec une teneur maximale de 82 % (facteur de conversion azote/protéine 5,95 soit 86 % avec le facteur 6,25 utilisé pour les produit commerciaux) avec une récupération en protéine de l'ordre de 80 %.

Le produit développé correspondrait à un concentré protéique à très haute teneur en protéine proche de 84 % avec l'utilisation du facteur de conversion 6,25 utilisé pour tous les autres produits commerciaux de ce type. L'objectif d'isoler les protéines est donc considéré comme atteint et ce à partir d'une matière peu coûteuse. L'autre avantage de ce produit est sa couleur blanche recherchée dans ce type d'application. Ce procédé induit cependant l'utilisation d'une quantité importante d'enzyme par rapport à la fraction protéique ciblée, et une quantité importante de jus amylacé est produite dont la valorisation pourrait s'apparenter aux sirops issus de la transformation du riz utilisés dans l'industrie agroalimentaire.

2.2.2. Hydrolyse des hémicelluloses et de l'amidon sur concentrés protéiques de riz

2.2.2.1. Objectif

Les concentrés protéiques de riz sont issus de l'industrie du sirop de glucose, ils sont les coproduits obtenus après traitement à l'amylase de farines de riz. Ils sont donc proches du produit obtenu durant les travaux précédemment décrits mais ce sont des farines brunes qui sont utilisées pour la production de sirop (endosperme et son). La matière d'origine est donc moins raffinée, plus complexe du fait de la présence de polyssacharides pariétaux, et la nature des protéines est en partie différente. En effet, le son de riz et l'endosperme contiennent des protéines de natures différentes. L'objectif est donc d'augmenter la teneur en protéines à partir des deux concentrés protéiques de riz (S63 et R79) pour développer un isolat protéique ou un produit ayant une teneur proche de 90 %. Le ou les produits seront ensuite hydrolysés par protéases en vue de développer des ingrédients hypoallergéniques à très haute teneur en protéines.

2.2.2.2. Essais sur le concentré protéique à teneur en protéines intermédiaire (concentré S63)

Pour ce type de matière, l'amidon n'est pas le seul composé à hydrolyser. Les fractions cellulosiques et hémicellulosiques représentent des teneurs conséquentes comme cela a été déterminé précédemment (section 2.1.2.). Les enzymes ont été testées seules, en mélange deux à deux et en mélange « progressif » afin de potentiellement mettre en évidence des interactions synergiques ou des inhibitions entre enzymes. Les essais ont été menés sur le concentré S63 contenant 63 % de protéines dont l'approvisionnement et le coût étaient plus favorables. Les rendements et les puretés protéiques après traitements enzymatiques suivis d'une étape de centrifugation, sont présentés dans le Tableau IV-7.

Tableau IV-7. Isolement des protéines par hydrolyses enzymatiques par amylase et enzymes cellulolytiques sur concentré protéique de riz à 63 % de protéine

	Pureté protéines (%)	**Rendement protéines (%)**
Initial	*63,3*	
Blanc	*68,67*	*91,6*
B	70,76 ± 0,4	94,2 ± 1,1
D	71,9 ± 0,8	97,0 ± 1,0
H	70,5 ± 1,1	96,8 ± 2,0
C	**72,5 ± 0,1**	**96,2 ± 1,8**
V	70,5 ± 0,2	94,9 ± 0,1
B+X1	71,8 ± 0,4	91,6 ± 0,3
B+X2	70,1% ± 0,8	94,1 ± 0,5
B+P	71,2 ± 0,1	94,5 ± 1,7
B+C	**73,3 ± 0,9**	**94,4 ± 1,4**
B+D	72,19 ± 0,0	95,3 ± 0,5
B+V	**72,3 ± 1,2**	**94,4 ± 1,5**
B+D+C	72,29 ± 0,9	92,9 ± 2,2
B+D+C+V	72,58 ± 0,7	92,6 ± 2,2
B+D+C+V+H	71,85 ± 0,2	91,3 ± 1,6
B+V+lavage	**75,26 ± 0,1**	**93,2 ± 0,3**
C+lavage	**74,7 ± 1,2**	**95,7 ± 1,5**

Hydrolyses effectuées sur 2 g de produit durant 4 h à 50 °C en bain agité ; séparation liquide-solide par centrifugation 6000 g 10 min après désactivation 15 min à 85 °C ; expériences effectuées en triplicata. Tous les résultats et écart-types sont exprimés en % sur base sèche ; les analyses sont effectuées en duplicata par la méthode de kjeldahl ; B = amylase BAN480L™ ; D = Dépolymérase Dépol 20L™ ; C = Cellulase 13L™ ; V = Viscozyme L™ ; H = hémicellulase ; X1 = Xylanase endo-1,4-β ; X2 = Xylanase Pentopan mono BG™ ; P = Phytase de blé ; lavage avec eau 80/90°C sur le culot de centrifugation. Le blanc est effectué uniquement avec de l'eau sans ajout d'enzyme.

La mise en solution et l'agitation du produit durant 4 h et sans ajout d'enzyme (blanc) a entrainé un gain de 5 % en teneur protéique. La perte en protéines est de 8 % environ, probablement due à une hydrolyse partielle des protéines ou une désagrégation qui pourrait avoir une action de solubilisation (dans ces travaux de thèse les protéines contenues dans ce produit (S63) apparaissent comme étant plus agrégées, explications dans ce même chapitre Section 3.3. à 3.4.).

Pour les traitements concernant les enzymes testées individuellement, les enzymes apportent peu d'amélioration. L'amylase (B) permet d'améliorer la pureté de 2 % alors que la teneur en amidon est de 9 % au départ (une gélification a pu avoir lieu et possiblement moins visible que lors des essais sur farine). Parmi les autres enzymes la cellulase qui semble être la plus efficiente dans ces conditions permet d'améliorer la pureté de 4 % donnant une pureté de 72 % et un rendement en protéines intéressant de 96 %. Ce traitement permet d'augmenter la pureté globale de 10 % par rapport à la teneur initiale. Les mélanges deux à deux montrent les mêmes résultats, exceptés pour les combinaisons amylase/cellulase (B+C) et amylase/Viscozyme^{TM} (B+V) qui semblent avoir des activités synergiques mais non significatives compte tenu des écarts expérimentaux.

Les combinaisons par ajout « successifs » montrent l'absence de synergie et d'inhibition entre ces enzymes. De plus, la perte en protéines y est plus importante, probablement du fait de l'action de protéases résiduelles contenues dans les mélanges enzymatiques.

Les traitements enzymatiques ont permis d'augmenter légèrement la pureté protéique mais lorsqu'ils sont suivis d'un lavage, la teneur en protéines passe de 63 % à 75 %. Le rendement en protéines varie de 91 % à 97 % ce qui montre que la solubilisation des protéines dépend du traitement enzymatique.

Afin de vérifier si la durée d'hydrolyse de l'amidon et des structures hémicellulosiques n'était pas limitante une cinétique a été réalisée avec les mélanges amylase/viscozyme/xylanase (Figure IV-4).

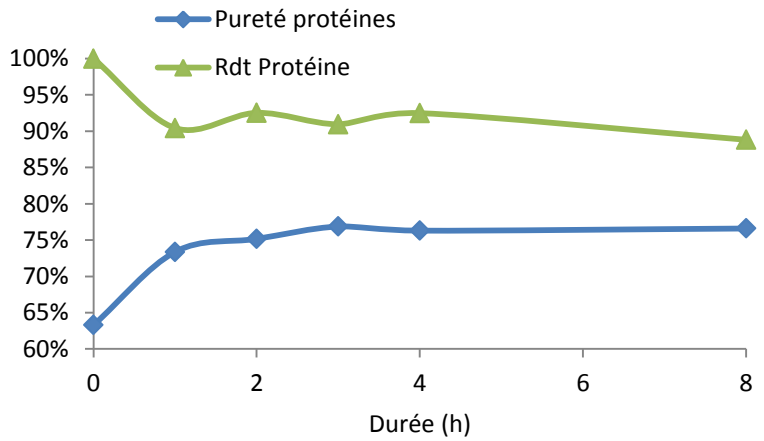


Figure IV-4. Cinétique de l'isolement des protéines par hydrolyses amylases et enzymes cellulolytiques

Des durées de 1 h à 2 h suffisent à atteindre un plateau, ce qui confirme que la durée de 4 h utilisée pour tous les autres essais est cohérente et suffisante.

L'hydrolyse de la matrice cellulolytique et amylacée a permis d'augmenter la teneur en protéines de 12 %. En prenant en compte les données de rendements et de pureté, la fraction non protéique solubilisée représente environ 17,6 % du produit initial ce qui correspond approximativement à la teneur en glucides totaux déterminée par HPIC sur le produit initial (Figure IV-2). Cependant la prise en compte des lipides et des minéraux possiblement extraits, (9 % sur la matière initiale), ou pour le moins mis en suspension, n'a pas été prise en compte.

2.2.2.3. Essais sur la matière la plus concentrée en protéines R79

Les essais sur le concentré le plus riche en protéines (78,9 %) ont montré qu'il est possible d'augmenter cette teneur et d'obtenir un isolat protéique (Tableau IV-8). L'utilisation d'amylase (BAN 480L^{TM}) a permis d'augmenter la teneur de 6 % comparé au blanc. Au vu de l'absence d'inhibition entre enzymes sur les essais précédents, les enzymes ont été testées en mélanges progressifs afin de limiter le nombre d'expériences.

Tableau IV-8. Isolement des protéines de riz à partir de concentré protéique R79 de riz par hydrolyse enzymatique

Traitement	Pureté P (%)	Rdt P (%)
Initial	78,9 ± 0,8	
Blanc	80,6 ± 0,1	98,6 ± 0,6
B	86,5 ± 0,0	97,5 ± 1,0
B+V	**88,96 ± 1,9**	**99,4 ± 1,8**
B+D	86,3 ± 0,3	96,2 ± 0,9
B+D+C	86,6 ± 0,4	95,5 ± 0,6
B+D+C+V	87,9 ± 0,4	96,9 ± 0,7
B+D+C+V+H	86,5 ± 0,5	95,4 ± 0,8
B+V+lavage	**90,18 ± 0,4**	**97,7 ± 1,4**

Hydrolyses effectuées sur 2 g de produit durant 4 h à 50 °C en bain agité ; séparation liquide/solide par centrifugation 6000 g 10 min après désactivation 15 min à 85 °C ; expériences effectuées en triplicata. Tous les résultats et écart-types sont exprimés en % sur base sèche ; les analyses sont effectuées en duplicata par la méthode de kjeldahl ; B = amylase BAN480L^{TM} ; D = Dépolymérase Dépol 20L^{TM} ; C = Cellulase 13L^{TM} ; V = Viscozyme L^{TM} ; H = hémicellulase ; X1 = Xylanase endo-1,4-β ; X2 = Xylanase Pentopan mono BG^{TM} ; P = Phytase de blé ; lavage avec eau 80/90°C sur le culot de centrifugation. Le blanc est effectué uniquement avec de l'eau sans ajout d'enzyme.

L'ajout d'enzymes (cellulase, dépolymérase et hémicellulase) n'a pas d'effets significatifs sur le traitement du concentré protéique (Tableau IV-8). Le traitement à l'amylase couplée à la viscozyme entraine ici un gain important et permet d'atteindre un seuil de pureté correspondant à un isolat protéique de l'ordre de 90 %.

La matière solubilisée représente 14,5 % de matière sèche initiale et 1,8 % de protéine environ. La perte en protéines est moindre à partir de ce concentré et l'élimination de la matière non protéique correspond à la fraction glucidique identifiée lors de la caractérisation ainsi que des fractions minérales et lipidiques représentant 12 % au départ.

2.2.3. Mise à l'échelle sur 500 mL en réacteur agité

A partir des résultats obtenus à petite échelle (2 g) dans un système de tubes à centrifugation clos agités dans un bain marie, les traitements optimaux déterminés pour chaque produit sont testés sur une échelle plus importante (50 g) et en réacteur agité, plus représentatif d'une potentielle industrialisation, les résultats de pureté en protéines et de rendements sont présentés ci-après (Tableau IV-9).

Tableau IV-9. Isolement des protéines sur une échelle intermédiaire de 50 g de produit dans 500 mL d'eau en réacteur agité

Matière première	Traitement (%)	Pureté protéines (%)	Rdt Protéines (%)
Concentré R79	B	84,3	100,0
	Blanc	81,1	99,8
	V	83,2	99,5
	B+V+lavage	89,8	94,3
Concentré S63	B+C+lavage	76,3	93,3
Farine	(B+F)x2	76,35	80,3

**Expériences effectuées en triplicata, tous les résultats et écart-type sont exprimés en % ; V = Viscozyme L™ B = amylase BAN480L™ ; C = Cellulase 13 L™ ; F = Fungamyl™*

Ils montrent très peu de variation par rapport aux essais effectués dans les tubes PVC dans le bain marie sur plaque d'agitation.

Le passage en réacteur agité a donné des résultats satisfaisant compte tenu de la proximité des rendements et puretés d'une échelle à l'autre. Les essais sur farine de riz ont engendré une légère perte en pureté protéique et un rendement en protéines identique à l'hydrolyse effectuée en bain marie (Tableau IV-4 p.147). Pour les concentrés, les résultats de puretés sont conformes aux traitements à petite échelle (Tableau IV-7, p.150 et Tableau IV-8, p.152), la possibilité de produire un isolat protéique de riz est donc confirmée. Le rendement en protéines a été très légèrement réduit pour les deux concentrés probablement à cause d'une agitation plus forte qui entrainerait une solubilisation légèrement accrue des protéines.

Cette étude montre qu'il est possible de produire un isolat protéique de riz à partir du concentré R79 à 79 % de protéines en combinant l'action d'une amylase et d'une cellulase suivi d'un lavage à l'eau pour arriver à un produit à 90 % de protéines que l'on nomme AI-R90. A partir d'un concentré moins coûteux

et plus facilement disponible un concentré plus riche a été développé que l'on nomme AI-S76 à 76 % de protéines. Ces deux matières sont par la suite utilisées pour la production d'hydrolysats protéiques.

Il faut également souligner que la production d'un tel concentré est envisageable en partant de farine. Ce traitement implique cependant la production d'une grande quantité d'hydrolysat d'amidon. L'autre voie d'obtention envisagée pour la production de d'isolat protéique est l'utilisation d'une matière peu coûteuse, tel que le son de riz ou le concentré protéique à 63 % de protéine.

2.3. Concentration des protéines de son de riz par leur solubilisation à la protéase

Les études se sont focalisées sur le son de riz car c'est une matière abondante, sous-exploitée et peu coûteuse. Le traitement du son de riz par amylase (enzymes de type cellulolytique) et par phytase (Wang, Hettiarachchy *et al.* 1998) n'a pas permis d'enrichir significativement la fraction protéique (non discutés dans ce manuscrit). Des essais d'hydrolyse par endoprotéase (montrant des résultats sur les protéines de soja dans un premier temps) dans un réacteur agité ont été effectués sur son de riz afin de solubiliser et d'isoler les protéines (Figure IV-5). Le schéma de production inclut une hydrolyse par protéase (endoprotéase Promod 278 MDP) puis une filtration sur toile suivie d'une centrifugation pour récupérer les peptides dans le surnageant.

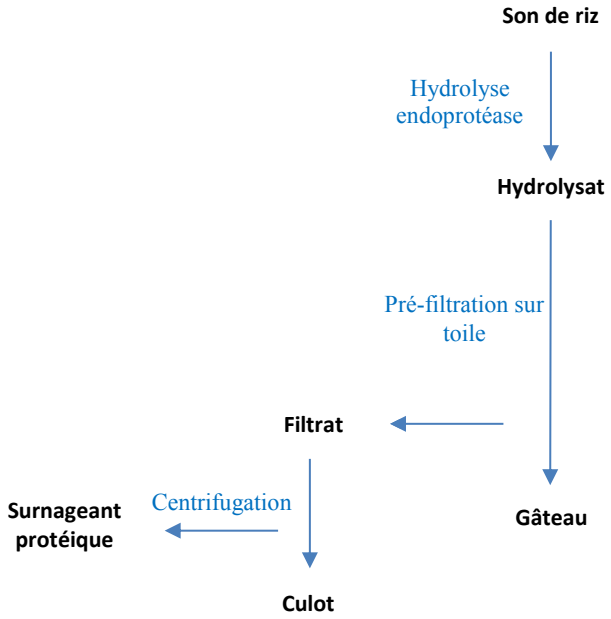


Figure IV-5. Schéma représentatif du procédé mis en œuvre pour la solubilisation des protéines de son de riz

Le premier filtrat contient des protéines à la fois en suspension et solubilisées, le surnageant de centrifugation contient uniquement celles qui sont solubilisées. Une solubilisation du son de riz dans l'eau pendant 2 h à 50 °C suivi d'une montée en température en fin de traitement (blanc) entraine la solubilisation d'environ 10 % des protéines après centrifugation (Tableau IV-10). Ce taux de solubilisation est très proche de celui déterminé pour les solubilités des différentes matières (Figure IV-6).

Tableau IV-10. Bilan de récupération en protéines et matière sèche dans le filtrat et le surnageant de centrifugation avec ou sans traitement à l'endoprotéase

	Filtrat			Surnageant		
	Pureté protéines (%)	**Rdt P (%)**	**Rdt MS (%)**	**Pureté protéines (%)**	**Rdt P (%)**	**Rdt MS (%)**
Initial	15,3					
Blanc	12	34,5	44	7,2	9,7	20,7
Hydrolyse à pH 8	19	61,6	49,5	27,1	48,4	27,3
Hydrolyse à pH 6,5	21,7	56,8	40	38,3	55	22

Ce taux de quoi atteint 48 % avec un traitement par endoprotéase et il peut être amélioré si le pH de l'hydrolyse est réduit de 8 à 6,5. Un pH 8 entraine une récupération en protéines plus importante dans le premier filtrat étant donné qu'il s'agit du pH optimum d'activité de l'enzyme. Cependant, à partir du surnageant après centrifugation, c'est-à-dire les protéines solubilisées, un meilleur rendement est observé avec le pH de 6,5. La co-solubilisation d'hémicelluloses ou d'autres composés pariétaux peut avoir lieu dans des conditions basiques (Gremli, Juliano 1970; Shibuya, Iwasaki 1985) entrainant une plus faible pureté en protéines. Pour envisager une optimisation le pH semble être un premier paramètre à considérer.

Ce traitement effectué sur 2 h d'hydrolyse a permis de récupérer une fraction contenant près de 38 % de protéines avec une enzyme non dédiée habituellement aux protéines de riz (ce mélange commercial d'enzymes est dédié à l'hydrolyse des protéines de soja pour le développement d'ingrédients spécialisés). Ces résultats sont sensiblement supérieurs à ce qui a déjà été observé dans la littérature où la solubilisation, plutôt que la pureté en protéines, était l'objectif principal de ces rares travaux de recherche, donnant des puretés de 27 à 30 % seulement mais des rendements en protéines beaucoup plus importants avec 81 à 87 % (Hamada 1999) ; (Hamada 2000). Ceci avait été possible par l'utilisation d'agents dénaturants non compatibles avec une application alimentaire. La co-solubilisation d'autres composés freine cependant les possibilités d'amélioration de la pureté en protéines.

Pour atteindre l'isolement des protéines, ce procédé pourrait être envisagé par une étape de purification couplée au traitement par protéase *via* une démarche d'optimisation et de suivi de poids moléculaire. De plus, l'utilisation des protéases actives à des pH plus acides représenteraient un moyen intéressant pour atteindre de meilleures puretés (comparés à ceux utilisés classiquement avec les protéases conventionnelles de type Alcalase ou Flavourzyme). Les rendements de récupération des protéines pourraient être augmentés en recyclant les culots et gâteaux dans une autre étape d'hydrolyse. Une déstructuration thermomécanique de la matière pourrait permettre de faciliter l'extraction et l'hydrolyse des protéines de son de riz. En effet, des études récentes ont montré la possibilité de concentrer les protéines de riz par ce type de méthodes (partie bibliographie de ce manuscrit 2.1 I 2.1). L'extrusion bi-vis pourrait être envisagée pour permettre la solubilisation des protéines par action thermomécanique et des méthodes enzymatiques couplées. L'extrusion a déjà montré son impact favorable sur attaque protéolytique (Jung, Mahfuz *et al.* 2009).

3. Production et caractérisation d'hydrolysats à partir du concentré AI-S76 et de l'isolat protéique de riz AI-R90

3.1. Solubilité initiale des protéines issues des matières premières de riz comparée à celle des protéines de soja

Les solubilités des protéines contenues dans les trois matières de riz ont été étudiées en prenant en compte l'influence du pH en solution aqueuse (Figure IV-6) et en les comparants à celles du soja. L'expérimentation menée par dosage Kjeldahl après solubilisation et centrifugation est présentée Chapitre II.6.4 .

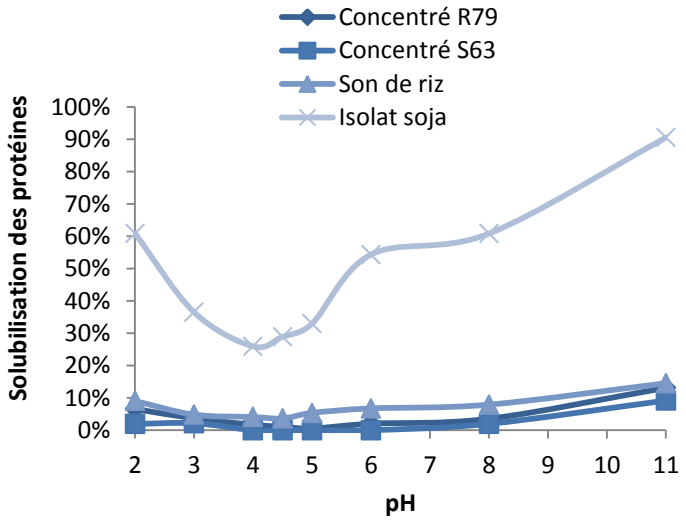


Figure IV-6. Solubilité des protéines de riz et de soja en fonction du pH

Le comportement des protéines de riz est très différent des protéines de soja, leur solubilité est inférieure à 10 % entre pH 2 et pH 8. Elles sont très peu solubles même à des pH fortement alcalins ce qui est parfois observé dans la littérature (Wang, Hettiarachchy *et al.* 1998; Shih, Daigle 2000)). Les protéines de soja utilisées se comportent de manière similaire à ce qui est observé dans la littérature, c'est-à-dire une solubilisation relativement importante mais non totale pour des pH acides, une zone de précipitation autour de pH 4 à pH 5 (point isoélectrique des protéines) et une solubilisation importante, quasiment totale, pour les pH les plus alcalins (Smith, Circle 1938) (Lawhon, Rhee *et al.* 1981). Pour le riz, la solubilité la plus faible se situe aussi dans cette zone comme il est possible de le voir sur une échelle différente (Figure IV-7).

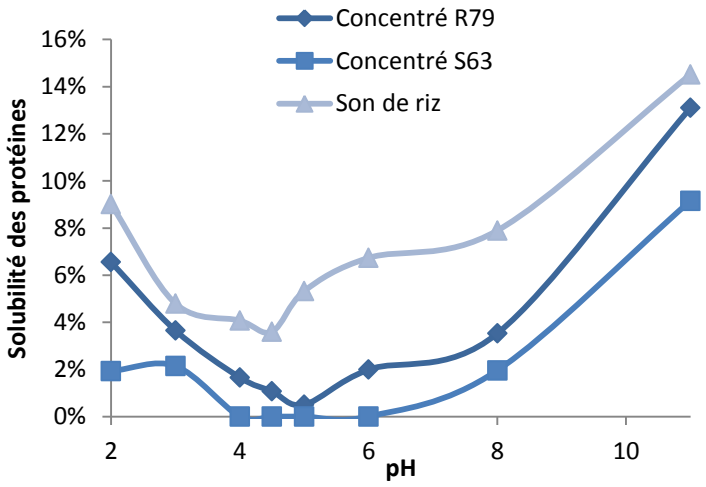


Figure IV-7. Solubilité des protéines de riz en fonction du pH

3.2. Suivi de la solubilisation des protéines de riz durant l'hydrolyse par protéase à partir de AI-S76 et AI-R90

A partir d'une production d'isolat AI-R90 et de concentré protéique de riz AI-S76 sur une échelle de 50 g (présentées précédemment Tableau IV-9, p.153), l'étude de leur hydrolyse par protéase a été effectuée à petite échelle dans des volumes de 20 mL contenant 2 g de matière sèche sur des durées différentes jusqu'à 8 h de traitement. Les fractions protéiques de riz obtenues sont nommées isolat AI-R90 et concentré AI-S75 obtenus à partir des concentrés R79 et S63 respectivement. Ces deux produits ont été hydrolysés avec deux types d'enzymes commerciales, une endoprotéase l'Alcalase (2 % $m/m_{protéines}$) pendant les deux premières heures du traitement à partir d'un pH ajusté à 8, puis par ajout de Flavourzyme (3 % $m/m_{protéines}$) qui contient des activités endoprotéases mais aussi exopeptidases. La Flavourzyme est active en conditions plus acides, l'action de la première enzyme entrainant une chute du pH est nécessaire à son activité (l'expérimentation et les activités enzymatiques sont détaillées Chapitre II.7).

Après une durée variable selon l'expérience, une désactivation et une séparation par centrifugation, la quantité de protéines dans les surnageants sont dosés par Kjeldahl (dupliqués) et pour leur contenu en matière sèche. Cette méthode permet de suivre la solubilisation des protéines en fonction du temps d'hydrolyse et la pureté en protéines. Ces données servent de premier indicateur de l'évolution de l'hydrolyse (Figure IV-8 et Figure IV-9).

Pour les deux matières traitées, le pH passe rapidement et progressivement de 8 à 6,5 avant l'ajout de Flavourzyme pour diminuer très légèrement ensuite. La pureté en protéines du surnageant à partir du produit AI-S76, bien que relativement stable, évolue en début de traitement et comparativement à la teneur en protéines de départ qui était de 76 %, elle augmente jusqu'à 80 % et est corrélée à la baisse de pH. Concernant l'autre matière la pureté est stable et reste très proche de la valeur de départ de 90 % de protéines (sur poids sec).

Les matières protéiques initiales montraient des solubilités en protéines très basses de 0 à 3,5 % entre pH 7 et 8 (avec un ratio solide/liquide de 1 %). Après des temps d'hydrolyse par protéases variables, chaque hydrolysat est centrifugé en conservant le ratio solide-liquide experimental de 10 %. Ce ratio plus important que celui utilisé pour mesurer les solubilités initiales induit un culot plus conséquent qui a tendance à minimiser la solubilité en retenant une part importante de liquide, la solubilité étant calculée sur la quantité de protéines récupérées dans le surnageant. Afin de tenir compte de ce biais, deux types de solubilités ont été calculées. La première tient compte uniquement de la quantité de protéines récupérée dans le surnageant tandis la deuxième tient compte aussi du volume de liquide total initial (nommé « solubilité absolue » et « rendement en protéines du surnageant »). Ainsi les deux les relations suivantes sont utilisées :

$$Rendement\ en\ protéines\ du\ surnageant = \frac{Q_{protéines\ surnageant}}{Q_{protéines\ introduites}} \times 100$$

$$Solubilité\ absolue = \frac{\frac{Q_{protéines\ surnageant}}{V_{surnageant}} \times V_{hydrolysat\ initial}}{Q_{protéines\ introduites}} \times 100$$

Dans les deux systèmes, la solubilité absolue de la matière protéique évolue de la même façon mais dans des proportions légèrement différentes. En effet le taux de protéines solubilisées passe de 32 % à 60 % pour le produit AI-S76 (Figure IV-8) puis de 28 % à 68 % pour l'isolat protéique AI-R90 (Figure IV-9). Ce gain de solubilité est très largement dû à l'action de la deuxième enzyme qui possède une activité exopeptidase (Flavourzyme). Le rendement en protéines récupérées dans le surnageant suit la même évolution mais est plus faible à 36 % et 40 %.

Les données concernant les activités enzymatiques sont difficiles à comparer car elles ne sont pas mesurées sur les mêmes bases et font intervenir des mécanismes différents. En effet, l'Alcalase a une activité de 2,4 AU/g (Anson Unit qui correspondant au suivi de la production d'acides aminés et peptides associés à la libération 1 µmol equivalent tyrosine à partir d'hémoglobine) et la Flavourzyme à une activité de 500 LAPU/g (Leucine Amino-Peptidase Unit). Une LAPU est définie par la quantité nécessaire pour l'hydrolyse de 1 µmol de leucine-*p*-nitroanilide par minute. Généralement ces deux enzymes sont introduites avec des rapports massiques enzyme/substrat équivalent ou proche. L'action principale apportée par la Flavourzyme réside dans son activité exopeptidase et est souvent utilisée en tant que telle. Le choix de la quantité d'enzyme introduite a été basé sur les recommandations des fournisseurs et des essais préliminaires à ces travaux de thèse. Ainsi le rapport activité/quantité de protéines pour l'Alcalase était de 0,048 AU/g. Pour la Flavourzyme ce rapport était de 15 LAPU/g.

La libération d'acides aminés et de peptides après l'ajout de Flavourzyme a un fort impact sur la solubilisation globale. Le pH évolue fortement pour l'enzyme active à des pH basiques (Alcalase) durant les deux premières heures mais évolue peu avec l'utilisation de la Flavourzyme car il est déjà légèrement acide (pH 6,5).

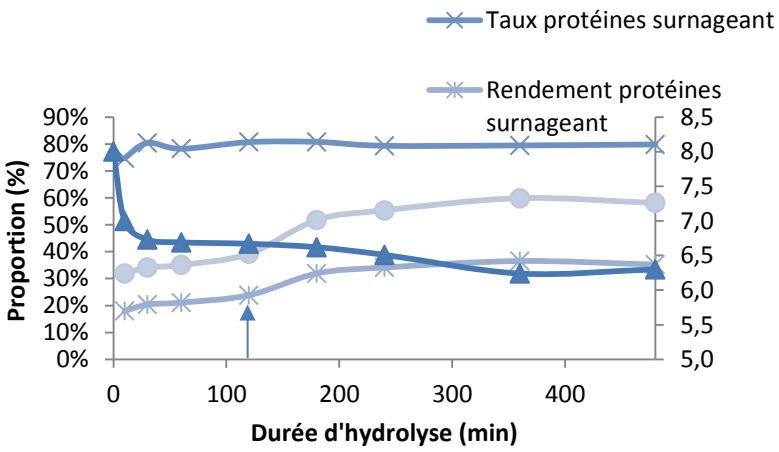


Figure IV-8. Solubilisation des protéines à partir de l'hydrolyse par protéases sur la fraction protéique issue du concentré AI-S76. La flèche indique l'ajout de Flavourzyme

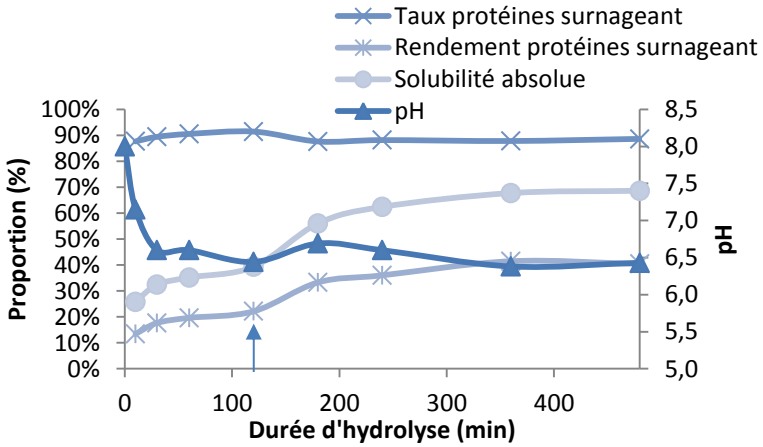


Figure IV-9. Solubilisation des protéines à partir de l'hydrolyse par protéases sur isolat protéique issu du de l'isolat AI-R90. La flèche indique l'ajout de Flavourzyme

3.3. Suivi du degré d'hydrolyse lors des traitements enzymatiques

Les concentrés de protéines de riz (matières premières initiales) ont, au départ, des degrés d'hydrolyse de 0,5 et 2 % pour les concentrés R79 et S63 respectivement, indiquant que le second contient des protéines plus dénaturées (la méthode du degré d'hydrolyse utilisée est décrite Chapitre II.6.3). Après traitements enzymatiques sur les polysaccharides pour obtenir AI-S76 et AI-R90, des phénomènes d'hydrolyses des protéines sont mis en évidence car les degrés d'hydrolyse des produits isolés passent à 5 % et 6 % avant le traitement par protéase (Figure IV-10). L'hydrolyse par les enzymes amylases ou cellulolytiques a donc entrainé une dénaturation importante de la matrice protéique en libérant des liaisons N-terminales et a permis d'avoir, avant l'action des protéases, des degrés d'hydrolyse proches entre les deux produits.

Durant le traitement à la protéase, la première phase faisant intervenir l'alcalase indique une hydrolyse partielle avec une augmentation du DH jusqu'à 10 %. Après ajout de Flavourzyme il augmente fortement pour atteindre des niveaux très hauts à 36 % et 45 % indiquant aussi une forte différence entre le potentiel d'hydrolyse des deux matières, l'hydrolyse sur AI-R90 étant largement supérieure. Pour rappel, ce taux indique que 36 % et 45 % des liaisons N-peptidiques sont rompues.

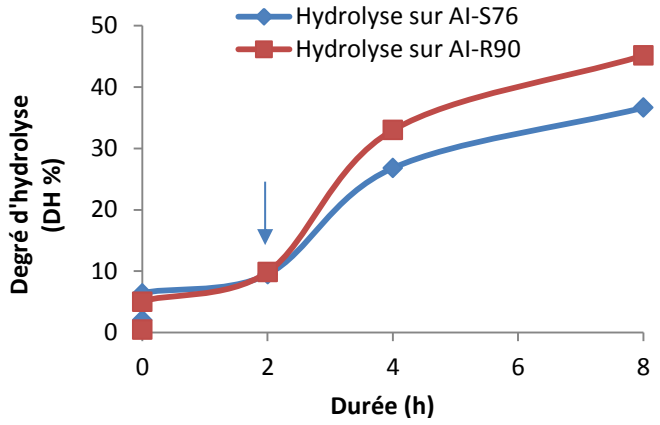


Figure IV-10. Suivi du degré d'hydrolyse des protéines de riz issues des concentrés protéiques

3.4. Etude des profils de poids moléculaire des hydrolysats protéiques par HP-SEC

3.4.1. Problématique de la solubilité de l'échantillon : mise au point sur soja et riz

Lors de la mise au point de la méthode HP-SEC, la première observation a été la mise en évidence d'une fraction insoluble très conséquente après solubilisation des protéines de soja et de riz dans un tampon phosphate conventionnellement utilisé. L'introduction de SDS a été privilégiée pour son pouvoir de solubilisation des protéines. L'introduction de SDS à hauteur de 2% (m/V) a permis de solubiliser les protéines que ce soit pour les matières premières ou pour les hydrolysats ce qui a déjà été observé et utilisé pour le dosage par HP-SEC des protéines de soja (Jung, Mahfuz *et al.* 2009). La méthode utilisée est décrite Chapitre II.6.1.

Cependant l'impact de l'utilisation de SDS a été observé par comparaison des chromatogrammes et profils de tailles obtenus car il a un léger pouvoir dénaturant. La présence de SDS ne modifie pas l'allure du chromatogramme obtenu avec l'isolat protéique de soja, et fournit des profils de poids moléculaire très proche mais avec une réponse spectrale globale plus intense (Figure IV-11).

Les matières premières de riz sont encore moins solubles dans le tampon phosphate, pour le concentré protéique S63 en particulier qui montre même une réponse spectrale nulle sans SDS. L'ajout de SDS entraine une désagrégation et une solubilisation partielle de ces protéines qui permet de pouvoir observer les profils de poids moléculaires.

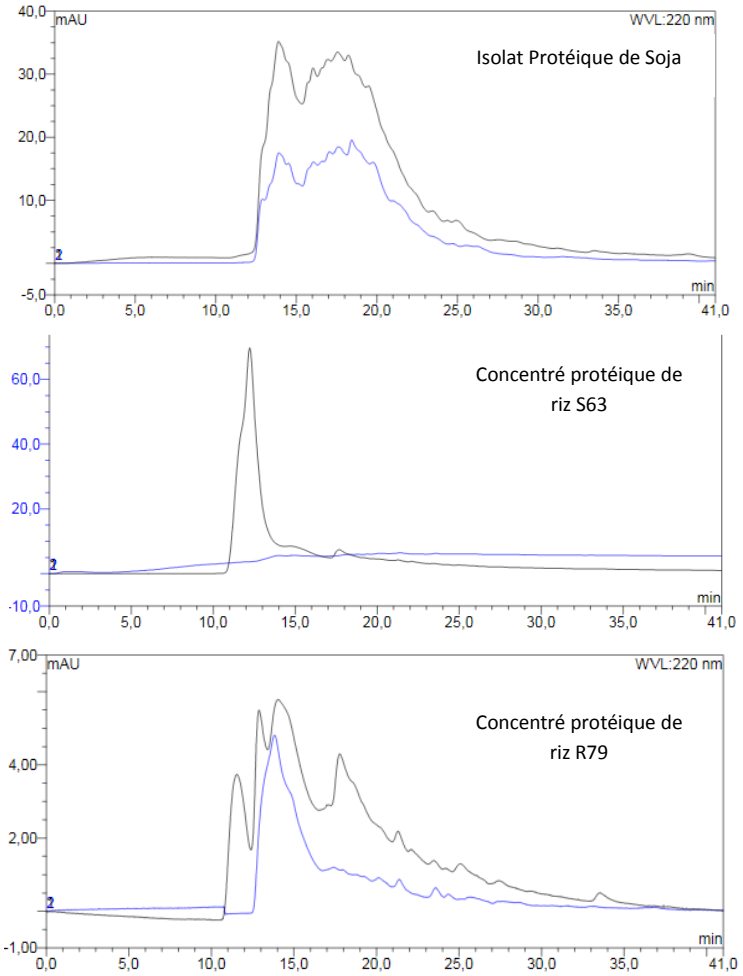


Figure IV-11. Chromatogramme comparatif entre la solubilisation effectuée au tampon phosphate avec ou sans ajout de SDS à partir de l'isolat protéique de soja et concentrés protéiques de riz. Bleu sans SDS et noir avec SDS

3.4.2. Profil de poids moléculaire des deux matières premières concentrées de riz

Les profils de poids moléculaire sont présentés après dosage au tampon phosphate avec SDS (Figure IV-12). Après solubilisation et centrifugation, les profils des deux concentrés sont très différents. Au sein du concentré S63, plus de 70 % des protéines sont au-dessus de 66 kDa et aucune n'est détectée sous 10 kDa alors que le deuxième montre de plus faibles poids moléculaires dont 80 % sont sous 66 kDa. L'explication la plus probable est que les protéines du concentré S63 sont fortement agrégées.

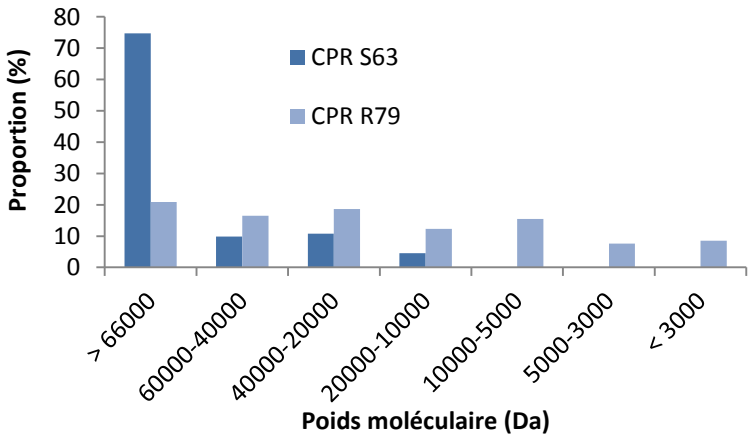


Figure IV-12.Profil de poids moléculaire des protéines issus des matières protéiques de soja et de riz. CPR et IPS pour concentrés protéiques de riz et isolat protéique de soja respectivement

Les concentrés protéiques de riz ont des poids moléculaires moyens de 90472 Da et 40219 Da (la précision est à relativiser compte tenue qu'une partie importante des protéines est en dehors de la gamme d'étalonnage (>66 kDa).

3.4.3. Suivi des hydrolyses de protéines riz

Concernant l'action des protéases, le traitement a un fort impact sur le profil de poids moléculaire (Figure IV-13 et Figure IV-14), après 2 h d'hydrolyse et ajout de la seconde enzyme à action endo et exo-peptidase (Flavourzyme) deux pics très tardifs apparaissent (1 et 2 sur le graphe). Ils sont en dehors de la gamme des standards protéiques au-delà du plus faible poids moléculaire qui est la vitamine B12 (1355 Dalton) qui se situe à 22,12 min.

Ces deux pics correspondent probablement à des acides aminés produits par la Flavourzyme qui n'était pas présente au départ.

Le même comportement est observé lors de l'analyse des hydrolysats issus du deuxième concentré protéique de riz avec l'apparition des deux pics associés à des masses moléculaires très faibles, la seule différence est l'intensité de l'absorbance UV plus forte pour l'isolat protéique hydrolysé du fait de sa meilleure solubilité et pureté (Figure IV-13). Ceci rejoint les données de solubilité expliquées plus haut qui donnaient des taux plus important pour le concentré R79. De plus, le degré d'hydrolyse était plus important pour celui-ci.

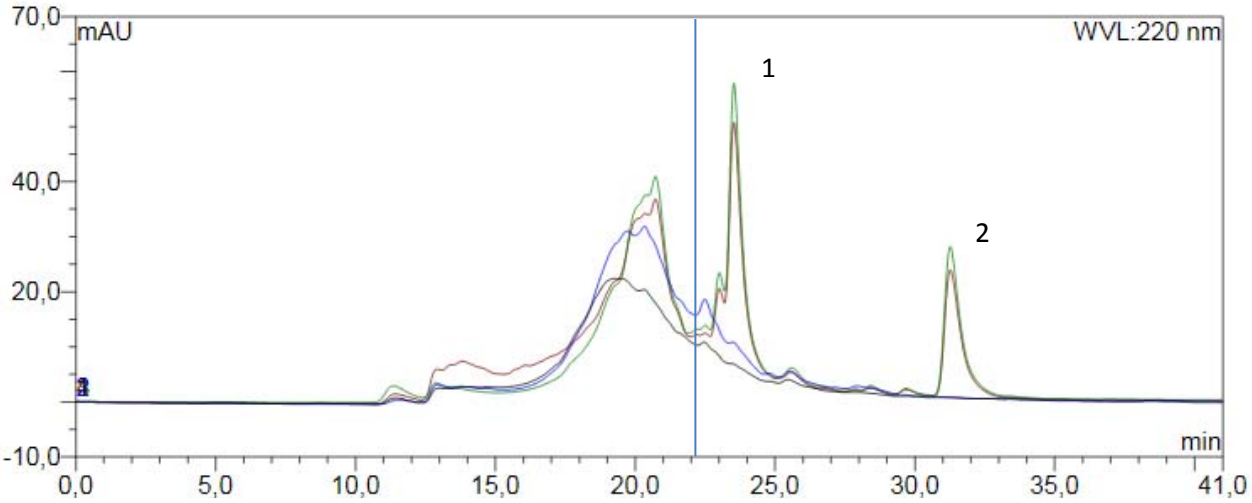


Figure IV-13. Chromatogrammes obtenus lors des analyses de profil de poids moléculaire en HP-SEC des hydrolysats protéiques produits à partir du concentré S63 par solubilisation au SDS. En noir la solution à t0, hydrolyse après 2h en bleu, 4h en rouge, 8h en vert. Le trait bleu situe la sortie du standard le plus petit la vitamine B12 à 1355 Da.

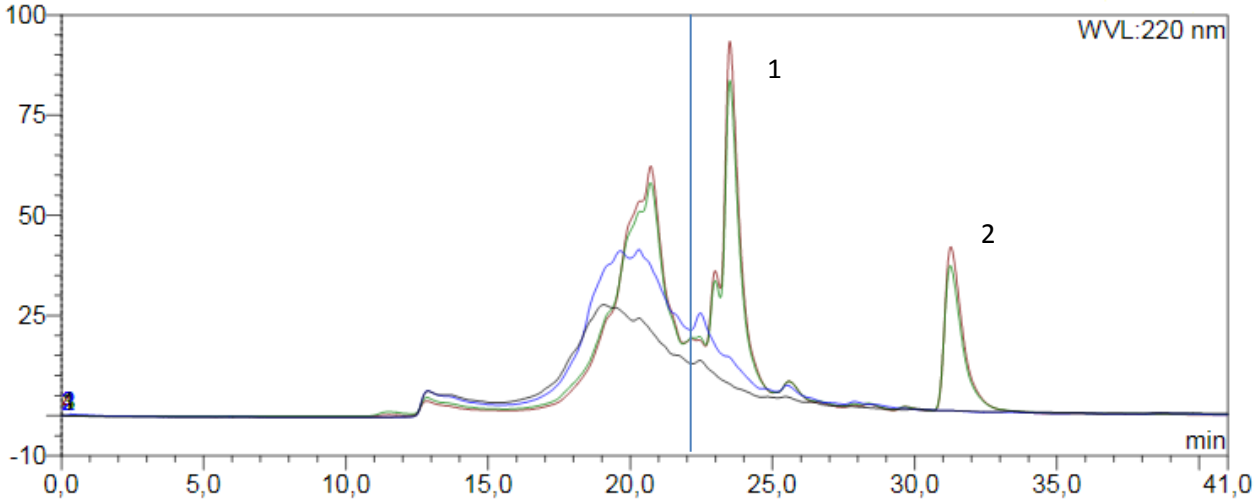


Figure IV-14. Chromatogrammes obtenus lors des analyses de profil de poids moléculaire en HP-SEC des hydrolysats protéiques produits à partir du concentré R79 par solubilisation au SDS. En noir la solution à t0, hydrolyse après 2h en bleu, 4h en vert, 8h en rouge

Les profils de poids moléculaires confirment l'effet de l'hydrolyse enzymatique sur les concentrés protéiques AI-S76 (Figure IV-15) et AI-R90 (Figure IV-16). L'hydrolyse est progressive, avec une récupération de mélanges peptidiques ayant des faibles poids moléculaire dont les proportions relatives sont de 71,2 % et 84,1 % sous les 5000 Da après 8 h d'hydrolyse sur le concentré protéiques AI-S76 et AI-R90 respectivement et de 43 % et 58 % sous 3000 Da. Les fractions situées entre 5000 Da et 10000 Da sont hydrolysées préférentiellement après 2 h avec une augmentation de la fraction sous 3000 Da.

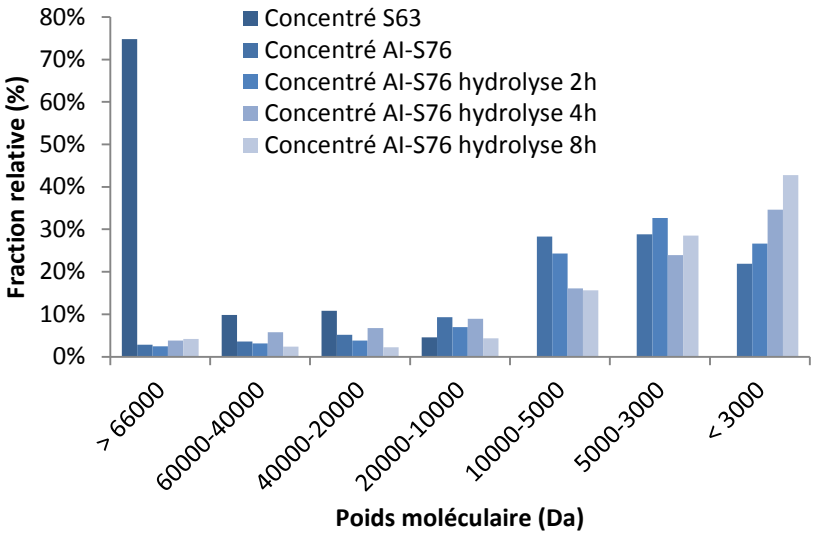


Figure IV-15. Evolution du profil de poids moléculaire par hydrolyse enzymatique sur concentré protéique de riz enrichie AI-S76 à partir de la matière première S63

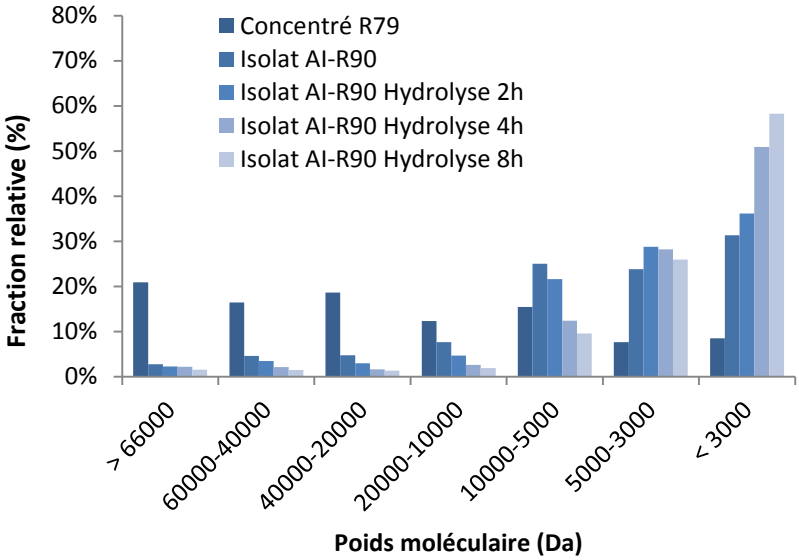


Figure IV-16. Evolution du profil de poids moléculaire par hydrolyse enzymatique sur isolat protéique de riz AI-R90 à partir de la matière première concentré R79

Comme cela est démontré par le degré d'hydrolyse dans la section précédente, l'effet du traitement n'a pas la même efficacité sur les deux concentrés protéiques, les fractions de faible poids moléculaire étant relativement plus importantes concernant les protéines de l'isolat protéique de riz. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'ils n'ont pas le même profil de poids moléculaire au départ, ce qui peut être dû soit à une dénaturation différente du concentré R79 initial soit par l'agrégation de protéines dans le produit S63 qui entrainerait une accessibilité réduite vis-à-vis des protéases.

L'effet des protéases n'est cependant pas le seul traitement qui influence le profil de poids moléculaire. Il est probable que la durée de traitement de 4 h à 50°C en présence d'amylase ait une forte influence sur le profil de taille. Ceci a aussi pu être accentué par l'étape de dénaturation qui a eu lieu en fin de traitement à 85 °C durant 15 min. En effet, les profils déterminés après traitements enzymatiques sur les polyssacharides suivis d'une dénaturation (concentré protéique AI-S76 et isolat protéique AI-R90) révèlent un impact important du prétraitement d'isolement des protéines avec une disparition presque totale des protéines, ou agrégats, qui ont des poids supérieurs à 66 kDa (Figure IV-15 et Figure IV-16).

Durant l'étape d'hydrolyse par protéases, jusqu'à 2 h de traitement, les profils de poids moléculaire changent légèrement (environ 10 % de peptides passent sous 5 kDa). Il est donc clair que l'action de l'Alcalase impacte très peu les profils de poids moléculaire contrairement à la Flavourzyme ajoutée après 2 h de traitement. Au-delà, ce sont les fractions situées entre 5 et 10 kDa qui semblent être hydrolysées pour former des peptides de taille inférieure à 3 kDa.

Au final, ces essais ont permis la production à petite échelle d'hydrolysats protéiques de riz contenant 71 % et 84 % de peptides sous les 5000 Da et 43 % et 58 % sous 3000 Da et ayant une teneur respective de 76 et 90 % de protéines. Ce qui correspond à des hydrolysats extensifs conformes à l'objectif visé. La présence de protéines résiduelles de haut poids moléculaire, potentiellement allergènes, est cependant constatée. L'hydrolyse totale des protéines par protéase est utopique de par la présence d'inhibiteurs mal identifiés, de cofacteurs et de phénomène d'autolyse (Tavano 2013). Il est donc nécessaire d'ajouter une étape de séparation liquide-solide ou membranaire afin de retirer complètement les protéines indésirables dans le cas où ces dernières seraient trop prédominantes. Cela pourrait par exemple être utile à partir du concentré hydrolysé AI-S76 (l'utilité de cette étape ne pourra être définie qu'après étude de l'allergénicité).

3.4.4. Elimination des protéines de haut poids moléculaire par séparation liquide/solide

Afin d'étudier l'élimination de protéines de haut poids moléculaire, une première approche a consisté à centrifuger l'hydrolysat produit après 8 h de traitement à partir de concentré AI-S76, le schéma récapitulatif du procédé incluant cette étape est présenté ci-dessous (Figure IV-17). Le surnageant comme l'hydrolysat global ont été analysés après solubilisation dans le tampon phosphate avec SDS 2 % comme cela a pu être déterminé précédemment (section 3.4.1.) afin de mesurer l'effet de l'ajout d'une étape de séparation dans le procédé. Deuxièmement, pour comprendre l'influence du choix du tampon pour l'analyse (sans SDS et avec SDS), un dosage de l'hydrolysat global à partir d'une solubilisation dans le tampon phosphate seul a aussi été effectué dans un but purement analytique cette fois.

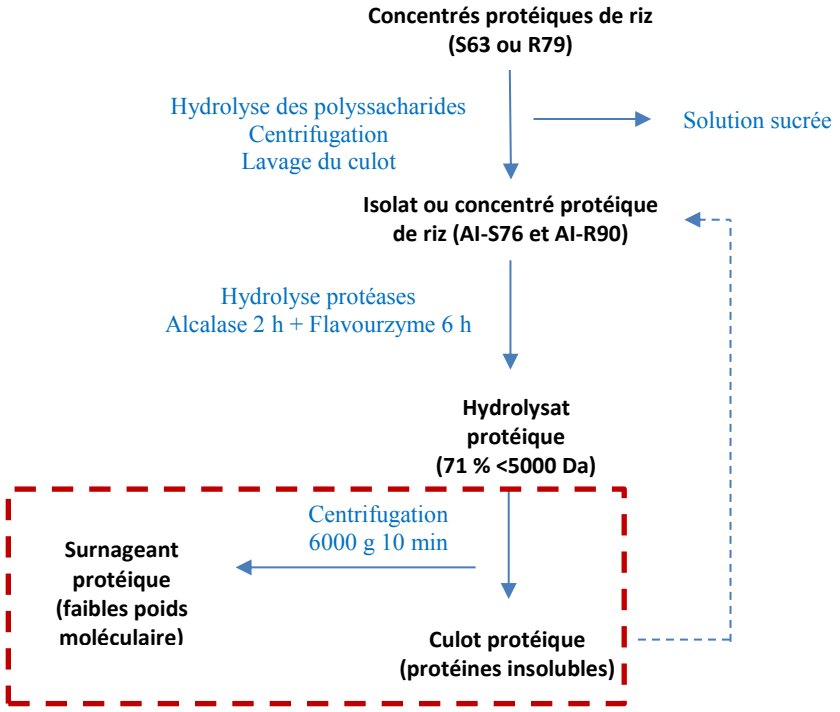


Figure IV-17. Présentation du schéma du procédé de production d'hydrolysat protéique de riz avec une étape de séparation liquide/solide. En pointillé rouge l'étape ajoutée avant analyse HP-SEC

Ces résultats montrent premièrement, qu'une étape de séparation solide-liquide permet d'atteindre une proportion en peptides de faible taille de l'ordre de 70 % sous 3000 Da (contre 43 % avec l'hydrolysat global sans séparation au préalable) et 90 % sous 5000 Da (contre 84 %). A partir de l'isolat AI-R90, la proportion de peptides sous 3000 Da passe de 58 % et 65 % et ceux sous 5000 Da de 84 % à 90 %.

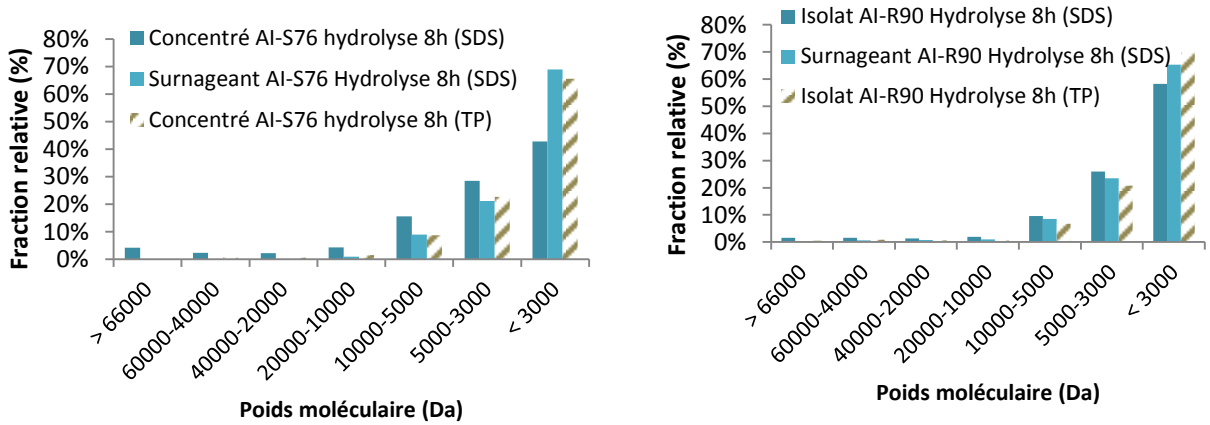


Figure IV-18. Profil de poids moléculaire des hydrolysats après 8 h de traitement avec ou sans étape de séparation solide/liquide. L'hydrolysat global est solubilisé par tampon phosphate avec ou sans SDS

L'influence de la séparation est très marquée concernant le concentré AI-S76 (Figure IV-18). Cette étape de séparation entraine néanmoins des pertes en protéines importantes. En se référant aux données de solubilité en matières sèches et protéines, les taux de solubilités absolus de 50 et 60 % considérant tout le liquide y compris la fraction résiduelle dans le culot, qui peut être récupérée par lavages. Si ce type d'étape est envisagé il faudra donc prévoir le recyclage d'une fraction protéique importante et des étapes de lavages. De plus, elle ne peut être envisagée qu'à partir d'une matière peu coûteuse au départ.

Deuxièmement, d'un point de vue analytique, ces résultats ont permis de comprendre la différence entre l'utilisation de tampon phosphate seul ou additionné de SDS 2 %. Le fait de solubiliser l'hydrolysat protéique seulement dans le tampon phosphate (2 h à 30 °C suivi d'une étape de centrifugation et filtration sur filtre seringue) revient à éliminer un nombre important de protéines de haut poids moléculaire de la même façon que si une étape de centrifugation est intégrée dans le procédé (dosage du surnageant avec tampon SDS 2 %). Les étapes de préparation, pour ce type de méthode, privilégient pourtant l'utilisation d'un tel tampon phosphate. Même si le SDS est connu pour dénaturer partiellement les protéines, il permet ici d'obtenir des profils de poids moléculaire plus représentatifs du produit.

3.5. Profil de taille par électrophorèse SDS-PAGE

Les électrophorèses sont précédées d'une solubilisation dans un tampon de charge, le SDS jouant ce rôle, avec ou sans présence d'agent réducteur dénaturant (β-mercaptoéthanol) afin d'identifier la présence de sous unités liées entre elles. Cet agent permet de rompre les ponts disulfures ayant un rôle de liaison, de type covalente, dans la structure tertiaire ou quaternaire des protéines, c'est-à-dire dans le repliement de chaine et l'assemblage de sous-unité.

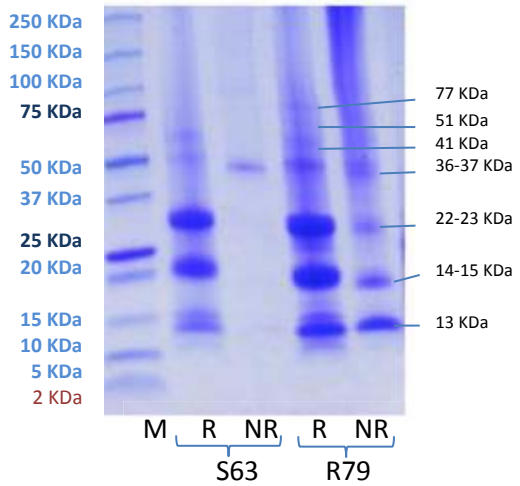


Figure IV-19. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE représentant les poids moléculaires des protéines issues des matières protéines. R pour conditions réductrices et NR pour non réductrice à partir des concentrés protéiques de riz

En condition dénaturante réductrice, les profils de poids moléculaire des deux concentrés protéiques de riz sont très proches (Figure IV-19, S63 et R79, bandes R). En condition non réductrice ce n'est pas le cas et la ligne le concentré S63 révèle peu de protéines solubilisées, avec une bande à 34 kDa et une à 79 kDa de faible intensité (les poids moléculaires ont été déterminés avec le logiciel Gel Analyser et la méthode est décrite Chapitre II.6.2). Ce résultat rejoint l'observation établie par la méthode HP-SEC qui montrait une faible solubilité de ce produit d'une part et une proportion en poids moléculaire plus haut d'autre part. La dénaturation (S63 bande R) entraine l'apparition des mêmes fractions protéiques que le concentré R79. L'agrégation des protéines pour le concentré le moins riche en protéine est donc confirmé. Deux hypothèses sont envisagées, la première consiste à ce que les protéines contenues dans le concentré R79 soient déjà partiellement dénaturées puisqu'il est déjà possible de voir les sous-unités en condition non dénaturante réductrice et que son degré d'hydrolyse est légèrement plus haut. Cependant, il est aussi possible que les protéines du concentré S63 soient plus agrégées ce qui peut advenir lors de l'utilisation de procédés thermiques ou la dénaturation entraine cette agrégation. D'après la littérature, deux chaines de prolamines apparaissent à 13 kDa et 16 kDa, une chaine basique de la glutéline de 22-23 kDa et une chaine acide de 37-39 kDa, une globuline à 26 kDa. Pour les plus haut poids moléculaire, une chaine dite de proglutéline à 57 kDa est identifiée et des bandes non identifiées autour de 70 kDa sont mises en évidence (Xia, Wang *et al.* 2012). Les protéines précédemment citées sont retrouvées ici, avec une forte similitude, en particulier pour les plus faibles poids moléculaires.

L'hydrolyse des protéines de riz a un impact important sur le profil de taille. Après enrichissement de la fraction protéique et dénaturation préalable au traitement d'hydrolyse (t0), les bandes caractérisées précédemment en conditions réductrices (Figure IV-19) apparaissent comme étant très proches de celles déterminées ici en condition non dénaturante pour le t0 (Figure IV-20). Ceci révèle et confirme la désagrégation des protéines lors de l'étape de traitement à l'amylase. L'action des protéases est très marquée et progressive. Une bande relativement large apparaît qui correspond à des peptides dont les poids moléculaires sont de l'ordre de de 5 à 14 kDa au détriment des fractions identifiées initialement de 13 à 51 kDa. Les très faibles poids moléculaires (<5 kDa) sont cependant difficiles à discerner. L'électrophorèse confirme aussi une moindre efficacité sur le produit concentré AI-S76 ; des fractions résiduelles entre 17 et 23 kDa sont encore clairement identifiables après 8 h d'hydrolyse ce qui rejoint les analyses effectuées en HP-SEC montrant une proportion plus faible de petits peptides à partir de cette matière.

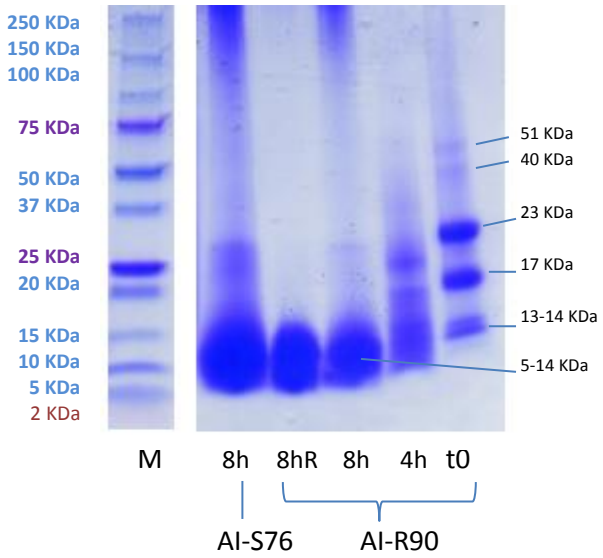


Figure IV-20. Gel d'électrophorèse SDS-PAGE après migration des protéines d'hydrolysats protéiques de riz à partir des matières enrichies en protéines AI-S76 et AI-R90. Solubilisation réalisée en condition non réductrice excepté pour 8hR. La distorsion du gel est prise en compte dans la mesure du front de migration par le logiciel Gel Analyser

L'électrophorèse ne permet pas de décrite précisément le profil de taille et en particulier sur les faibles poids moléculaires, les peptides sous les 5 kDa déterminés en HP-SEC ne sont pas identifiables en électrophorèse. Cette méthode met en avant des différences significatives selon le produit traité et sa nature plus ou moins agrégée. Elle permet d'identifier des bandes caractéristiques de protéines déjà identifiées dans le riz.

4. Conclusion

Les matières végétales issues du riz utilisées dans cette étude ont montré des teneurs en protéines cohérentes de 6,5 % pour la farine blanche à 79 % pour le concentré protéique le plus riche. L'étude de la teneur en polyssacharides a permis premièrement d'identifier les fractions interférant dans la pureté en protéines des concentrés, essentiellement composés d'amidon et de résidus de cellulose et d'hémicelluloses.

Des hydrolyses par couplage cellulase et amylase ont permis d'éliminer partiellement ces composés pour augmenter la teneur en protéines dans le but d'atteindre une pureté en protéines supérieure à 90 % associée à l'appellation isolat protéique. Cet objectif a été atteint à partir du concentré le plus riche en protéines titré préalablement à 79 %, ceci de la petite échelle dans des tubes sous agitation à l'hydrolyse en réacteur agité de l'ordre du demi litre donnant une teneur en protéines à 90 %. A partir du deuxième concentré, il a été possible d'atteindre une teneur en protéines de 76 %. Des essais d'hydrolyse de l'amidon ont permis de récupérer une fraction protéique du même ordre de grandeur à partir de farine blanche. Cependant cela nécessite l'ajout d'une proportion importante d'enzyme vis-à-vis de la fraction protéique ciblée qui est très petite pour la farine.

Le son de riz a une composition plus complexe. Des traitements par enzymes de type cellulolytiques, amylases, phytase n'ont pas permis d'isoler les protéines comme cela a pu être effectué sur d'autres sons de riz dans la littérature (Wang, Hettiarachchy *et al.* 1998). L'approche par hydrolyse à la protéase semble être intéressante sur cette matière puisqu'elle permet de récupérer une fraction protéique avec une pureté de l'ordre de 40 %. Des études complémentaires plus approfondies devraient être initiées sur ce type de matière.

Afin de développer des ingrédients hypoallergéniques, l'hydrolyse des protéines a été effectuée à partir des matières protéiques de riz enrichies et de l'isolat protéique de soja utilisé pour l'étude de l'extraction des isoflavones. La proportion précise de peptides sous les 5000 Da et 3000 Da qui permet de s'assurer d'obtenir un produit hypoallergénique n'est pas connue. L'objectif ici est donc de maximiser cette proportion au travers d'un procédé qui reste cohérent en termes de durée et donc de coûts potentiels de traitement enzymatique. Les protéines de riz sont très peu solubles dans l'eau contrairement aux protéines contenues dans l'isolat protéique de soja. Sur l'isolat protéique de riz produit, une durée de traitement de 4 h permet d'obtenir une majorité de peptides sous les 3000 Da, au-delà de cette durée un gain de 8 % seulement est observé. La récupération seulement des protéines solubles, par séparation solide-liquide, peut être intéressante pour développer un hydrolysat « poussé » contenant environ 70 % de peptides sous 3000 Da et 90 % sous 5000 Da. Cependant cette étape peut entrainer des pertes importantes en protéines de 40 % (bien que potentiellement réutilisables dans un procédé multi-étage et qu'il soit possible d'optimiser cette étape de séparation). Elle peut être envisagée seulement sur une matière peu coûteuse telle que le concentré S63 qui correspond au résidu protéique issu de la production de sirop de glucose de riz après traitement à l'amylase d'une farine brune. Le suivi du degré d'hydrolyse et les analyses par électrophorèse ont confirmé que les deux concentrés protéiques de riz ne sont pas hydrolysés avec la même efficacité. Pour le concentré S63 les protéines sont plus agrégées au départ entrainant leur très faible solubilité. L'étape d'isolement protéique par traitement amylase et cellulase entraine une désagrégation ce qui facilite l'hydrolyse par protéase par la suite. Le degré

d'hydrolyse après 8 h de traitement par protéase reste cependant plus faible d'environ 10 % à partir de cette matière, la présence de sous-unité ou chaine peptidique proche de 25 kDa y est encore visible ce qui n'est pas le cas avec l'hydrolysat issu du concentré R79. Ces travaux posent les bases d'une production d'hydrolysats de protéines de riz potentiellement hypoallergéniques. Des essais in vitro et des études cliniques sont donc envisagés par la suite.

Chapitre V. Rétention des isoflavones sur résine chromatographique à partir d'hydrolysats protéiques de soja

1. Introduction

L'utilisation de résines chromatographiques pour l'élimination des isoflavones a représenté un axe d'étude majeur durant ces travaux de recherche. Le passage de solutions ou suspensions protéiques au travers d'une colonne de résine, sans l'intervention d'une étape d'extraction, a été le verrou technologique principal. Les protéines végétales, et notamment les protéines de soja, ont des poids moléculaires importants et engendrent de forts colmatages. L'objectif de cette étude a consisté à retenir les isoflavones contenues dans un isolat protéique de soja jusqu'à un seuil inférieur à 50 ppm (teneur maximale en isoflavones résiduelles de 50 µg/g dans le produit final sec) à partir d'isolat protéique dont les teneurs en isoflavones varient de 1000 à 1600 µg/g. Une très grande efficacité d'adsorption était donc attendue tout en minimisant les pertes potentielles en protéines.

Ce chapitre décrit premièrement l'étude de l'hydrolyse enzymatique d'isolat protéique de soja par le suivi, comme cela a été fait sur protéines de riz, de différents indicateurs d'hydrolyse (solubilité, pH, degré d'hydrolyse et profils de poids moléculaire) à partir d'une protéase habituellement utilisée pour l'amélioration des propriétés organoleptiques des protéines de soja. Dans ces travaux de thèse, cette hydrolyse a en réalité trois objectifs i) la solubilisation de l'isolat pour le passage au travers de résines chromatographiques, ii) la déstructuration de la matrice protéique afin de libérer potentiellement les isoflavones ou du moins faciliter leur extractabilité et iii) le développement d'un produit hypoallergénique.

Une deuxième partie décrit les résultats d'adsorption d'isoflavones en mode statique à petite échelle à partir d'un hydrolysat dont les conditions de production et de préparation sont définies au préalable. Ils ont permis d'étudier l'influence de l'hydrolyse de la matrice et des paramètres clés tels que le volume traité, le pH et le choix de la résine sur l'adsorption des isoflavones.

Une étude des mécanismes d'adsorption, via la description de la cinétique et des isothermes d'adsorption est présentée toujours à partir de résultats en mode statique.

Dans une dernière partie, l'étude du fractionnement des isoflavones et de la matière protéique en mode dynamique au travers d'un lit fixe de résine est présentée. Il s'agit de décrire les travaux effectués de l'échelle laboratoire, où les paramètres ont été optimisés, jusqu'à l'échelle industrielle pour la production d'un hydrolysat protéique à teneur réduite en isoflavones. Cette partie décrit aussi l'influence de la structure des isoflavones sur leur adsorption et leur recouvrement dans les différentes phases.

2. Production et caractérisation d'un hydrolysat protéique de soja

2.1. Suivi de la solubilisation des protéines après hydolyse par endoprotéase

A partir d'isolat protéique de soja une hydrolyse par endoprotéase (Promod 278MDP) est mise en œuvre selon les recommandations du fournisseur (Chapitre II.7.4). Une hydrolyse sur 8 h, avec ajout de 0,5 % d'enzyme (m/m) soit 350 U/g de produit, a été suivie par prélèvement et dosage de la matière sèche et des protéines solubilisées. La solubilisation des protéines est définie à partir de la quantité de protéines récupérées dans le surnageant ramenée sur la quantité initialement introduite Figure V-1.

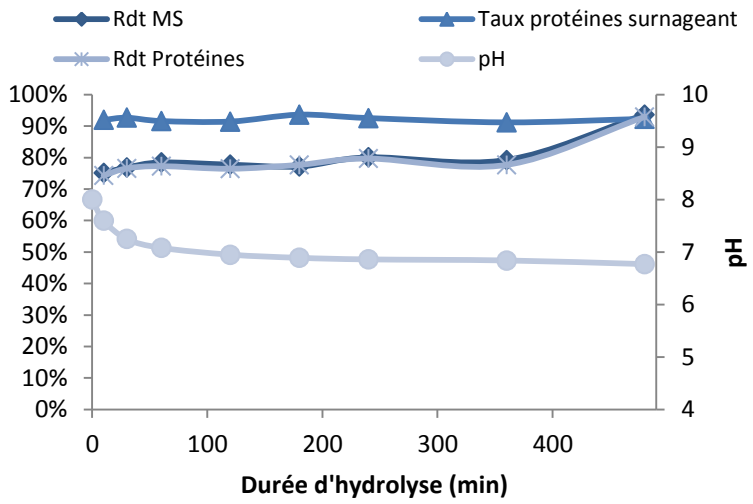


Figure V-1. Solubilisation des protéines de soja par hydrolyse à l'endoprotéase

Malgré un faible impact sur la solubilité, le pH dénote une activité importante de la protéase. La solubilité des protéines augmente sensiblement d'environ 20 %. Le suivi de pH en continu durant l'hydrolyse enzymatique est un indicateur de l'avancement de l'hydrolyse. Cette diminution du pH est dû à la libération favorisée de protons lors du clivage des peptides dans des conditions basiques ou neutres (Spellman, McEvoy *et al.* 2003). Il ne cesse de décroitre durant les 8 heures d'hydrolyse mais un plateau est atteint autour des 3 heures d'hydrolyse et atteint une valeur de 6,7 en fin de réaction.

2.2. Solubilité de l'hydrolysat poussé

Durant des essais préliminaires, l'utilisation de pH inférieurs à 7 engendre des colmatages plus ou moins important indiquant l'importance de travailler dans des conditions basiques favorisant la solubilité des protéines. Cependant, un pH au-delà de 9 n'est pas souhaité compte tenu de l'application visée. Le choix du pH pour le traitement sur résine en mode dynamique a donc été restreint à une gamme relativement étroite de 7 à 9. Ayant fortement impacté la mise au point du système, la solubilité de l'hydrolysat de protéine de soja est présentée ci-après (Figure V-2).

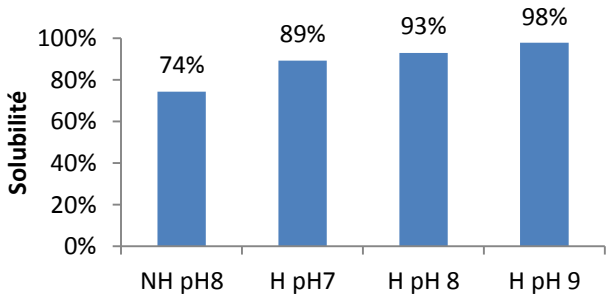


Figure V-2. Influence de l'hydrolyse et du pH sur la solubilité de la matière protéique de soja. A gauche produit non hydrolysé à pH 8, les trois autres sont des hydrolysats de protéine de soja conditionnés sous trois pH

L'hydrolyse sur isolat protéique, montre une solubilité accrue de 19 % par rapport au produit initial pour un pH de 8 (calcul de la solubilité Chapitre II.6.4). Malgré l'hydrolyse relativement poussée des protéines, le pH reste influant sur leur solubilité, un pH de 9 donnant une solubilité maximale. Le passage de l'hydrolysat avec un pH compris entre 7 et 8 a été possible par l'utilisation d'un système clos sous pression, il s'est avéré cependant difficile à contrôler à l'usure. En revanche, un conditionnement sous pH 9 s'est révélé beaucoup plus performant et n'a pas montré de perte de charge liée au colmatage même avec un système gravimétrique non clos et sans pression à l'entrée de la colonne. Ce pH reste la valeur maximale pour l'application alimentaire visée. Pour des pH supérieurs, la formation de composés toxiques et la dégradation des acides aminés est possible (Friedman, Levin *et al.* 1984). En outre, sans hydrolyse, un pH de 9 ne permet pas d'atteindre ces niveaux de solubilité. Ces premiers essais ont permis ainsi de lever un verrou technologique important nécessaire au traitement de solution protéique sur colonne de résine.

2.3. Suivi du degré d'hydrolyse et profil de poids moléculaire

Concernant le degré d'hydrolyse, il évolue peu (de 2 à 3 %) et est stable au-delà de 4 h (Figure IV-3). Cette évolution est similaire à la première phase d'hydrolyse à l'endoprotéase mise en évidence sur les protéines de riz (Chapitre IV.3.3). Afin d'atteindre de forts degrés d'hydrolyse, l'utilisation d'exopeptidase semble indispensable sur les deux systèmes. L'utilisation d'une telle enzyme devrait être approfondie.

L'analyse de la matière première montre un degré d'hydrolyse de 9,9 % ce qui est déjà relativement haut montrant que les procédés de productions de cet isolat protéique dénaturent fortement les protéines de soja natives (Glycinine et β-conglycinine). L'étape de solubilisation de 30 min avant ajout de protéase suivie d'une désactivation à 85 °C durant 15 min correspond au premier point de la courbe (Figure V-3). Elles engendrent un gain de 2,5 % de degré d'hydolyse.

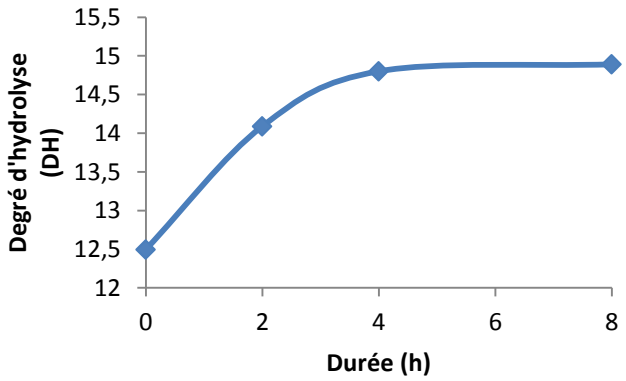


Figure V-3. Suivi de l'hydrolyse des protéines de soja par Promod 278MDP

Le degré d'hydrolyse n'est cependant pas représentatif du profil de poids moléculaire surtout lors de l'utilisation de peptidase qui hydrolyse les peptides seulement en bout de chaine il est donc important de croiser plusieurs indicateurs.

2.4. Profil de poids moléculaire : influence de l'hydrolyse

L'analyse par HP-SEC sur les hydrolysats de soja montre que la fraction correspondante aux plus faibles poids moléculaires (pic principal) augmente significativement en fonction de la durée d'hydrolyse sur isolat protéique de soja (Figure V-4), elle est cependant peu marquée comparativement aux traitements effectués sur protéines de riz (Chapitre IV.3.4.3).

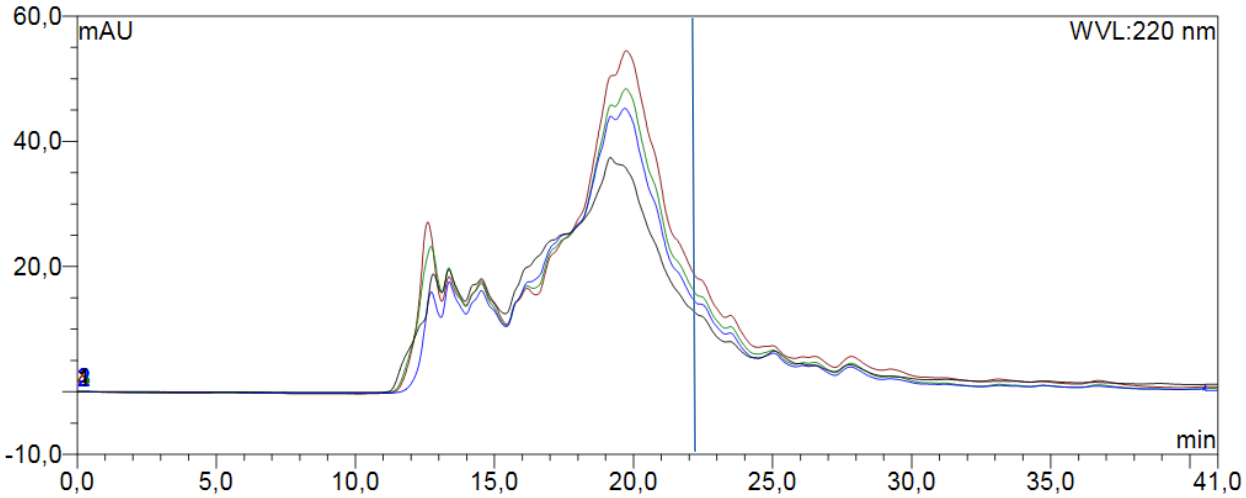


Figure V-4. Chromatogrammes obtenus lors des analyses de profil de poids moléculaire en HP-SEC des hydrolysats protéiques produits à partir d'isolat protéique de soja, par solubilisation au tampon phosphate SDS 2%. En noir la solution à t0, hydrolyse après 2h en bleu, 4h en marron, 6h en rose. Le trait bleu situe la sortie du standard de plus faible poids moléculaire la vitamine B12 à 1355 Da

Une augmentation de la proportion en peptides de tailles inférieures à 5 kDa est constatée passant de 14,3 % à 37 % en proportion relative (Figure V-5). Le premier traitement (t0) correspond à une solubilisation des protéines durant 30 minutes à pH 8 et 50 °C puis de l'ajout d'enzyme directement suivi d'une désactivation à 85 °C pendant 15 °C. Ce traitement induit une diminution de la taille des protéines comprises entre 10 kDa et 60 kDa. Durant les deux premières heures de l'hydrolyse, la seule évolution significative se situe dans les fractions de 3 kDa à 5 kDa. Les petites fractions sous 3 kDa ne sont pas modifiées significativement, ce qui est attendu du fait de l'activité endoprotéase qui rompt les liaisons à l'intérieur des chaines polypeptidiques et non pas à leur extrémité. En effet on retrouve les acides aminés dans cette fraction. Au-delà de 2 h d'hydrolyse la proportion de faibles poids moléculaires reste constante comme si l'hydrolyse était stoppée. Des phénomènes d'inhibition ou d'autolyse pourraient expliquer ce phénomène.

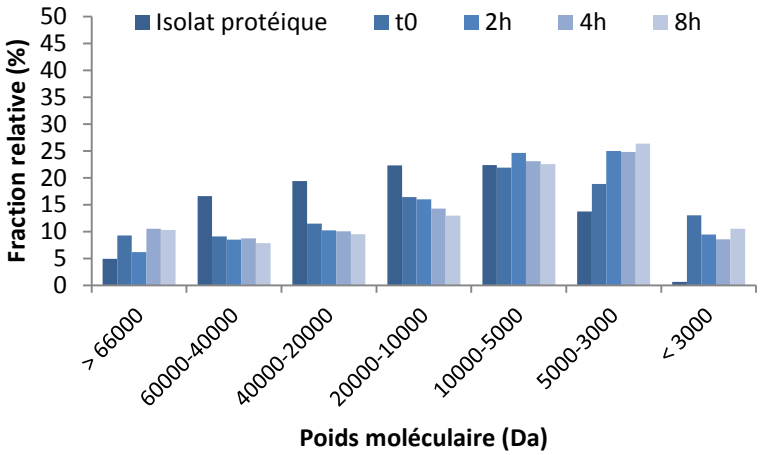


Figure V-5. Evolution du profil de poids moléculaire par hydrolyse enzymatique sur isolat protéique de soja. SPI O pour la matière initiale ; t0 pour l'ajout d'enzyme suivi d'une désactivation de 15 min à 85 °C ; hydrolyses effectuées de 2 à 8 h

La solubilisation d'hydrolysat protéique de soja pour le développement d'ingrédients hypoallergéniques doit être améliorée. L'utilisation d'exopeptidase notamment pourrait être une voie intéressante d'étude pour hydrolyser les protéines qui ont des masses moléculaires supérieures à 5000 Da. Toutefois, l'hydrolysat produit par le traitement à l'endoprotéase a facilité grandement le passage sur colonne de résine ce qui a permis l'étude de la rétention des isoflavones en mode dynamique sur un système industrialisable. De plus, l'utilisation d'exopeptidase à ce stade entrainerait la formation d'acides aminés qui se rapprocheraient de la taille des isoflavones et de leur polarité ce qui pourrait entrainer plus de pertes lors de l'adsorption sur résine.

3. Rétention des isoflavones à partir d'hydrolysats de protéine de soja en mode statique

3.1. Influence de la nature de l'hydrolyse sur la capacité de rétention et le bilan de récupération dans les fractions

Afin de tester la possibilité de retenir efficacement les isoflavones contenues dans l'isolat protéique hydrolysé ou non, quatre traitements d'hydrolyse ont été évalués en tant que préparation de produit avant rétention des isoflavones sur résine chromatographique à partir de 50 g de produit. Les traitements suivants ont été réalisés : une hydrolyse acide poussée (nuit) ; une hydrolyse acide partielle (2 h) ; une hydrolyse par protéase (2 h avec 1 % de protéase m/m) ; et une combinaison d'une hydrolyse par protéase suivie d'une hydrolyse acide partielle (Chapitre II.7.3). Les hydrolysats produits ont été mis en contact dans un système agité pendant une heure avec un rapport solution/résine de 3 (soit 3 BV « Bed Volume »). Après contact, la solution est récupérée puis filtrée sur toile de nylon, la résine est ensuite rincée par l'équivalent de 1 BV d'eau déminéralisée puis éluée par l'intermédiaire de 2 BV d'éthanol 96 %. Les solutions sont analysées par HPLC pour la quantification des isoflavones résiduelles dans le filtrat, le rinçage et leur récupération dans l'éluat.

Les résultats montrent premièrement que les niveaux d'adsorption sont importants avec plus de 95 % des isoflavones retenues par la résine. L'hydrolyse a peu d'impact sur la capacité d'adsorption de la résine vis-à-vis des isoflavones présentes dans l'isolat en suspension ou les hydrolysats (Tableau V-1). Ceci permettra par la suite de pouvoir utiliser des hydrolysats protéiques pour l'étude de la rétention des isoflavones en mode dynamique (colonne). De plus, les traitements par protéases induisent une légère amélioration du résultat final (teneur en isoflavones résiduelles plus basse).

Tableau V-1. Influence de la nature de l'hydrolyse sur la capacité d'adsorption avec trois volumes équivalents de résine mis en œuvre sur XAD7HP

	IF sur MS (µg/g)	Cp (mg IF/g)
Initial	1606	
Acide forte	126	0,211
Acide partielle	121	0,212
Protéase	62	0,220
Protéase et acide	41	0,223
Sans hydrolyse	97	0,215

Le rendement en matière sèche dans le filtrat (produit final d'intérêt) est de 70 % pour l'ensemble des traitements (Tableau V-2) indiquant que le rendement en protéines serait peu influencé par la nature de l'hydrolyse (la matière sèche étant constituée de plus de 90 % de protéines). La proportion en matière protéique sèche dans les fractions de rinçage (qui pourrait être une fraction d'intérêt ou à éliminer) atteint environ 8 % ce qui montre qu'une partie non négligeable des protéines reste retenue par la résine. L'éluat conduit avec de l'éthanol à 96 % montre une récupération partielle de la matière sèche, au total près de 15 % reste retenue par la résine après la filtration, rinçage et élution. Le bilan en

isoflavones est de 60 % maximum probablement du fait que lors de l'utilisation de résine neuve une proportion importante de soluté ne soit pas récupérable dû à des interactions irréversibles ou pseudo irréversibles (durée de désorption très longue). Aussi, l'élution reste probablement à améliorer par rapport à la proportion d'éthanol et le volume d'éluat. De plus, ce bilan semble très variable selon la condition imposée à la solution de départ. Le bilan en matière sèche est moins variable et autour de 85 %. Ce résultat montre que malgré le rinçage et l'élution, une partie non négligeable des protéines reste adsorbée par la résine comme cela a été observé avec les isoflavones.

Tableau V-2. Récupération de la matière séchée totale et des isoflavones dans les trois fractions

	Rendement en MS (%)				**Rendement en IF (%)**			
	Filtrat	**Eluat**	**Rinçage**	**Bilan**	**Filtrat**	**Eluat**	**Rinçage**	**Bilan**
Acide forte	71	5	7	82	9,8	27,8	1,1	38,6
Acide douce	70	6	9	85	9,9	41,8	1,2	52,9
Protéase	71	6	8	85	4,2	39,2	0,7	44,1
Protéase et acide	72	6	9	87	4,4	55,0	0,7	60,0
Sans hydrolyse	70	4	7	81	7,8	50,3	1,1	59,2

Ces premiers essais ont pu montrer la possibilité d'adsorber les isoflavones contenues dans un hydrolysat protéique de soja en récupérant un minimum de 70 % de matière sèche dans la fraction d'intérêt par l'utilisation d'une résine d'adsorption modèle XAD7HP. Bien que l'hydrolyse entraine peu d'amélioration de la capacité d'adsorption, elle est par la suite utilisée dans le but de pouvoir passer la solution au travers d'une résine.

3.2. Comparaison d'efficacité entre différentes résines

Plusieurs résines anioniques et adsorbantes, dont la nature du polymère de base est différente, ont été testées sur deux types de traitements obtenus par protéase. Une hydrolyse partielle de 2 h et une hydrolyse poussée de 14 h (sur les mêmes bases expérimentales que présenté en section 2.1. à 2.4.).

Tableau V-3. Efficacité des résines après mise en contact sur 14h de 8BV de solution protéique de soja issue de 2h et 14h d'hydrolyse par protéase sur isolat protéiques

		Taux d'adsorption (%)		**Teneur IF filtrat (µg/g)**		**Cp (mg IF/ g résine)**	
Hydrolysat initial				1606			
		H2	H14	H2	H14	H2	H14
Adsorbantes	XAD7HP	98%	98%	30	26	0,563	0,569
	FPX66	97%	97%	56	44	0,554	0,562
	DIAION HP20	96%	20%	62	1280	0,551	0,117
Anioniques	FPA90Cl	94%	90%	91	156	0,541	0,522
	FPA91Cl	97%	98%	54	38	0,555	0,564
	Amb 900OH	ND	93%	ND	120	ND	0,535
Cationique	HP336	ND	13%	ND	1401	ND	0,074

Après mise en contact par agitation magnétique sur une longue durée, les filtrats ont été analysés par HPLC-UV, les puretés et capacités d'adsorption sont présentées dans le Tableau V-3. Les taux d'adsorption obtenus sont compris entre 93 % et 98 %, pour une mise en contact de 8 BV équivalents (solution à 47,5g/L de matière sèche et 76 mg/L d'isoflavones). Les puretés finales s'apparentent à l'objectif visé d'atteindre un seuil de 50 µg/g. Les capacités d'adsorption obtenues sont généralement plus élevées pour les résines anioniques et adsorbantes (> 0,500 mg/g) que lors des essais précédents effectués à partir de 3 BV (Tableau V-1). L'échange d'anions représente avec l'adsorption un mécanisme intéressant pour l'élimination des isoflavones contrairement à l'échange cationique testé avec la résine HP336, qui montre cependant une légère adsorption due probablement à sa structure polymérique plutôt qu'à sa fonction cationique. Les capacités d'adsorption sont équivalentes lorsqu'une hydrolyse de 2 h ou de 14 h est effectuée avant rétention, indiquant que l'hydrolyse poussée de l'isolat protéique n'entraine pas d'amélioration significative sur la rétention des isoflavones. La résine DIAION HP20 s'est révélée plus sensible à l'agitation magnétique, un broyage de cette résine a été observé lors de la deuxième série expérimentale entrainant probablement un relargage important des isoflavones. Des réactions secondaires destructrices peuvent en effet avoir lieu dans ce type de système batch ce qui rend l'étude parfois difficile (Limousin, Gaudet *et al.* 2007) cela expliquerait la faible valeur de capacité de fixation.

La FPX66 possède une surface spécifique beaucoup plus importante et une plus grande porosité que celle de la XAD7HP pourtant elle montre une efficacité plus faible (les résines et leurs caractéristiques sont mentionnées Chapitre II.5.1). La différence entre ces deux résines est probablement due à leur nature chimique plutôt qu'à leurs caractéristiques physiques. La FPX66 étant constituée d'un polymère aromatique alors que la XAD7HP est constituée d'un copolymère d'acrylique aliphatique. Cette nature partiellement aliphatique permettrait de favoriser les interactions hydrophobes ce qui pourrait entrainer une meilleure adsorption de composés faiblement polaires présents dans une solution aqueuse. La FPA91Cl est une résine anionique forte, c'est-à-dire que la groupement fonctionnel qui est responsable de l'échange d'ions est une amine quaternaire, comme la FPA90Cl, mais elle est dite de type 2 car une fonction hydroxyle est additionnée sur le groupement fonctionnel, ce qui la rend moins forte. La FPA91Cl et l'Ambersep 900OH ont des capacités plus élevées en comparaison à la FPA90Cl. Les résines donnant les meilleurs résultats par type d'adsorbant ont été mises en contact avec des volumes de 50 BV afin de se rapprocher de conditions saturantes (Tableau V-4).

Tableau V-4. Pureté du filtrat obtenu avec 50 BV et après 14h de fixation selon la résine utilisée

		Teneur IF (µg/g)	Taux d'adsorption (%)	Cp (mg IF/ g résine)
Adsorbantes	XAD7HP	1242	23	0,864
Anioniques	FPA91Cl	1124	30	1,145
	Amb 900-OH	1004	37	1,430

Ce résultat montre que les résines anioniques ont des capacités maximales probablement plus élevées. Pour les deux types de résine, le ratio de volume traité semble être limitant, il est donc important d'étudier la relation entre la quantité traitée et la pureté en isoflavones dans le filtrat final.

3.3. Influence du pH sur résine adsorbante et anionique

Les teneurs les plus basses en isoflavones ont été obtenues avec la XAD7HP et les deux résines anioniques FPA91Cl et Ambersep 900OH. Ces dernières ont donc une capacité maximale d'adsorption plus importante. L'influence du pH sur la capacité de rétention de ces résines a alors été étudiée. Les résultats montrent que la rétention des isoflavones sur la résine adsorbante ne dépend pas du pH (Tableau V-5).

Tableau V-5. Teneur en isoflavones dans les filtrats en fonction du pH imposé avec un volume équivalent de 3BV

	pH	Teneur IF (µg/g)	Cp (mg IF/ g résine)
Initial		1606	
XAD7HP	2	20	0,226
	4,5	24	0,225
	7	25	0,225
	8	28	0,225
Amb 900-OH	2	0	0,229
	4,5	22	0,226
	7	24	0,225
	8	48	0,222

Avec l'Ambersep 900OH, il aparait que les pH acides favorisent la rétention des isoflavones. A pH basique, les extrémités protéiques sont chargées négativement ce qui pourrait entrainer une rétention plus forte de certaines protéines sur la résine anionique entrainant probablement une compétition entre peptides chargés et isoflavones. L'essai de rétention à pH 2 entraine une absence de détection des isoflavones dans le filtrat. Cependant il peut être cause de dégradations à la fois pour les protéines et est non adapté à une application alimentaire. Le pH le plus acide retenu, compte tenu des contraintes d'applications alimentaires, est de 4,5. Ainsi, chaque résine anionique a été testée avec 8 et 16 BV d'hydrolysat à pH 4,5 (résine et hydrolysat conditionnés) afin aussi de rester dans des volumes traités suffisamment conséquents mais en dessous des limites démontrées précédemment (Tableau V-6)

Tableau V-6. Teneur en isoflavones obtenu dans les filtrats avec pH 4,5 imposé et selon deux ratios volume/résine

	BV	Teneur IF (µg/g)	Cp (mg/g)
Initial		1606	
FPA90Cl	8	37	0,596
	16	25	1,201
FPA91Cl	8	15	0,605
	16	15	1,209
Ambersep 900OH	8	30	0,599
	16	47	1,185

Ces résultats montrent que la résine FPA91Cl est plus efficace avec une capacité d'adsorption de 1,209 mg/g, et surtout qu'elle permet d'atteindre une pureté de 15 ppm (µg/g) sur base sèche. Les autres résines ont une capacité similaire mais conduisent à des puretés plus hautes (> 20 µg/g). Travailler à pH 4,5 a tendance à rapprocher l'efficacité des résines FPA91Cl et FPA90 Cl. Dans ces conditions, les deux résines sont chargées de la même façon.

Finalement, ces essais montrent la possibilité de produire un hydrolysat appauvri en isoflavones avec une pureté inférieure à 50 µg/g à partir d'un volume traité de 8 à 16 volumes équivalents de résine.

3.4. Influence du volume traité sur la capacité d'adsorption

Le volume d'hydrolysat traité influe sur la capacité d'adsorption jusqu'à une capacité maximale (Figure V-6). Pour les trois résines testées, la Cp évolue linéairement puis atteint un plateau. Celle-ci se situe de 1,3 à 1,4 mg/g (mg d'isoflavones par g de résine) pour des volumes traités de 16 et 20 BV.

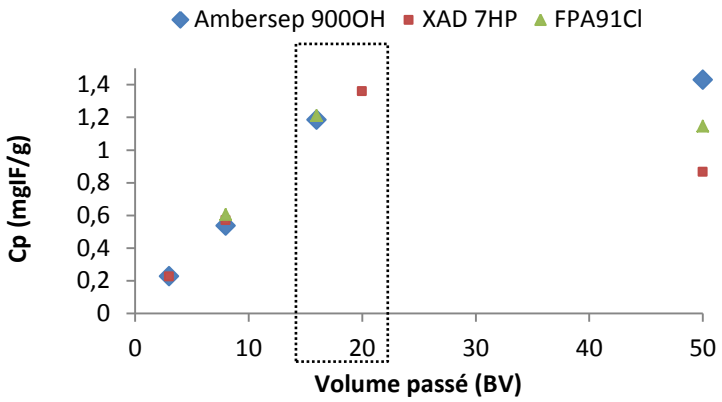


Figure V-6. Influence du volume d'hydrolysat traité sur la capacité d'adsorption des résines d'adsorption et anioniques

Pour un passage sur colonne on peut donc s'attendre à pouvoir traiter un volume inférieur à 20 BV maximum pour un hydrolysat de protéines de soja de ce type, issu d'une hydrolyse à la protéase et ayant une teneur en matière sèche de 47,5 g/L.

4. Mécanisme de rétention des isoflavones sur résine adsorbante XAD7HP

Les mécanismes d'adsorption sont fréquemment décrits au travers de trois niveaux mécanistiques. Le premier correspond aux isothermes d'adsorption pour déterminer l'équilibre d'adsorption avec l'influence de la capacité d'adsorption de soluté sur la résine en fonction de la concentration de soluté à l'équilibre. Des modèles cinétiques permettent de définir ensuite l'étape limitante du processus d'adsorption (diffusion au travers du film ou intra-particulaire). La réaction d'adsorption dite de surface est enfin décrite par d'autres modèles cinétiques elle permet de vérifier le type d'interaction entre soluté et adsorbant mais aussi de définir des constantes cinétiques permettant d'effectuer des comparaisons entre résines ou molécules d'intérêt.

4.1.1. Suivi cinétique des formes détectées d'isoflavones

Sur résine d'adsorption choisie XAD7HP, le comportement cinétique est caractéristique d'un échange rapide (Figure V-7), La concentration en isoflavones quel que soit le type de formes chute dans les premières minutes de la mise en contact, ainsi en 30 minutes la concentration en isoflavones diminue de 84 %.

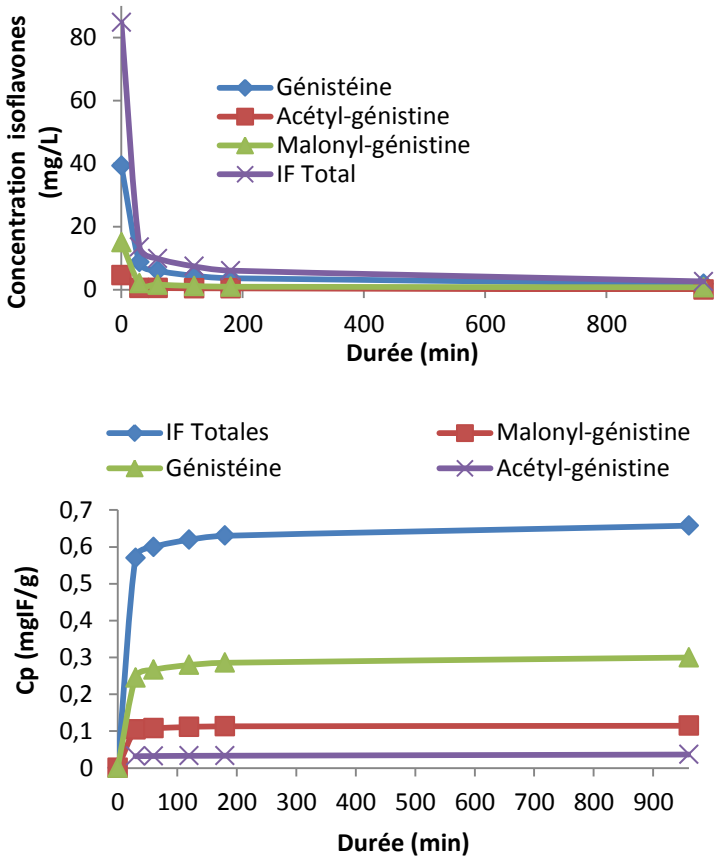


Figure V-7. Cinétique d'adsorption des isoflavones sur XAD7HP pour un volume traité de 8BV

La capacité d'adsorption (Cp ou qt) évolue de la même façon quelle que soit la forme suivie (Figure V-7), les formes malonyl-daidzine et acétyl-daidzine ne sont plus détectées dès 30 minutes, leur cinétique d'adsorption n'est pas présentée.

4.1.2. Description de la diffusion

Le processus d'adsorption a lieu en cinq étapes comme décrit dans la partie bibliographique, dont trois sont régies par le taux de diffusion moléculaire :

i) Transport du soluté à travers le film de la couche limite jusqu'à la surface extérieure de la particule d'adsorbant

ii) Diffusion du soluté au travers des pores, de la surface externe de la particule à la surface interne

iii) Transport du soluté le long de la surface de la paroi des pores. La diffusion dans le film et la diffusion intra particulaire (i et ii) sont des étapes considérées souvent comme les plus limitantes

Dans de nombreux cas, le modèle de Weber-Morris décrit bien la diffusion intra particulaire avec la relation suivante :

$$q_t = k_{int} t^{1/2}$$

où k_{int} est la constante du taux de diffusion intra particulaire et q_t la capacité d'adsorption en fonction du temps

Ce modèle a été appliqué sur les données cinétiques et ne les décrit pas correctement. La droite de corrélation donnerait une pente qui représente la constante (Figure V-8).

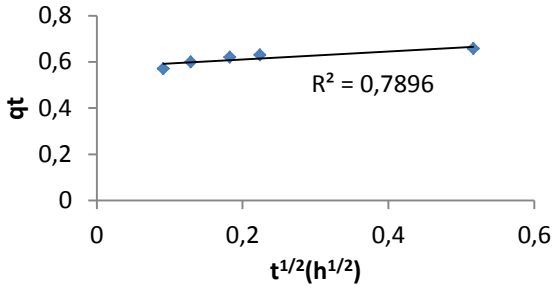


Figure V-8. Corrélation entre les points expérimentaux et le modèle Weber-Morris de diffusion intra-particulaire sur XAD7HP

Si cette corrélation est bien linéaire la diffusion intra-particulaire est l'étape limitante du processus d'adsorption. Dans le système proposé ici, l'adsorption des isoflavones sur résine XAD7HP, cette étape n'apparaît pas comme étant limitante puisque le modèle ne décrit pas correctement les résultats expérimentaux. Cependant, cette relation peut être linéaire sur plusieurs parties distinctes de la courbe ce qui a déjà été montré sur un système isoflavones de soja/charbon actif (Figure V-9).

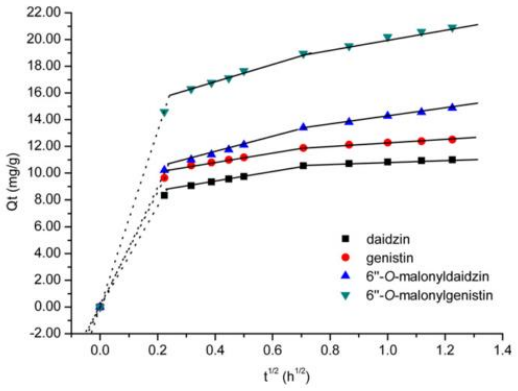


Figure V-9. Diffusion intra-particulaire de Weber-Morris pour l'adsorption des isoflavones d'après (Shi, Kong et al. 2013)

Parmi les trois modèles de diffusion testés, le modèle dit de Boyd semble mieux décrire la diffusion (Tableau V-7), en particulier pour la forme malonyl-génistine. Cependant, la courbe décrivant la relation entre Bt et t ne passe pas par l'ordonnée à l'origine (Figure V-10).

Tableau V-7. Corrélation de la cinétique d'adsorption des isoflavones sur XAD7HP avec les modèles décrivant la diffusion

Isoflavone	Modèles de diffusion		
	Transfert de masse	Weber-Morris	Boyd
	R^2	R^2	R^2
IF Totales	70,5%	79.0%	96.9%
M-G	80,8%	63.6%	99.8%
A-G	49,1%	99.8%	95.4%
G	77,6%	71.7%	96.2%
D	60,7%	94.5%	97.7%

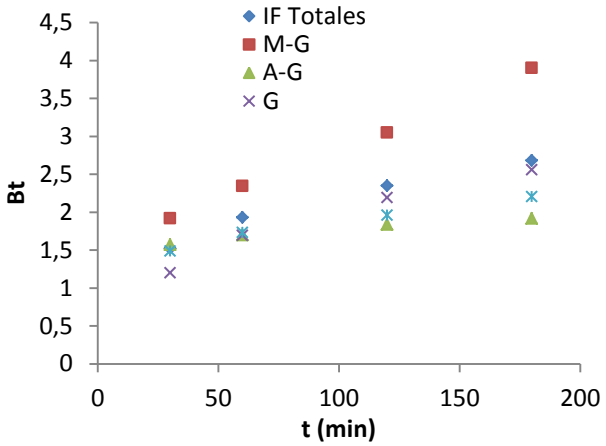


Figure V-10. Corrélation de la cinétique d'adsorption des isoflavones sur XAD7HP avec le modèle de diffusion Boyd sur XAD7HP

Ceci indiquerait que la cinétique d'adsorption est gouvernée par la diffusion au travers du film (ou couche limite) entourant la particule d'adsorbant ou par la réaction d'adsorption et non pas par la diffusion particulaire (Viegas, Campinas *et al.* 2014) comme cela peut être parfois le cas (Hameed, Tan *et al.* 2008). Ceci pourrait expliquer pourquoi le modèle intra-particulaire de Weber-Morris ne décrit pas correctement la cinétique (excepté pour la forme acétyle qui est toutefois très minoritaire). Quant à la troisième étape, il s'agit de la réaction d'adsorption en tant que telle, elle est souvent considérée comme rapide et non limitante.

4.1.3. Description de la réaction d'adsorption

L'évolution cinétique de l'adsorption des isoflavones contenues dans l'hydrolysat protéique de soja sur XAD7HP a ensuite été corrélée aux modèles qui permettent de décrire la réaction d'adsorption (Chapitre II.5.3).

D'après les résultats, cette relation évolue selon le modèle de pseudo second ordre (Figure V-11). Ce modèle est connu pour s'adapter à de très nombreux cas et son explication théorique n'est pas aboutie. Cette cinétique de pseudo second ordre montrerait que la chimisorption gouverne la réaction d'adsorption ce qui est fréquemment avancé dans d'autres études (Hameed, Tan *et al.* 2008). Cependant une étude thermodynamique devrait être effectuée afin de déterminer si la réaction d'adsorption fait intervenir des forces de haute énergie (chimisorption) ou de basse énergie (physisorption) car il est possible que le modèle de pseudo second ordre décrive correctement le modèle alors que la réaction d'adsorption est de type physisorption (Hameed, Tan *et al.* 2008). Cette cinétique d'adsorption démontre cependant que le soluté est adsorbé *via* une double occupation de site d'adsorption (Rudzinski, Plazinski 2006; Kammerer, Carle *et al.* 2010). Il permet surtout de pouvoir comparer les constantes de vitesse cinétiques selon plusieurs conditions ou solutés.

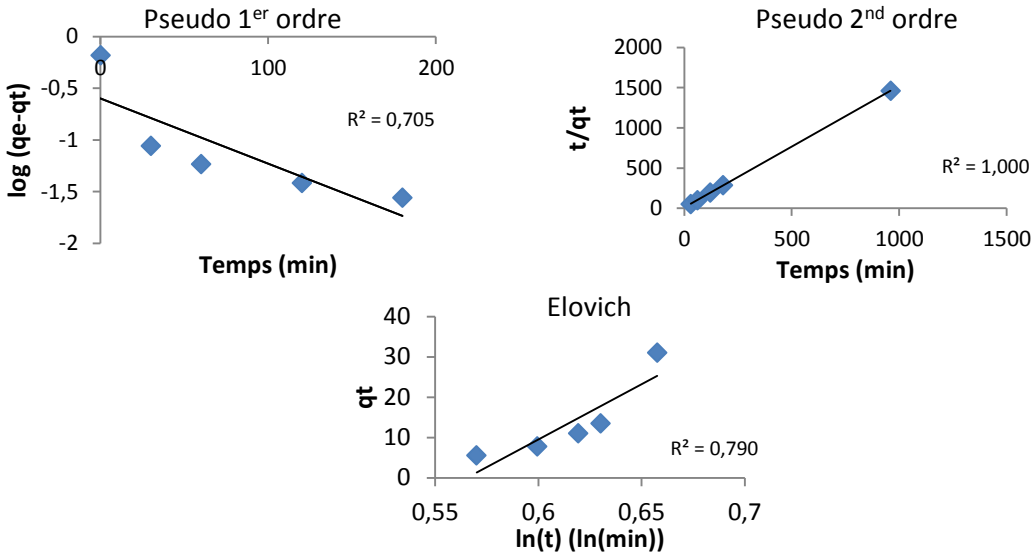


Figure V-11. Corrélation de la cinétique d'adsorption des isoflavones sur XAD7HP avec les modèles cinétiques de réaction d'adsorption couramment utilisés

Le modèle de pseudo second ordre a déjà été observé sur cette même résine avec le suivi de polyphénols totaux et d'acide phénolique issu de *Rabdosia serra (Lin, Zhao et al. 2012)* et aussi sur les isoflavones de soja à partir de mélasse éthanolique sur charbon actif et chitosan (Shi, Kong *et al.* 2013; Liu, Wu *et al.* 2014). Cependant ces auteurs ne présentent pas les résultats obtenus à partir des 4 types de structures d'isoflavones communément retrouvées dans le soja (aglycones, glucosides, acétyles, malonyles). Seulement les formes aglycones, après hydrolyse acide des formes conjuguées, sont suivies.

Concernant les formes détectées en quantité significative, le modèle de pseudo 2nd ordre s'applique parfaitement pour l'ensemble des isoflavones (Tableau V-8).

Tableau V-8. Corrélation des cinétiques avec les modèles décrivant la réaction d'adsorption

	Modèles de réaction d'adsorption								
Isoflavone	**Pseudo 1er ordre**			**Pseudo 2nd ordre**			**Elovich**		
	R^2	Kp1	qe	R^2	Kp2	qe	R^2	α	A
IF Totales	70,5%	0,015	0,549	100,0%	0,215	0,662	94,8%	0,0244	2,70E+10
M-G	80,8%	0,021	0,249	100,0%	2,487	0,115	84,9%	0,0029	6,83E+16
A-G	49,0%	0,010	0,152	100,0%	2,393	0,037	93,5%	0,0013	4,27E+11
G	77,6%	0,015	0,420	100,0%	0,375	0,302	90,4%	0,0151	4,07E+07
D	60,7%	0,012	0,270	100,0%	0,787	0,130	99,8%	0,0051	2,08E+10

La valeur des constantes de vitesse Kp des formes conjuguées (malonyles ou acétyles) est plus haute que celle des formes aglycones ce qui est révélateur d'une réaction d'adsorption plus rapide. Elles ont des qe plus faibles indiquant que la capacité d'adsorption à l'équilibre est plus limitée pour ces formes. Le modèle d'Elovich semble moins adapté pour la forme complexe malonyles et décrit mieux la réaction dans le cas des formes réduites.

4.1.4. Isotherme d'adsorption

Afin de définir le type d'adsorption qui est mis en place lors de la mise en contact entre la résine XAD7HP et la solution protéique, des essais de fixation ont été réalisés avec différentes concentrations. Il apparait que plus la solution est concentrée plus la quantité d'isoflavones fixée augmente. Cette augmentation est linéaire et n'est donc pas décrite par les modèles de Langmuir et Freundlich (Figure V-12 à Figure V-14).

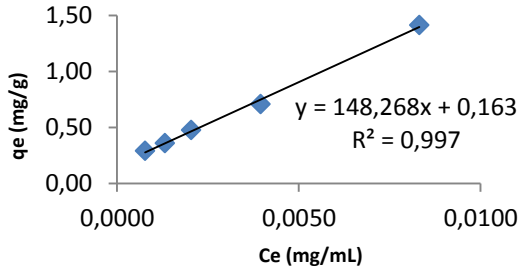


Figure V-12. Isotherme d'adsorption des isoflavones

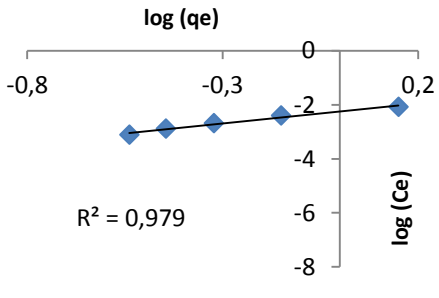


Figure V-13. Corrélation avec le modèle Freundlich.

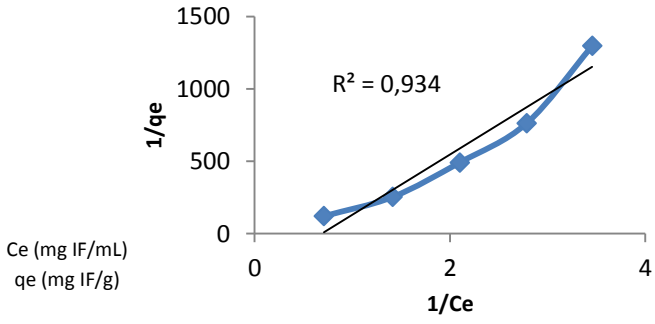


Figure V-14. Corrélation avec le modèle Langmuir

Une très bonne corrélation est associée avec le modèle de Henry. Ce modèle à un seul paramètre est décrit par l'équation suivante : $q_e = k_H C_e$ où la relation entre la capacité d'adsorption et la concentration du soluté (à l'équilibre) est régie par le facteur proportionnel ou constante de Henry k_H qui est de 147,72 (calculé ici expérimentalement pour l'adsorption des isoflavones totale). Il est souvent observé lors de l'utilisation de solutions peu concentrées (Kammerer, Carle *et al.* 2010) ce qui est le cas dans le système étudié ici car aucune étape d'extraction, donc enrichissement préalable de soluté, n'est mis en œuvre. Ce modèle suppose que les sites d'adsorption sont identiques et que les composés adsorbés n'ont pas d'intéraction entre eux.

Le modèle de Freundlich décrit partiellement l'isotherme obtenu ce qui signifierait la présence d'une adsorption de type monocouche mais aussi celle de sites d'adsorption hétérogènes ce qui est contradictoire avec le modèle Henry. Le modèle linéaire peut en réalité être un Langmuir qui devient linéaire avec l'utilisation de solution diluée.

5. Fractionnement des isoflavones et des protéines de soja sur colonne chromatographique

La mise en place d'un procédé sur lit fixe, au travers d'une colonne requiert l'étude de la concentration en fonction du temps d'écoulement ou du volume appelée « courbe de percée » ou « breakthrough curve ». La définition d'un modèle pour décrire précisément le comportement dynamique de l'adsorption est difficile car le processus d'adsorption ne se déroule pas à l'état d'équilibre du fait que la concentration du soluté change le long de la colonne de résine.

La méthodologie employée durant ces travaux a été d'effectuer des essais pas à pas en commençant par une concentration fixe compatible avec l'application visée. Cette concentration doit permettre le passage sur lit de résine avec le moins de colmatage possible, tout en évitant de trop lourdes opérations de concentration du filtrat (avant une étape de séchage de type atomisation). Ainsi une concentration à 50 g/L a été choisie. Sur la base d'un hydrolysat produit par endoprotéase avec 8 h de traitement (comme décrit Chapitre II.7.4) des essais de pH ont été premièrement testés. Après quoi, l'influence de la capacité de traitement (volume traité) sur la concentration en isoflavones dans le filtrat protéique a été suivie.

5.1. Influence du débit

Des premiers essais ont été effectués pour déterminer une zone de travail adaptée à l'obtention d'un hydrolysat protéique appauvri en isoflavones sous la teneur seuil de 50 µg/g (hydrolyse partielle de 2 h à l'endoprotéase puis conditionnement à pH 8, le volume traité est de 4 BV). Les résultats montrent que le débit a une forte influence sur la pureté du filtrat produit, donc sur la rétention des isoflavones. Il est donc souhaitable de travailler avec des débits relativement faibles autour de 2 BV/h (Figure V-15).

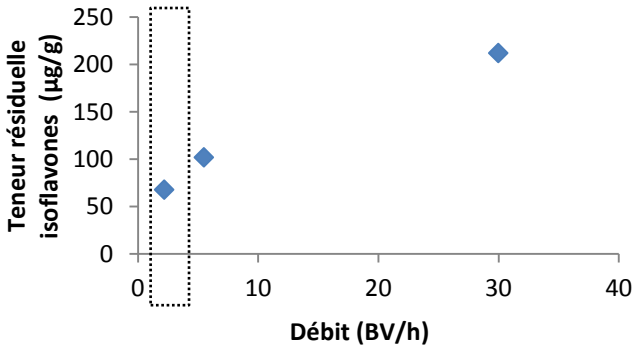


Figure V-15. Influence du débit imposé au système sur l'adsorption des isoflavones de soja dans un système fermé à partir d'un hydrolysat de protéine de soja

5.2. Influence du choix de la résine sur la récupération de la fraction protéique et la pureté en isoflavones du filtrat obtenu

Des essais de percolation ont été conduits avec un hydrolysat obtenu après 8 h d'hydrolyse avec une concentration de 45 g/L et conditionné à pH 9 afin d'éviter les colmatages (comme cela est décrit section 2.2. de ce chapitre) et à partir des résines FPA91Cl et XAD7HP précédemment mises en avant pour leur efficacité (section 3.2.). Ce conditionnement a favorisé la solubilisation des protéines et permis d'effectuer les essais sans système pressurisé. Le suivi de la matière sèche dans le filtrat en sortie de colonne montre que l'utilisation d'une résine anionique FPA91Cl a le désavantage de retenir plus fortement les protéines entrainant une perte importante de produit (Figure V-16). Les protéines étant chargées négativement dans les conditions basiques, leur rétention sur résine anionique est importante.

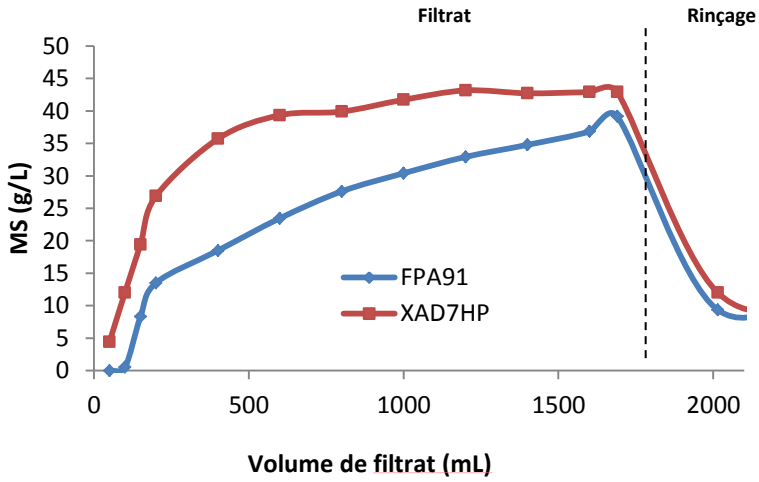


Figure V-16. Suivi de la matière sèche en sortie de colonne sur lit fixe de 200 mL en fonction du type de résine choisi à partir d'un hydrolysat content 45 g/L de matière sèche

Les fractions de rinçage à l'eau ont montré peu de différences entre les résines concernant ce recouvrement en matière sèche.

Les isoflavones résiduelles dans le filtrat ont aussi été analysées. La résine FPA91Cl présente une meilleure efficacité en termes de pureté finale en isoflavones comme cela était le cas en mini réacteur agité en mode statique. Cependant, le rendement en matière sèche est trop faible avec l'utilisation de cette résine anionique bien que le résultat sur la pureté en isoflavones soit conforme à l'objectif visé, inférieur à 50 µg/g sur produit sec (Tableau V-9). Il est important de noter que les systèmes choisis, donnent des résultats très répétables d'une expérience à l'autre.

Tableau V-9. Influence du choix de la résine sur le taux d'isoflavones récupérées dans le filtrat après 8BV equivalent passé

Essai sur résine	Rendement MS (%)	Pureté IF filtrat (µg/g)
Hydrolysat initial	-	1583
XAD7HP 1	83	68
XAD7HP 2		72
XAD7HP 3		63
FPA91 1	63	41
FPA91 2		40

A partir de ces premiers résultats il a donc été convenu de focaliser les travaux de recherche sur la résine XAD7HP essentiellement.

5.3. Comportement général du système chromatographique

Des prélèvements de petite taille en sortie de colonne ont permis l'analyse de la matière sèche et de la concentration en isoflavones par HPLC-UV en fonction du volume chargé. Le procédé de traitement a permis le fractionnement des protéines et des isoflavones avec un traitement de 14 BV de solution protéique, ce qui est représenté par la courbe de percée (Figure V-17). La teneur en matière sèche croit et est stabilisée rapidement. Elle se rapproche de la teneur initiale, le rapport C/C_0 est supérieur à 0,9 dès 3,5 BV soit 1,4 L sur 400 mL de résine (Figure V-17).

Les isoflavones sont fortement retenues sur la résine. Le retour à la concentration initiale (C_0) n'est pas observé, après 14BV celle-ci est de seulement 7 mg/L, en partant d'un hydrolysat contenant une teneur en isoflavones de 70 mg/L. Un rinçage à l'eau précédant l'élution a permis la récupération des protéines présentes dans la résine, un volume de 2BV a permis de retrouver une teneur en matière sèche pratiquement nulle. Ce rinçage à l'eau a induit l'élution d'une partie des isoflavones, leur concentration est passée de 7 à 14 mg/L brutalement. L'élution par un mélange éthanol/eau (70/30) montre la désorption d'une fraction protéique importante qui est partiellement dissociée de la fraction isoflavones, l'allure des deux pics est très caractéristique d'une séparation chromatographique. La teneur en matière sèche atteint 40 g/L et la teneur en isoflavones dépasse les 400 mg/L soit 6 fois la concentration initiale. Le passage de 14BV d'hydrolysat protéique de soja et le suivi par fractions a été répété, le bilan des deux

passages est présenté dans le Tableau V-10. Afin de mieux comprendre le fonctionnement général du système chromatographique, avec percolation de longue durée d'un hydrolysat, rinçage et élution, des prélèvements successifs ont été effectuées afin de doser la teneur en isoflavones et la matière sèche dans ces fractions.

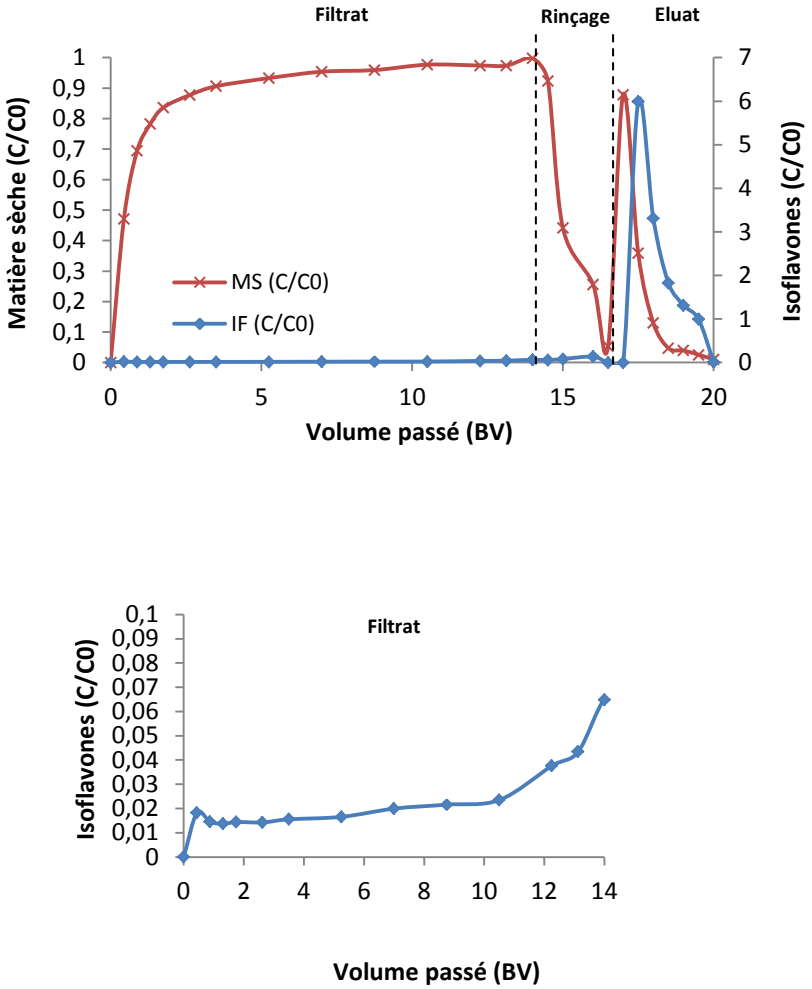


Figure V -17. C ourbe de percée représentant la co ncentration en is oflavones et matière sèche sur les concentrations in itiales respectives durant le passage d'hydrolysat protéique de soja au tr avers d e résine adsorbante XAD7HP avec un débit de 2BV/h

Tableau V-10. Bilan de l'adsorption en isoflavones et de la récupération du filtrat lors de deux passages successifs

	Taux d'adsorption IF (%)	**Récupération Matière sèche (%)**	**Teneur résiduelle (µg/g)**	**Concentration IF dans le filtrat (mg/L)**	**Capacité d'adsorption (mg/g)**
Initial	-	-	1554	70	
Passage 1	97,7	86,3	43	1,9	0,952
Passage 2	95,7	90,4	76	3,4	0,931

Le taux d'adsorption évolue peu, le procédé est répétable mais la teneur résiduelle en isoflavones sur matière sèche oscille légèrement autour du seuil de 50 µg/g. La récupération en matière sèche est bonne avec un taux de 90 % environ. Un faible écart de la capacité d'adsorption entraine un résultat variable car le seuil visé est très bas, il représente 3 % de la teneur initiale en isoflavones.

La valeur de la capacité d'adsorption calculée ici en colonne (mg IF / g résine) est équivalente à celle obtenue en batch à l'équilibre (précédemment présenté dans ce chapitre section 3.4.). En effet pour un volume similaire de 14BV, une capacité théorique de 0,962 mg/g est attendue ce qui est très proche de ce qui est obtenu avec 0,941 en moyenne (Figure V-6). Le passage du mode statique en mode dynamique sur colonne n'a eu que très peu d'effet pour cette quantité d'hydrolysat traitée (14 BV).

Afin de réduire la durée du procédé le débit du système a été testé à 5BV/h permettant de traiter 14BV en moins de 3 h (Figure V-18) contre 7 h (Figure V-17).

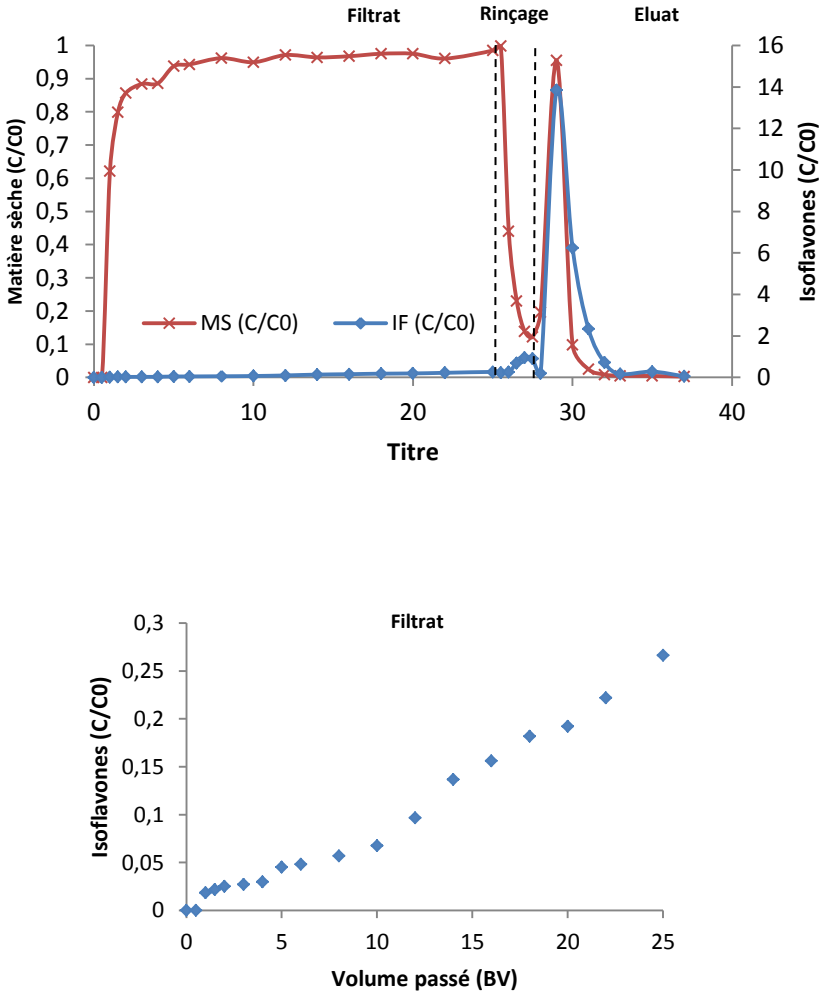


Figure V-18. Courbe de percée issue d'un passage de 25BV d'hydrolysat protéique de soja avec un débit de 5BV/h et une élution effectuée à 1BV/h

L'évolution de la courbe de percée est très similaire à ce qui avait été observé à 2 BV/h, le rinçage permet de retirer les protéines jusqu'à une matière sèche quasiment nulle. Cette dernière entraine l'élution partielle d'isoflavones, il n'est donc pas possible de récupérer cette fraction protéique car elle surélèverait le taux d'isoflavones dans le filtrat. L'élution ici a été effectuée à un débit plus bas afin d'observer l'impact d'un changement de débit sur la séparation des protéines et isoflavones lors de l'élution (Figure V-18). Cette séparation montre un retard diminué des isoflavones dont la fin du pic était mieux dissociée de la fraction protéique lors de l'élution sur un débit de 2BV/h. La concentration en isoflavones dans l'éluat atteint 14 fois la concentration initiale C_0 avec un volume traité de 25 BV ici contre 14 BV précédemment où ce rapport C/C_0 était de 6.

5.4. Choix du débit et du volume traité

Le débit de 2 à 5 BV/h influence peu la concentration en isoflavones dans le filtrat jusqu'au 8ème BV environ (Figure V-19), correspondant dans ce système à un volume de 1,6 L. A partir de ce volume traité le recouvrement des isoflavones dans le filtrat est différent.

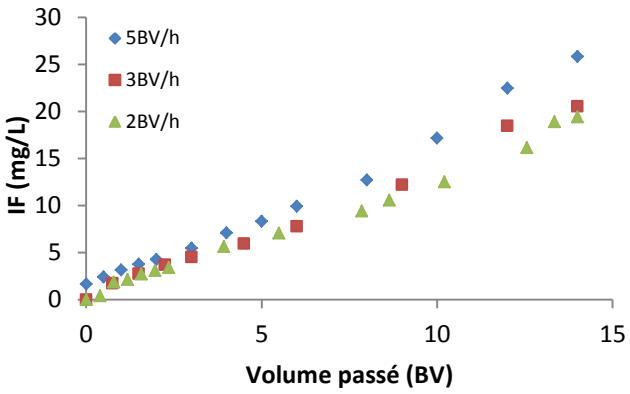


Figure V-19. Influence du débit sur la concentration en isoflavones dans le filtrat

La dilution du filtrat a aussi été testée avec un hydrolysat contenant une matière sèche totale de 22,5 g/L, contre 45 g/L pour l'hydrolysat dont les conditions avaient été standardisées.

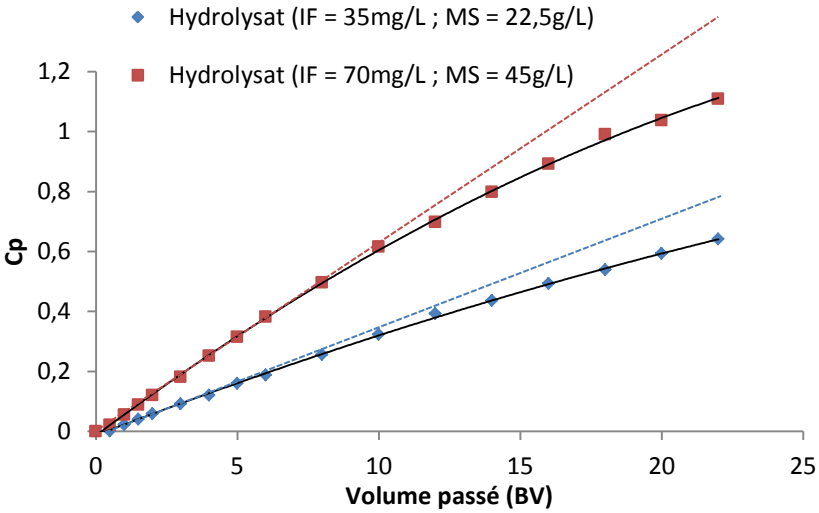


Figure V-20. Influence de la teneur en isoflavones sur la capacité d'adsorption par dilution de l'hydrolysat. Les lignes en pointillés représentent la droite à l'origine

La capacité d'adsorption évolue linéairement en fonction du volume donc de la quantité de soluté mise en contact avec la résine mais seulement sur les premiers volumes, environ jusqu'à 8 BV (Figure V-17) comme cela est mis en évidence pour les essais à différents débits. Au-delà, l'évolution est asymptotique indiquant que la capacité d'adsorption n'évolue plus proportionnellement avec la quantité de soluté

introduite. Ceci explique que la teneur en isoflavones est plus forte dans le filtrat à partir du 8ème BV (Figure V-21). De plus cet effet est moins important avec l'utilisation d'un hydrolysat dilué à 22,5 g/L. Par le passage de ce dernier un filtrat global après 12 BV contient 32 µg/g d'isoflavones et le filtrat global après 25 BV contient 304 µg/g d'isoflavones.

Pour utiliser des débits relativement élevés tel que 5 BV/h il est donc nécessaire de diluer l'hydrolysat mais cela engendrera des coûts de traitements non cohérents avec une application industrielle concernant les étapes de concentrations avant séchage par atomisation. Avec l'utilisation d'un hydrolysat à 45 g/L, un débit de 2 BV/h est préférable. Concernant l'évolution de la teneur résiduelle en isoflavones l'objectif est d'obtenir un hydrolysat sous les 50 µg/g. Afin d'atteindre cet objectif il est nécessaire de travailler sur un volume de 8 BV (Figure V-21).

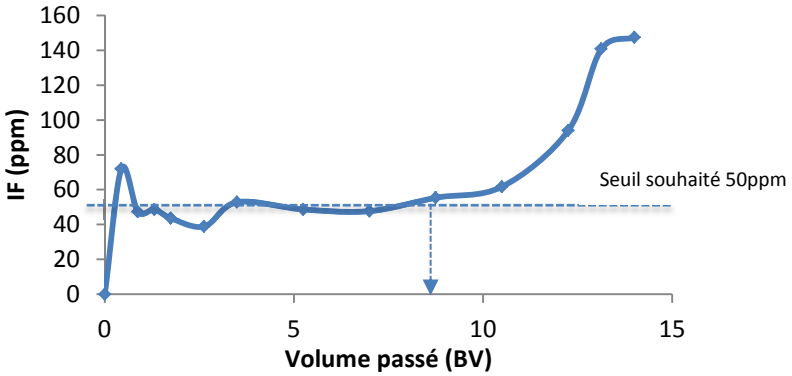


Figure V-21. Influence du volume traité sur la teneur en isoflavones résiduelle dans le filtrat pour un débit fixé à 2BV/h

L'étude de la rétention par forme d'isoflavones, présentée ensuite, explique le changement qui advient dès le 8ème BV.

5.5. Etude de l'adsorption et de la désorption des différentes formes d'isoflavones sur résine adsorbante XAD7HP

5.5.1. Adsorption des isoflavones

Lors des analyses des différentes fractions prélevées en sortie de colonne il a été possible de suivre les différentes formes d'isoflavones et des comportements différents ont pu être mis en évidence. La concentration de la génistéine (aglycone) reste quasiment constante autour de 0,5 mg/L durant le procédé et quel que soit le débit (Figure V-22). En revanche, celui des formes malonyles apparait avec un retard important qui peut être réduit avec l'augmentation du débit. Ainsi elles apparaissent autour du 10ème BV pour un débit de 2BV/h, ce qui peut être la cause d'une teneur en isoflavones accrue à partir de ce volume comme ce qui est observé précédemment. Pour un débit de 5BV/h elles sont détectées dès le début de la filtration. La forme acétyle apparaît alors qu'elle n'était pas détectée pour des débits plus faibles. La forme glucoside aussi semble avoir un comportement différent.

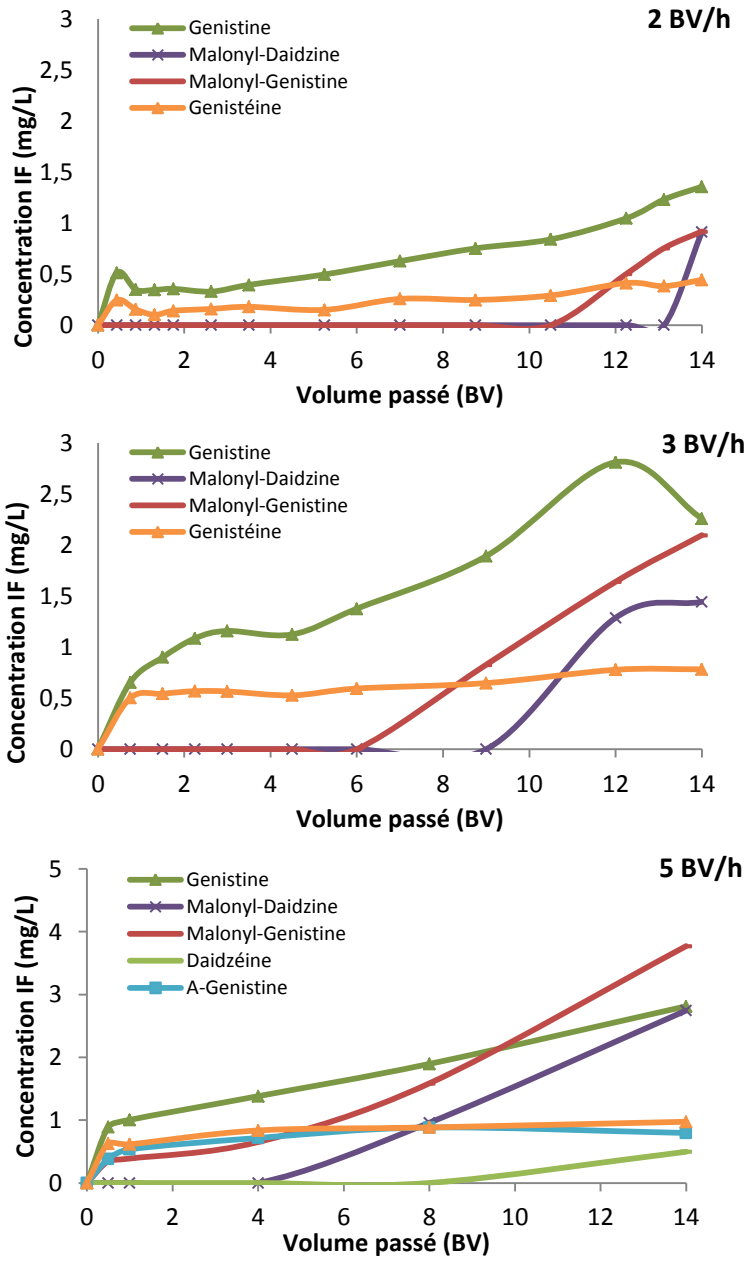


Figure V-22. Suivi des formes détectées d'isoflavones dans le filtrat en sortie de colonne en fonction du débit imposé sur résine XAD7HP

Par représentation sous forme de courbe de percée (concentration de chaque forme ramenée sur sa concentration initiale), l'évolution des formes aglycones et glucosides est très similaire (Figure V-23). Pour les deux formes le débit a peu de conséquence sur leur adsorption, le rapport C/C_0 reste proche de 0,1. Les différences de retard sont confirmées et sont même plus marqués pour les formes malonyles, elles se rapprochent des concentrations initiales en particulier la malonyl-daidzine qui atteint 70 % de la valeur initiale.

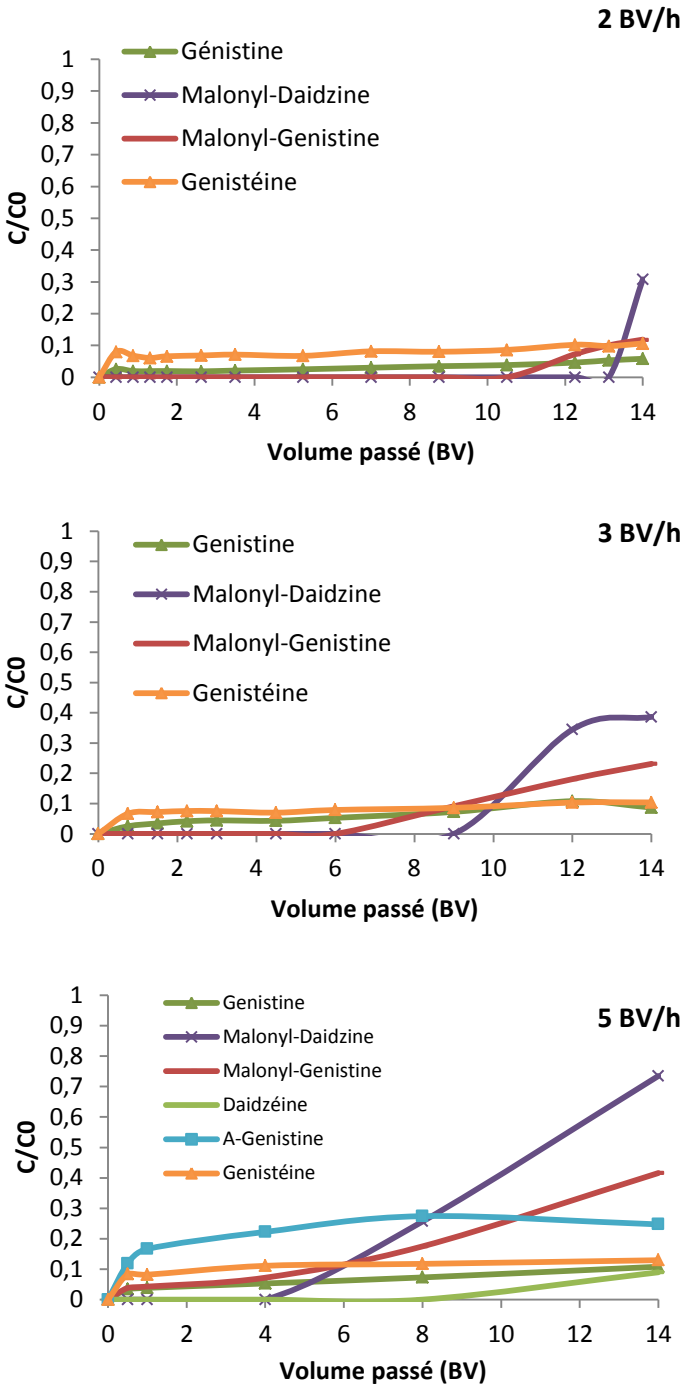


Figure V-23. Courbes de percée de chaque forme d'isoflavones détectée en fonction du débit imposé sur résine XAD7HP

La capacité d'adsorption en mode dynamique est différente d'une forme à l'autre. Les formes conjuguées semblent avoir une cinétique d'adsorption plus rapide sur les premiers BV mais la capacité maximale d'adsorption associée est plus basse, comme cela est indiqué par les constantes du modèle de pseudo second ordre déterminées en batch (ce qui pourrait entrainer une sortie brève dès que cette capacité maximale est atteinte). La même évolution est observée à partir d'un hydrolysat dilué à

22,5 g/L. Les formes malonyles sont de nature moins hydrophobe ce qui peut entrainer une moindre efficacité, la comparaison entre résines adsorbantes (XAD7HP et FPX66) montrait que l'adsorption était favorisée par l'utilisation d'une résine partiellement aliphatique. Leur charge différente induit probablement des interactions différentes avec les protéines pouvant avoir un impact sur leur désorption. Une autre hypothèse consisterait à ce que les formes de plus haut poids moléculaire soient ralenties physiquement au travers du lit de résine. Mais si tel était le cas une différence serait observée entre aglycones et glucosides dont les poids moléculaires marquent une différence plus significative.

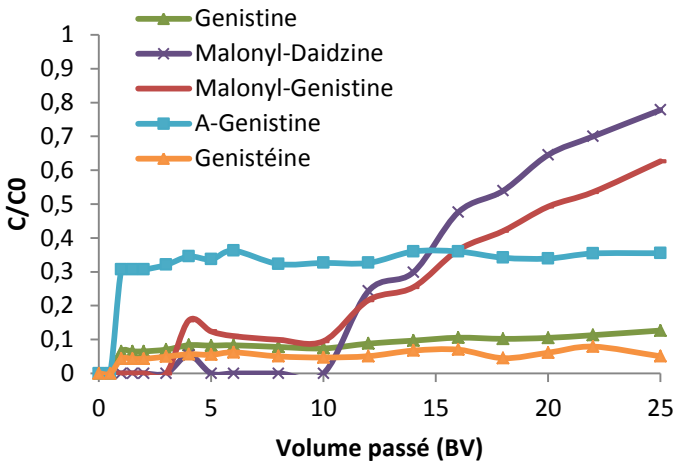


Figure V-24. Courbe de percée des formes d'isoflavones en sortie de colonne à partir d'un hydrolysat dilué à 25g/L

5.5.2. Effet d'un traitement à la β-glucosidase

Afin d'améliorer la rétention des isoflavones totales, un traitement à la β-glucosidase a été étudié. L'objet de ce traitement et de transformer les formes conjuguées en formes aglycones pour améliorer l'adsorption compte tenu des comportements mis en évidence au préalable.

Un traitement à la β-glucosidase d'une heure après action de la protéase a permis de transformer la totalité des formes glucosides en formes aglycones (Figure V-25).

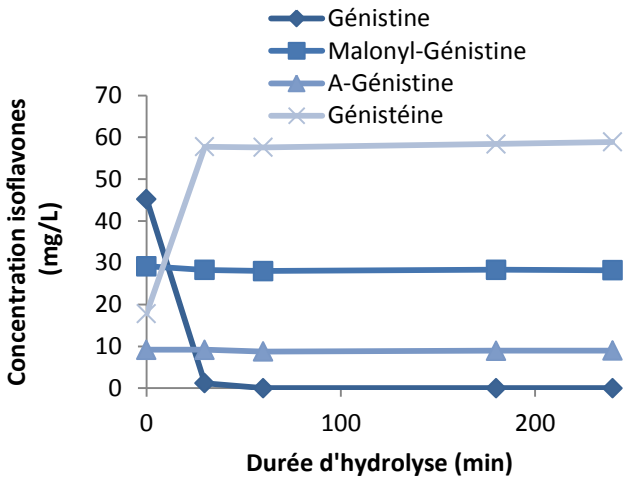


Figure V-25. Effet de la β-glucosidase sur le profil de concentration de la génistéine et de ses dérivés dans un hydrolysat protéique de soja préalablement obtenu par action d'une peptidase

La même évolution est constatée pour les formes avec base daidzéine (non présenté ici pour une meilleure lisibilité). Les formes conjuguées malonyles et acétyles ne sont pas hydrolysées par l'enzyme, les extrémités malonate et acetate empêchent probablement la fixation de l'isoflavone par les sites catalytiques de l'enzyme. D'autres travaux ont montrés que les isoflavones malonyles sont peu impactés par les enzymes de types β-glucosidase (Yang, Wang *et al.* 2009).

Après ce traitement un passage de 14BV a été effectué sur colonne de résine XAD7HP de la même manière que les essais présentés précédemment (Tableau V-10, page 194). La pureté en isoflavones induite est de 67 µg/g dans le filtrat total ce qui le situe entre les deux résultats obtenus par les hydrolysats sans traitement à la β-glucosidase (43 µg/g et 76 µg/g). Une enzyme pouvant hydrolyser les formes malonyles pourrait permettre de traiter une plus grande quantité d'hydrolysat.

5.5.3. Comportement des différentes formes durant l'élution

La désorption des isoflavones et de certaines protéines s'effectue simultanément entrainant une pureté relativement faible en isoflavones dans l'éluat, un maximum de 1,5 % d'isoflavone sur matière sèche. On observe des pics d'élution des isoflavones caractéristiques des méthodes chromatographiques et un comportement différent selon les formes. Le glucoside génistine est la forme principale présente dans l'éluat. Rapportée à la teneur initiale, la désorption de chacun des composés montre cependant que les formes conjuguées acétyles et malonyles sont éluées les premières et plus intensément suivies par l'aglycone génistéine. La forme glucoside génistine qui est le composé majoritaire montre une désorption moins forte relativement à sa teneur initiale.

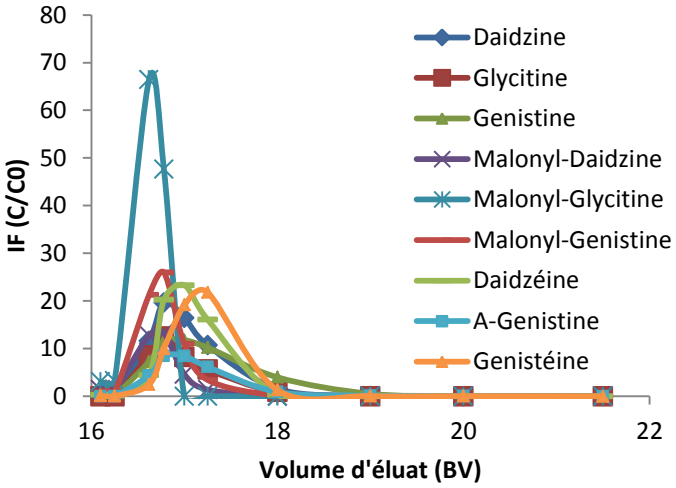


Figure V-26 Courbe de percée lors de l'étape de désorption des isoflavones après passage de 14BV d'hydrolysat à 45 g/L et élution effectuée par éthanol 70%

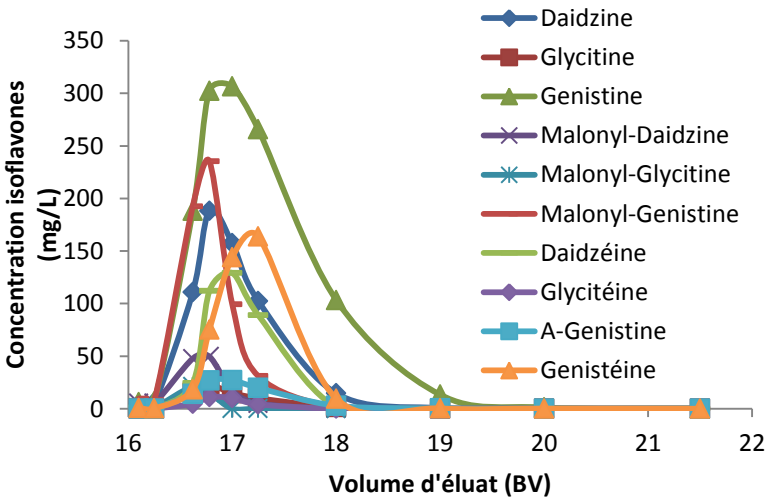


Figure V-27. Concentration en isoflavones lors de l'étape de désorption des isoflavones après passage de 14BV d'hydrolysat à 45 g/L et élution effectuée par éthanol 70%

Dans le cadre d'une valorisation des isoflavones, l'étape d'élution est importante. Il serait alors nécessaire d'optimiser des paramètres tels que le débit et teneur en éthanol dans l'éluant afin d'obtenir des puretés plus hautes.

5.6. Influence du contre-ion sur la rétention des isoflavones sur résine anionique

Comme cela a été montré en mode statique, puis sur les premiers essais sur colonne, la résine FPA91Cl permet d'obtenir une teneur en isoflavones résiduelles plus faible envers la XAD7HP. Une étude de l'influence du contre-ions sur l'efficacité de l'adsorption des isoflavones et sur le pH a été conduite à plus petite échelle sur support anionique. Le premier objectif est la rétention des formes conjuguées (acétyles et malonyles) qui sortent brusquement après un volume traité de 8 BV comme cela a été démontré sur résine adsorbante. Sur résine anionique, ces formes chargées seraient mieux retenues. Le deuxième objectif est d'utiliser un contre ion de remplacement à l'ion hydroxyle qui engendre des pH trop élevés après passage de l'hydrolysat et des pertes en protéines importantes. Plusieurs contre-ions ont été testés (les conditionnements des résines sont décrits Chapitre II.5.4).

L'utilisation d'une résine anionique permet de retenir les formes les plus chargées de type malonyles (Figure V-28). En effet lors d'un passage sur résine FPA91Cl les formes conjuguées malonyles évoluent différemment, leur concentration étant constante (comparé à ce qui est observé sur résine d'adsorption).

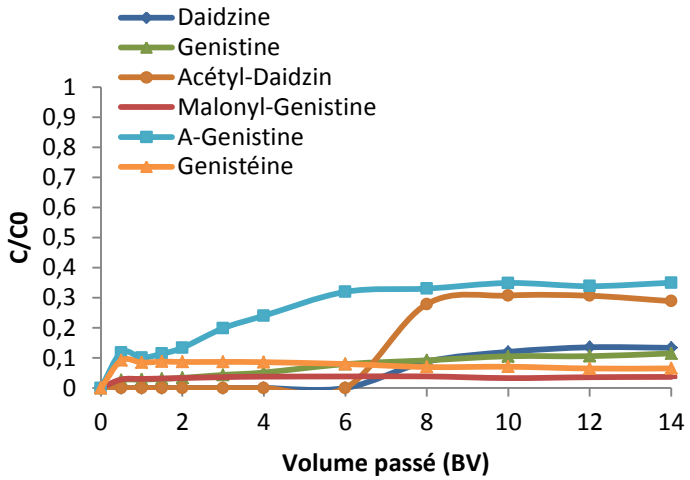


Figure V-28. Suivi des formes détectées d'isoflavones dans le filtrat en sortie de colonne sur résine FPA91Cl

Tableau V-11. Pureté en isoflavones dans le filtrat en fonction du contre ion et du volume chargé à 2BV/h

	Nature du contre ion							
	Cl^-		CO_3^{2-}		SO_4^{2-}		HO^-	
Volume traité	IF (µg/g)	Rdt MS Filtrat	IF (µg/g)	Rdt MS Filtrat	IF (µg/g)	Rdt MS Filtrat	IF (µg/g)	Rdt MS Filtrat
14BV	132	82,5%	144	81,2%	115	86,7%	**45**	72,7 %
12BV	135				80		**45**	
10BV	116		139		64		**27**	
8BV	107				**58**		**28**	
6BV			120					

Lorsque le contre-ion testé est la forme **HO^-** le rendement de récupération de matière sèche équivalent protéine est faible à 73 %, alors qu'il monte à près de 87 % avec la forme SO_4^{2-}(Tableau V-11). Cependant, l'adsorption des isoflavones est plus efficace avec le contre ion **HO^-**, puisque la pureté finale est de 28 à 45 µg/g selon le volume d'hydrolysat traité. En condition basique, les extrémités acides des protéines passent sous forme COO^- ce qui entraine une plus forte rétention. La régénération est aussi très différente lors de l'utilisation de la forme **HO^-** où 60 % des isoflavones sont récupérées alors que l'on obtient entre 8 et 20 % avec les autres formes.

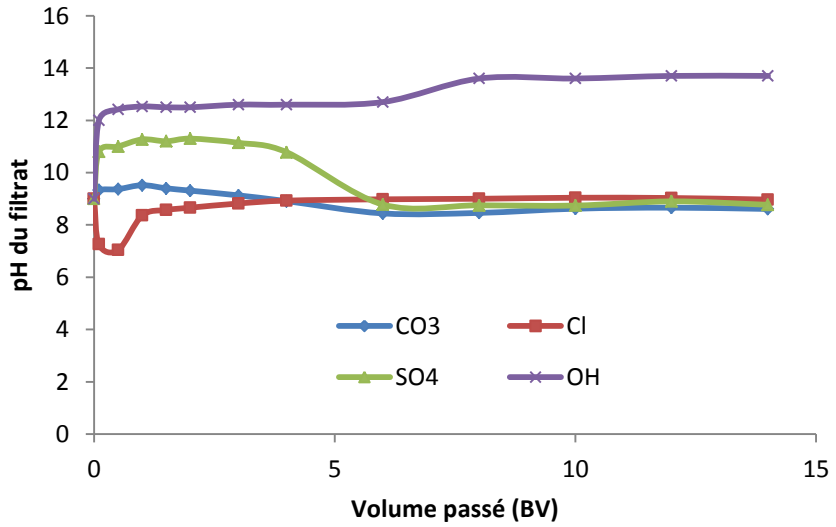


Figure V-29. Evolution du pH en sortie de colonne en selon les différents contre ion testés

L'évolution du pH est très différente avec la forme OH démontrant un relargage permanent des ions dans le filtrat (Figure V-29). Pour les autres contre-ions une stabilisation du pH vers le 5ème BV est constatée vers la même valeur. Pour la forme chlorure, le pH chute légèrement indiquant probablement

l'adsorption d'ion hydroxyle présent dans l'hydrolysat avant l'adsorption des isoflavones (conditionnement de l'hydrolysat à pH9). L'utilisation d'ion SO_4^{2-} permet d'obtenir une pureté intéressante sur 8 BV traité et une récupération importante de la matière protéique. Cependant le pH est trop élevé sur les premiers BV pour envisager une application alimentaire.

6. Passage à échelle pilote industriel

6.1. Essais préalables de répétabilité à petite échelle et bilan par fraction sur résine adsorbante

L'utilisation en phase industrielle de la résine nécessite au préalable des essais de répétabilité afin de déterminer si le procédé est viable étant donné le coût important lié à l'utilisation d'une résine adsorbante. Ainsi quatre essais successifs intercalés d'un lavage à l'eau ont été effectués sur des débits faibles de 1BV/h. Les filtrats obtenus ont des valeurs moyennes de teneur résiduelle en isoflavones sous le seuil idéal visé de 50 ppm (µg/g), et ce, pour les quatre essais (Tableau V-12) ce qui est conforme à l'objectif. La pousse à l'eau (PAE), ou rinçage, se comporte différemment puisque la teneur augmente progressivement (mise à part pour le 4eme passage qui n'avait été réalisé que 3 jours plus tard entrainant des relargages d'isoflavones dans le liquide de stockage avant utilisation).

Les bilans de récupération montrent une récupération constante de 85 % des protéines en moyenne dans le filtrat, avec un bilan global en matière sèche équilibré autour de 100 %. Concernant le bilan en isoflavones il est croissant d'un passage à l'autre et passe de 48 % à 91 %. Ceci montre qu'il existe une fixation irréversible d'une partie des isoflavones sur résine neuve sur certains sites d'adsorption ou pseudo-irréversible c'est-à-dire avec un relargage très tardif très supérieur à la durée des procédés mis en œuvre. Lors de la répétition de cycles, l'influence de ce phénomène disparait sans diminuer l'efficacité du procédé (Tableau V-12). Comme cela a été identifié précédemment, l'élution entraine une désorption d'une fraction protéique relativement importante représentant entre 6 et 8 % de la matière initiale. Ceci ne permet pas d'obtenir une fraction purifiée d'isoflavones, l'éluat contenant 1,4 % d'isoflavones sur base sèche. Pour valoriser cette fraction une étude de purification doit être menée sur un autre type de résine ou de solvant.

Malgré les étapes de lavage et d'élution qui permettent d'obtenir une teneur en isoflavones et matière sèche sortante nulle, l'ajout d'une étape de lavage post élution montre un relargage important d'isoflavones et de protéines. Ceci est probablement dû à un gradient de concentration en éthanol qui apparait à l'interface entre éluat et rinçage post-élution. Les gradients de concentration éthanolique sont souvent utilisés afin d'améliorer la séparation des différents composés.

Tableau V-12. Bilan des quatre passages successifs réalisés sur lit de résine XAD7HP

		Teneur IF (µg/g)	Qté IF (mg)	MS (g)	Bilan IF	Bilan MS
Essai 1	Filtrat	53	6,97	132,7	3,1%	85,5%
	PAE	71	1,08	15,3	0,5%	9,9%
	Eluat	7546	70,13	9,3	31,0%	6,0%
	Lavage	10043	32,06	3,2	14,2%	2,1%
			110,24	*160,5*	*48,7%*	*103,4%*
Essai 2	Filtrat	39	5,17	134,2	2,3%	86,4%
	PAE	178	2,39	13,5	1,1%	8,7%
	Eluat	11587	152,67	13,2	67,5%	8,5%
	Lavage	12019	16,65	1,4	7,4%	0,9%
			176,89	*162,2*	*78,2%*	*104,5%*
Essai 3	Filtrat	52	6,94	133,8	3,1%	86,2%
	PAE	371	6,02	16,2	2,7%	10,4%
	Eluat	11785	147,97	12,6	65,4%	8,1%
	Lavage	8336	26,57	3,2	11,8%	2,1%
			187,49	*165,8*	*82,9%*	*106,8%*
Essai 4	Filtrat	51	6,82	128,8	3,0%	82,96%
	PAE	164	2,21	8,9	1,0%	5,74%
	Eluat	13945	183,73	10,0	81,2%	6,41%
	Lavage	9293	12,88	1,8	5,7%	1,13%
			205,64	*149,5*	*90,9%*	*96,24%*

L'utilisation de la XAD7HP en série est possible mais il est nécessaire de retirer les pousses à l'eau et les recycler pour limiter les pertes en protéines.

6.2. Essais préalable sur 8 L de résine XAD7HP et FPA91Cl

Après production de 64 L d'hydrolysat protéique de soja à 90 g/L puis dilution à 45 g/L et conditionnement à pH 9 deux passages ont été effectués sur XAD7HP et FPA91Cl. Le plus petit débit a été choisi soit 1 BV/h pour passer l'hydrolysat au travers d'un lit de résine de 8 L. Le filtrat a été atomisé par la suite. Les résultats sont présentés dans le Tableau V-13.

Tableau V-13. Bilan de récupération de matière sèche et pureté en isoflavones après passage de 64 L d'hydrolysat protéique de soja sur une colonne de 8 L de résine

Résine	Fraction	MS relative	Pureté IF (µg/g)
	Hydrolysat		1583
XAD7HP	Filtrat	78%	**77**
	Rinçage	17%	24
	Eluat	12%	8538
FPA91Cl	Filtrat	67%	**14**

Le résultat obtenu sur XAD7HP montre une efficacité légèrement réduite puisque la pureté en isoflavones est de 75 µg/g contre moins de 50 µg/g lors des essais à plus petite échelle pour un même débit (à la fois dosé après séchage au four à 103 °C directement sur liquide et après séchage par atomisation comme décrit Chapitre II.5.6). Bien qu'il ait permis d'obtenir un hydrolysat avec un seuil plus bas en isoflavones (14 µg/g), le passage sur résine anionique FPA91Cl reconditionnée sous forme OH a montré deux désavantages majeurs. Le premier est la perte occasionné en matière et le pH en sortie de colonne qui est trop élevé, mesuré à pH 12. Il démontre la présence d'un échange ionique mais il n'est pas compatible avec l'application visé et peut entrainer une dégradation des acides aminés.

6.3. Essais sur 100 L de résine XAD7HP

Une mise à l'échelle sur 100 L de résine XAD7HP a été effectuée chez un prestataire de services (Centre de Valorisation du Glucose d'Amiens) toutes les analyses ayant été effectuées au LCA. Un premier essai avait été réalisé avant l'optimisation et l'étude en laboratoire présentée dans ce chapitre. Le protocole proposé alors, a été basé sur les premiers essais réalisés à partir d'une hydrolyse de 2 h par protéase, un conditionnement à pH 8, un débit de 1BV/h avec une mise en œuvre de 4BV d'hydrolysat. Les résultats de cet essai sont présentés Tableau V-14. Après concentration et atomisation du filtrat récupéré en sortie de colonne, une teneur en isoflavones de 147 µg/g a été mesurée à partir d'un isolat protéique de soja contenant 1072 µg/g d'isoflavone sur matière sèche, ce qui était éloigné du seuil fixé à 50 µg/g. De plus, environ 70% seulement de la matière a été récupérée dans cette fraction d'intérêt.

Tableau V-14. Bilan de l'essai sur 100L de lit fixe de résine avec un débit de 1BV/h et un passage de 4 BV d'hydrolysat partiel obtenu avec 2 h de traitement à l'endoprotéase

Fraction	Volume (L)	MS totale (Kg)	Pureté IF (µg/g)	Récupération MS (%)	Récupération IF (%)
Hydrolysat total	400	19,2	1072		
Mis en œuvre	400	19,2	-		
Filtrat + rinçage	620	13,4	-		
Eluat EtOH 65%	252	3,4	4300	17,7	70,9
Filtrat + rinçage atomisé		13,4	**147**	69,8	9,6
				Bilan MS 87,5%	*Bilan IF 80,5%*

Une deuxième mise à l'échelle a été effectuée après optimisation à petite échelle décrite précédemment dans ce chapitre (section 5.1. à 5.4). Le pH a été fixé à 8 pour des raisons d'applications industrielles (coût réduit, traitement plus doux). Mise à part cet écart par rapport à la mise au point en laboratoire, le même protocole est réalisé sur XAD7HP :

- Hydrolyse préalable de 8 h par endoprotéase pour maximiser la solubilité de l'hydrolysat
- Débit de 2 BV/h afin de traiter plus rapidement le produit
- Volume maximal de 12 BV afin d'éviter la récupération des formes malonyles dans le filtrat
- Retrait de la fraction rinçage à l'eau du filtrat total récupéré (ou pousse à l'eau) afin d'éviter l'élution partielle des isoflavones par l'eau constatée à petite échelle

Etant donné la solubilité non totale de l'hydrolysat, due au choix du pH, le passage de l'intégralité de la solution n'a pas été possible due à un colmatage à partir du 8^{ème}BV. Néanmoins, un volume relativement important de 9 BV a pu être traité comparé au premier essai. Cette deuxième mise à l'échelle a permis de produire 31 kg d'hydrolysat de protéines de soja appauvri en isoflavones après atomisation. Celle-ci a été effectuée avec succès puisque la teneur finale en isoflavones a été dosée à 38 µg/g (sur poids sec et toujours exprimé en équivalent aglycones) en dessous du seuil idéal déterminé au départ (Tableau V-15).

Tableau V-15. Bilan de l'essai sur 100L de lit fixe de résine avec un débit de 2BV/h et un hydrolysat poussé de 8h

Fraction	Volume (L)	MS totale (Kg)	Pureté IF (µg/g)	Récupération MS (%)	Récupération IF (%)
Hydrolysat total	1260	56,8	1072		
Mis en œuvre	906	40,9	1072		
Filtrat atomisé	1020	31,0	38	75,8%	2,7%
PAE Filtrat	200	4,5	nd	10,9%	0,0%
Eluat	200	3,8	10261	9,2%	88,1%
PAE Eluat	400	0,2	37519	0,4%	14,0%
				Bilan MS 97,4%	*Bilan IF 103,5%*

Comparativement au premier essai sur 100 L, l'efficacité a été nettement améliorée alors que la quantité traitée a été doublée Tableau V-15. La prise en compte des données a petites échelle a permis cette amélioration notamment par le rejet de la fraction de rinçage mais aussi par l'utilisation d'une hydrolyse plus poussée avant passage chromatographique. La solubilité des protéines étant améliorée, 86,7 % de la matière sèche est récupérée par le filtrat et le rinçage contre 69,8 % sur le premier passage, bien que le fait de passer une plus grande quantité de produit participe aussi à cette amélioration. Le suivi en matière sèche montre la même évolution que ce qui était observé à échelle 400 mL (Figure V-30). La teneur en isoflavones est constante probablement due au fait que le colmatage ait entrainé une perte de charge ralentissant le débit et donc favorisant légèrement l'adsorption des isoflavones.

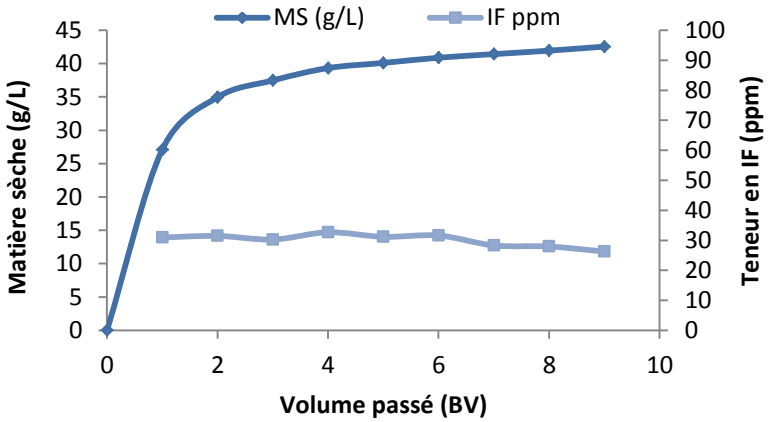


Figure V-30. Suivi de la teneur en matière sèche et en isoflavone en sortie de colonne

6.4. Caractérisation du produit final

6.4.1. Teneur en isoflavones et influence sur la couleur

A partir du produit fini issu de la mise à l'échelle industrielle, la proportion d'isoflavones résiduelles déterminée au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle qui était de 38 µg/g (sur produit sec) a été confirmée par une analyse externe réalisée par le laboratoire des Fraudes de Strasbourg qui a déterminé une teneur de 39 ppm sur produit sec.

Outre les aspects chimiques étudiés ici, la couleur blanche du produit final est intéressante car c'est une couleur qui est recherchée pour son incorporation dans une formule de lait infantile. La forte diminution de la teneur en isoflavones entraine ce changement. La comparaison entre le produit final et la matière d'origine est illustrée par la Figure V-31.

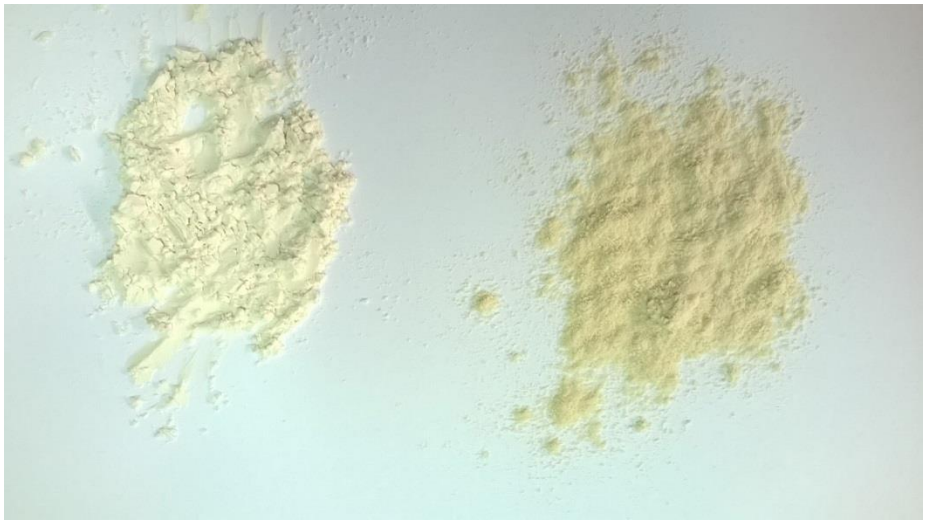


Figure V-31. Photos de l'isolat protéique de soja et de l'hydrolysat appauvri en isoflavones produit sur une échelle de 100L de résine. A gauche le produit final et à droite l'isolat protéique

6.4.2. Profil de poids moléculaire

Premièrement, le produit final analysé a donné un degré d'hydrolyse de 13,3 % ce qui reste proche de ce qui était déterminé sur le suivi de l'hydrolyse à petite échelle mais ici le produit a été traité sur résine puis séché par atomisation. Il est cependant légèrement inférieur à l'échelle laboratoire. L'étape d'hydrolyse n'a pas été effectuée dans les mêmes systèmes et par les mêmes opérateurs, il est possible qu'il y ait eu un impact du traitement sur le degré d'hydrolyse.

Concernant le profil de poids moléculaire, 33 % des peptides ont une taille inférieure à 5000 Da (et 11 % < 3000 Da) avec un dosage de l'échantillon par solubilisation dans un tampon phosphate avec SDS 2% (m/V) alors que ce taux est de 14 % dans la matière de départ (et 1 % < 3000 Da). Par solubilisation et sans ajout de SDS ce taux est de 38 %.

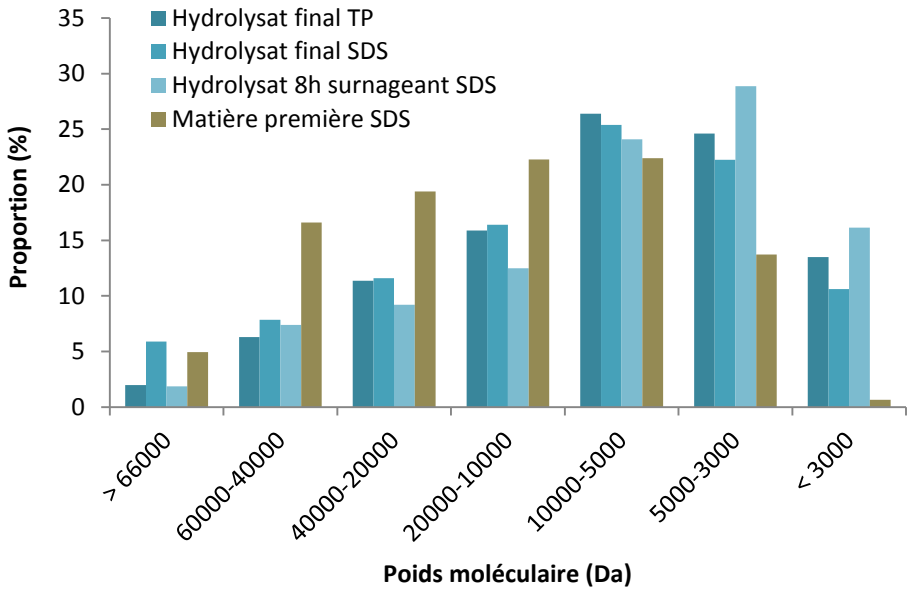


Figure V-32. Profils de poids moléculaires de l'hydrolysat final après mise à échelle industrielle en fonction de la méthode de solubilisation et comparaison avec la matière première

L'apport d'une étape de séparation solide-liquide (identique à celle effectuée sur protéines de riz Chapitre IV.3.4.4) apporte ici peu d'amélioration. En effet, contrairement à celles du riz, les protéines de soja supérieures à 10 kDasont solubles.

Malgré cette hydrolyse partielle, l'électrophorèse semble montrer que les sous-unités α de la β-conglycinine et des chaines acides de la glycinine seraient réduites (Figure V-33). Ces chaines sont connues comme étant les principaux allergènes, ceci à partir de l'hydrolysat de protéine de soja à teneur réduite en isoflavones. L'hydrolysat de soja à teneur réduite en isoflavone issu de la mise à l'échelle industrielle sur résine chromatographique montre des peptides de poids moléculaire sous les 15 kDa essentiellement. Les sous unités décrites précédemment semblent avoir été hydrolysées (absence de bandes et de trainée au-dessus de 19 kDa et forte diminution d'intensité pour la bande à 19 kDa). Ce

résultat a été interprété par la comparaison avec les allergènes couramment retrouvés dans le soja et présentés dans une revue bibliographique récente (Figure V-34), (Wang, Qin *et al.* 2014).

Il faut aussi noter que la matière première est particulièrement dénaturée ce qui rejoint les données de de degré d'hydrolyse. Une étude récente a montré que les isolats protéiques de soja peuvent avoir des profils d'électrophorèse et une teneur en allergènes parfois déjà très réduite (Li, Zhu *et al.* 2013).

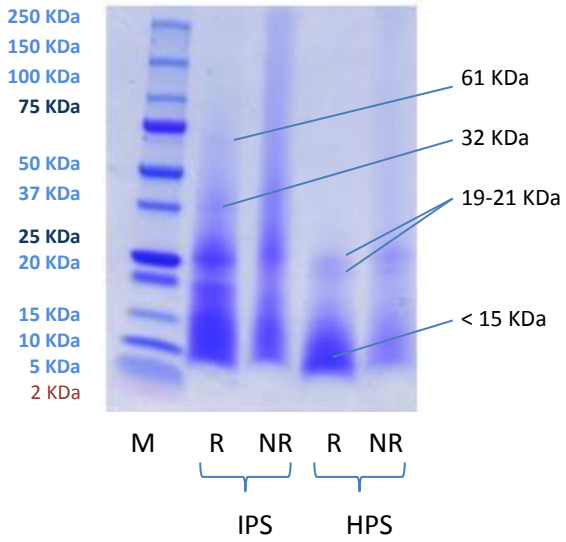


Figure V-33. Analyse du profil de poids moléculaire par électrophorèse SDS-PAGE en condition réductrice (R) et non réductrice (NR à partir d'isolat protéique de soja (IPS) et le produit final hydrolysé et traité sur colonne de résine (HPS)

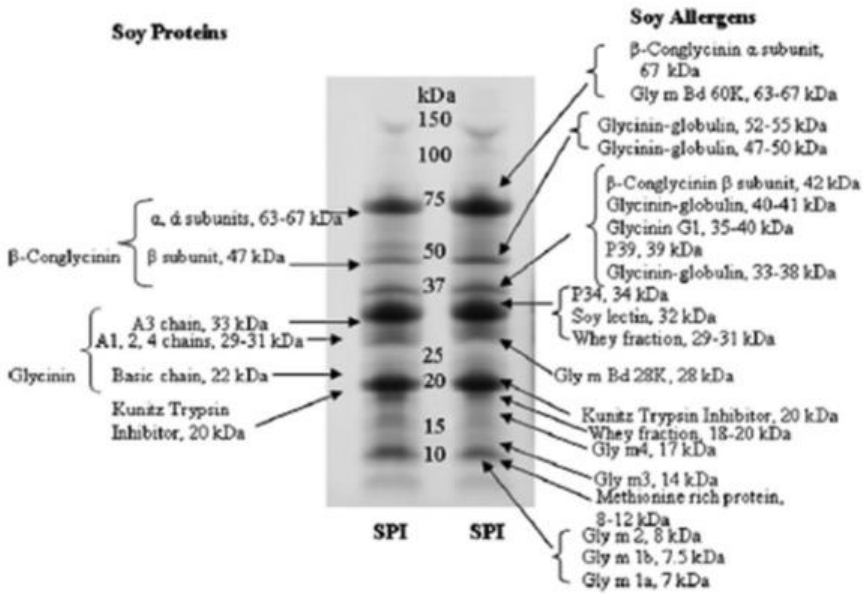


Figure V-34. Electrophorèse référence présentée dans la littérature identifiant les allergènes du soja (Wang, Qin et al. 2014)

7. Conclusion

Afin de pouvoir éliminer les isoflavones contenues dans un isolat protéique de soja, l'objectif était de retenir ces composés sur un support adsorbant à partir d'une solution aqueuse. Le passage d'une telle solution est difficile car des phénomènes de colmatage adviennent en mode dynamique. L'utilisation d'un traitement d'hydrolyse à la protéase associée à un pH légèrement alcalin a permis d'atteindre une solubilité des protéines de plus de 98 %. Le passage de l'hydrolysat sans étape préalable de filtration, qui aurait pu être envisagée afin de retirer les protéines insolubles, a été possible.

L'étude préalable en réacteur agité à petite échelle a montré l'importance d'utiliser une résine de type acrylique aliphatique (XAD7HP) pour atteindre les plus forts taux d'adsorption avec une récupération importante de la fraction protéique. L'utilisation de résines anioniques a permis d'obtenir des résultats encore plus bas en termes de pureté en isoflavones en particulier avec la résine anionique forte de type 2. Deux problèmes majeurs ont pu être mis en évidence par la suite lors des essais sur colonne en mode dynamique avec cette résine, *i)* le pH observé en sortie de colonne augmente au-delà de la limite choisie pour l'application alimentaire visée du fait de l'échange des ions hydroxyles *ii)* une perte en protéines approchant 30 %, double de celle obtenue avec résine adsorbante XAD7HP, est observée

Sur le système hydrolysat protéique de soja et résine adsorbante XAD7HP, des mécanismes d'adsorption ont été étudiés par l'utilisation de modèles cinétiques couramment retrouvés dans la littérature. La cinétique d'adsorption observée était particulièrement rapide. L'application de modèle de diffusion a montré que l'étape de diffusion au travers du film semble être l'étape limitante. La réaction d'adsorption qui est décrite par le modèle de pseudo-second ordre montrerait que la chimisorption gouverne l'adsorption quelle que soit la forme d'isoflavones étudiée. De plus amples travaux devraient être menés avec des solutions modèles plus concentrées pour parfaire l'étude des mécanismes et déterminer l'influence des protéines sur l'adsorption des isoflavones.

La mise au point de la méthode d'adsorption des isoflavones de soja a été ensuite réalisée sur résine XAD7HP fixée dans une colonne de verre. En partant d'une dilution de l'hydrolysat en cohérence avec une mise à échelle industrielle, l'influence du débit et du volume d'hydrolysat traité ont été optimisés pas à pas. L'analyse précise des formes d'isoflavones en sortie de colonne a montré que les formes conjuguées de types malonyles n'ont pas le même comportement que les autres formes. Elles sortent avec un retard important et ce sont elles qui engendrent l'augmentation de la pureté en isoflavones dans le filtrat produit. L'augmentation du débit entraine une sortie plus précoce de ces formes ce qui montrerait qu'elles sont entrainées par les protéines alors qu'elles ont au départ des constantes d'adsorption cinétique plus fortes comme cela a pu être démontré en mode statique. Le débit a très peu d'influence sur l'adsorption des autres formes d'isoflavones sur la quantité étudiée (8 à 25 BV) et sur les débits de 1 à 5 BV/h.

En se plaçant dans les conditions optimales, c'est-à-dire un débit suffisant et un volume traité en deçà de celui observé lors de la sortie des formes conjuguées, une mise à l'échelle a été réalisée permettant de produire 31 kg d'hydrolysat de protéines de soja appauvri en isoflavones à partir de 41 kg d'isolat protéique de soja. La teneur en isoflavones mesurée dans le produit final est conforme à l'objectif final avec 38 ppm d'isoflavones (µg IF/g) ce qui est sous le seuil fixé à 50 ppm, analyse confirmée par un

laboratoire externe. Des études de répétabilité à petite échelle (400 mL) ont par ailleurs montré que la résine XAD7HP est réutilisable par des étapes intercalées d'élution à l'éthanol et de lavage à l'eau, et en obtenant la même pureté finale. Une attention particulière a dû être effectuée portée sur l'analyse des fractions de lavage qui ont tendance à éluer partiellement les isoflavones.

L'étape d'hydrolyse enzymatique avait un triple objectif, *i)* la solubilisation de l'isolat pour le passage au travers de résines chromatographiques, *ii)* la déstructuration de la matrice protéique afin de libérer potentiellement les isoflavones ou du moins faciliter leur extractabilité et *iii)* le développement d'un produit hypoallergénique. La solubilisation de l'isolat a été le principal apport à la méthode car elle a permis de pouvoir traiter une quantité relativement importante de protéines de soja. Au vu des résultats obtenus en mode statique avec ou sans hydrolyse la déstructuration de la matrice protéique n'a pas permis d'améliorer leur adsorption. Concernant enfin le développement d'un hydrolysat hypoallergénique la proportion de peptides sous les 5000 Da reste faible même si l'électrophorèse montre la forte diminution probable d'allergènes. Des études plus poussées devraient être envisagées concernant l'hydrolyse par protéase notamment par l'utilisation d'exopeptidase qui pourrait être positionnée avant ou après le passage sur résine adsorbante. La nature hypoallergénique devra, quoi qu'il advienne, être mesurée par des méthodes biologiques car le profil de poids moléculaire n'est qu'un *primo* indicateur, et il est probable que le traitement par protéase proposé dans ce travail suffise à atteindre les spécificités requises en matière de réaction à l'allergie.

Conclusion générale

Rappel des objectifs

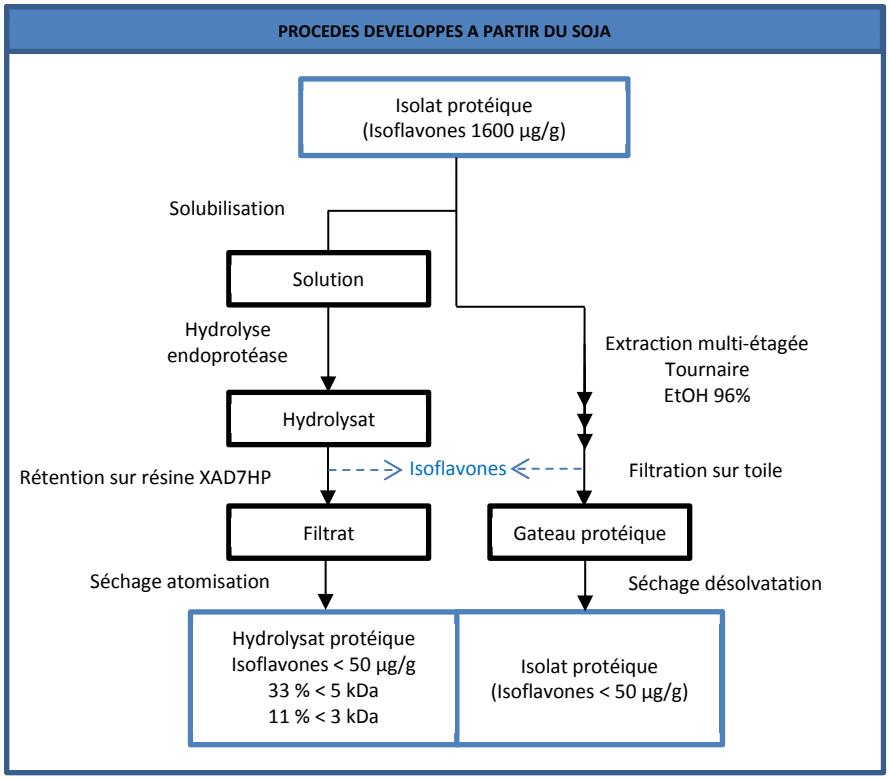
Ces travaux de thèse ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle avec la collaboration de la société Activ'Inside, initiatrice et porteuse du projet SafeProtein. Ce projet vise à développer des ingrédients à haute teneur en protéines végétales destinés à l'alimentation du nourrisson souffrant d'allergies aux protéines de lait ou d'intolérance au lactose. Les isolats protéiques de soja sont utilisés dans les préparations infantiles mais engendrent une exposition aux phytoestrogènes (isoflavones) et à certaines protéines allergènes. Les isolats protéiques de riz destinés à cette application ne sont pas disponibles de par leurs très rares procédés de production. Ces travaux ont permis d'étudier le fractionnement des protéines de soja et de riz dans le but de mettre en place des procédés industriels pour la production de quatre nouveaux produits :

- Un isolat protéique de soja à teneur réduite en isoflavones sous le seuil de 50 µg/g (sur isolat sec et exprimé en équivalent aglycone) ou proche de celui-ci
- Un isolat protéique de riz avec une teneur de minimum 90 % de protéines
- Un hydrolysat de protéines de riz et un hydrolysat de protéines de soja avec un maximum de peptides de très petites tailles inférieures à 3000 Da et permettant de réduire l'allergénicité des produits

Présentation des procédés mis en place pour le développement d'isolat appauvri en isoflavones

Après avoir mis en place la méthode d'analyse HPLC-UV pour le suivi des 12 formes d'isoflavones sur la base de travaux de référence, et la réduction des étapes et de la durée de traitement de l'échantillon, plusieurs matières de soja ont montré de fortes disparités en termes de teneur globale et de profil en isoflavones. Le suivi du profil est complexe car des modifications dues à l'instabilité des formes conjuguées d'isoflavones surviennent très rapidement, une attention particulière a dû être portée sur la conservation de l'échantillon. Les isolats protéiques ont été choisis pour leur teneur déjà très haute en protéines. L'élimination des isoflavones à partir de ce type de produit nécessitait à la fois une très grande efficacité d'extraction et de hauts rendements de récupération en protéines. Deux méthodes ont permis d'atteindre cette performance. En premier lieu, l'étude de l'extraction par éthanol *via* une optimisation à petite échelle, suivie d'une mise à l'échelle industrielle ont permis de développer un premier produit à teneur résiduelle en isoflavones sous 50 µg/g (sur produit sec équivalent aglycones) avec un rendement de récupération des protéines de 94 %. Le second procédé développé a été la rétention des isoflavones sur résine d'adsorption à partir d'un hydrolysat protéique de soja préalablement mis au point, et ceci, par l'utilisation de solutions aqueuses sans étape préalable d'extraction. L'étude a été conduite en mode statique en mini réacteur puis à échelle laboratoire en mode dynamique au travers d'un lit fixe de résine. L'étude des paramètres de débit, volume traité, conditionnement de l'hydrolysat et le suivi du comportement chromatographique des différentes formes d'isoflavones a permis de définir des conditions opératoires précises pour atteindre les objectifs. Le rendement de récupération en protéines

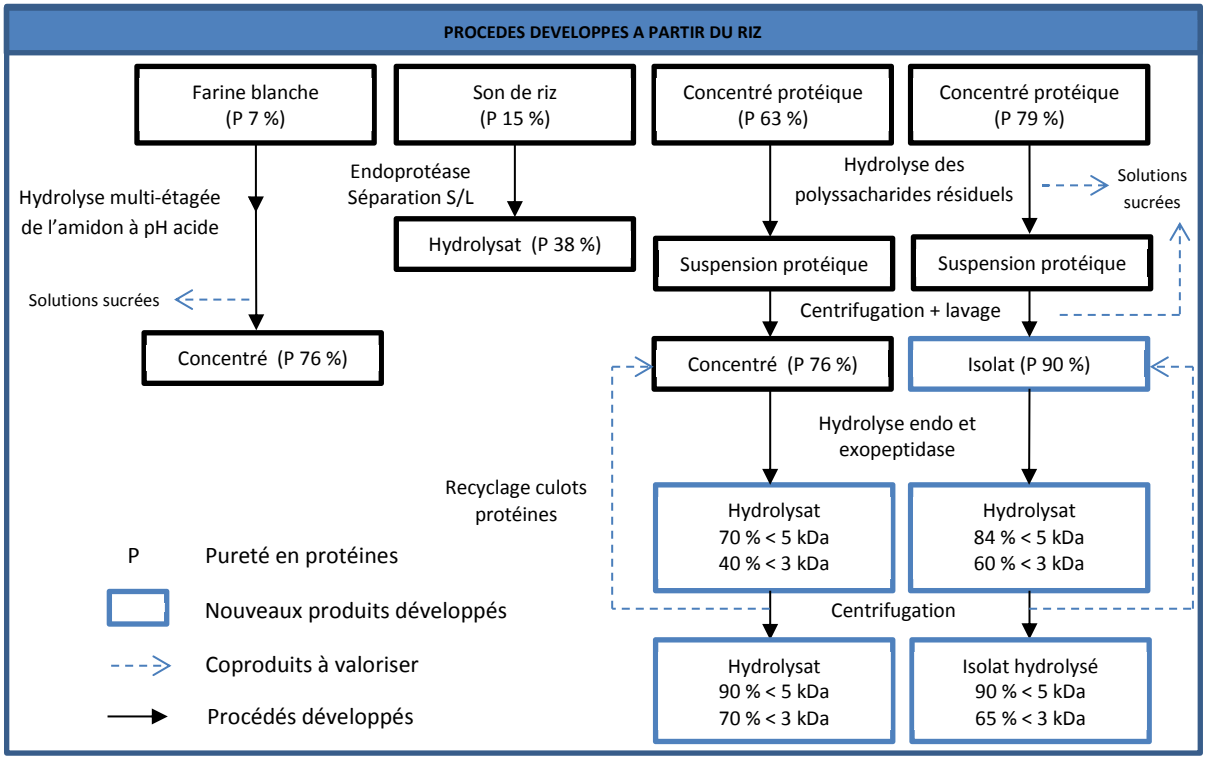
était de 75 à 85 % selon l'échelle étudiée. Le schéma représentatif de ces deux procédés est présenté ci-après.



Procédés d'isolement des protéines de riz par traitements enzymatiques

Ces travaux de thèse ont aussi permis de définir un nouveau procédé pour la production d'isolat protéique de riz, étant donné l'absence d'isolat protéique sur le marché. Le choix de la matière première s'est orienté vers deux concentrés protéiques issus de l'industrie du sirop de glucose. Ces matières sont des résidus protéiques récupérés après hydrolyse de l'amidon et ont des teneurs en protéines de 63 % et 79 %. Le son de riz, contenant 15 % de protéines, est le co-produit le moins cher et est peu utilisé, il a donc été aussi choisi dans l'étude de l'isolement des protéines de riz. La quatrième matière étudiée a été la farine blanche de riz contenant 7 % de protéines. L'hydrolyse des polyssacharides résiduels dans les concentrés a permis, par l'intermédiaire d'enzymes de types cellulolytiques et amylolytiques, de produire un isolat protéique ayant une teneur de plus de 90 % en protéines et, d'autre part un concentré protéique à haute teneur en protéines à partir d'une matière moins coûteuse. Ces travaux ont montré aussi la possibilité de concentrer les protéines de riz à partir de farine blanche avec une teneur finale de 76 % de protéines sur matière sèche qui s'apparente aux teneurs des concentrés protéiques. Ceci a été possible par l'utilisation d'un traitement amylolytiques couramment mis en œuvre dans l'industrie du sirop de glucose à partir de farines de riz bruns. L'apport technique réside dans l'utilisation de conditions limitant la solubilisation des protéines (basses températures et pH acides) qui permettent de favoriser la récupération des protéines. L'étude sur son de riz s'est révélée plus difficile de par la nature plus

complexe de ses constituants polysaccharidiques, lipidiques, et de par la forte agrégation des protéines décrites dans la littérature (Hamada 1997). Ces procédés sont présentés dans le schéma suivant.



Hydrolysats protéiques de soja et de riz et maitrise du profil de poids moléculaires

L'étude de l'hydrolyse des protéines de soja et de riz a été possible par le suivi de différents indicateurs tels que le pH, la solubilité des protéines, le degré d'hydrolyse, le profil de poids moléculaire par électrophorèse et par HP-SEC. Cette dernière méthode a été développée et utilisée pour dresser les profils de poids moléculaire. Des solubilités trop basses ont été constatées par l'utilisation de tampon phosphate souvent proposée dans la littérature. Ceci entraine un biais important dans l'analyse du profil de taille à partir des matières premières, en particulier pour les protéines de riz qui sont moins solubles que celles du soja. En effet ce phénomène favorise grandement la proportion des peptides de faible taille. L'utilisation de SDS a permis d'améliorer la solubilité des protéines et de caractériser les hydrolysats plus précisément.

La production d'hydrolysats de protéines de soja, par l'intermédiaire d'une endoprotéase, a permis essentiellement de pouvoir passer les solutions protéiques aqueuses au travers de résines chromatographiques. Le produit final obtenu (isolat appauvri en isoflavones) contient 33 % de peptides sous 5000 Da et 11 % sous les 3000 Da ce qui est associé à un degré d'hydrolyse de 13 %. Malgré cette hydrolyse partielle, l'électrophorèse semble montrer que les sous-unités α de la β-conglycinine et des chaines acides de la glycinine seraient réduites. Plus d'analyses sont nécessaires pour confirmer la réduction de ces chaines peptidiques caractéristiques.

Le concentré et l'isolat protéique de riz préalablement produits ont été hydrolysés par l'utilisation d'endo et d'exopeptidase. Les résultats ont montré premièrement que l'étape de traitement à l'amylase ou par des enzymes cellulolytiques permet de modifier la matrice par des phénomènes de désagrégation. Ainsi les protéines de riz sont plus solubles et le profil de taille est réduit. Par la suite, le système a montré une hydrolyse importante des protéines jusqu'à des degrés d'hydrolyse de 37 % et 45 % et des profil de masses moléculaires montrant 70 % des protéines dont le poids moléculaire est inférieur 5 kDa pour le concentré hydrolysé, et 84 % dont le poids moléculaire est inférieur 5 kDa pour l'isolat hydrolysé. Une séparation solide/liquide permet d'augmenter ce taux avec 90 % des protéines dont le poids moléculaire est inférieur 5 kDa.

Interactions entre protéines et isoflavones

Par l'étude des différentes méthodes d'extraction des isoflavones, un comportement différent des formes malonyles ont été observés. Ces formes sont celles qui sont le moins bien extraites par l'éthanol. Lors de l'utilisation d'isolat protéique de soja, par les méthodes pressurisées précédemment décrites, les formes malonyles sont fortement retenues par la matrice protéique et quelle que soit la polarité du solvant (très polaire en eau pressurisée et peu polaire en CO_2-SC). Ces résultats ont montré qu'une interaction particulière existe entre les formes malonyles et les protéines de soja. Au vu de la structure anionique de ces formes (terminaisons COO- et groupements hydroxyles ionisables), elles auraient probablement une affinité différente vis-à-vis des protéines ce qui expliquerait qu'elles soient retenues par l'isolat protéique et non pas par la farine de soja, ce que l'on observe sur les systèmes pressurisés. En outre, sur les systèmes d'adsorption, ces formes ont aussi des comportements différents. Elles ont des constantes cinétiques plus fortes que les autres formes en mode statique et elles sont retenues plus facilement sur résine adsorbante en mode dynamique mais uniquement pour un volume traité limité. Leur concentration augmente brusquement en sortie de colonne de résine après une certaine quantité de volume passé. Cette sortie est dépendante du débit contrairement aux autres formes et montrerait ainsi leur entrainement dynamique par certains résidus protéiques. Par ailleurs, ce phénomène n'est plus observé lors de l'utilisation de résines anioniques. Ces résultats suggèreraient que les formes malonyles ont des interactions de type anioniques avec les protéines. Ces résultats rejoignent une autre étude qui a montré, par le suivi des isoflavones lors de la fabrication d'isolats protéiques de soja, qu'elles auraient des interactions hydrophobes avec les protéines mais que les formes malonyles interagissent différemment avec certains résidus protéiques (Speroni, Milesi *et al.* 2010).
L'adsorption des formes modèles de type malonyles devraient être étudié sur protéines de soja dépourvues d'isoflavones pour confirmer cette hypothèse.

Perspectives

A partir des procédés développés, qui ont permis la production de quatre nouveaux produits, une étude des coûts de revien industriel devra être mise en place avant d'initier leur industrialisation puis leur commercialisation (isolat protéique de soja appauvri en isoflavones, hydrolysat partiel de protéine de soja appauvri en isoflavones, isolat protéique de riz, hydrolysat extensif de protéines de riz à haute

teneur en protéines). Une prise en compte des coproduits induits, extraits d'isoflavones, solutions sucrées, devrait pouvoir être intégrée dans les procédés.

Les propriétés hypoallergéniques en tant que telles devront être vérifiées (*in vitro* en premier lieu puis par étude clinique). En parallèle, une hydrolyse plus poussée des protéines de soja sera proposée, par l'intermédiaire d'un traitement par peptidase, pour améliorer potentiellement ces caractéristiques d'hypoallergénicité. Les hydrolysats extensifs de protéines de riz devront aussi faire l'objet d'une étude de réactivité pour déterminer si une étape de séparation solide/liquide est nécessaire. Concernant les ingrédients protéiques de riz, une mise à l'échelle industrielle devra être effectuée en tenant compte des disponibilités de la matière protéique de riz sujette à plus de variation que celle du soja.

Si les études du pouvoir allergène des produits développés montrent que les protéines résiduelles de haut poids moléculaire ne permettent pas d'obtenir des produits hypoallergéniques, alors les profils de taille moléculaire devront être strictement situés sous le seuil de 3000 Da. Pour y parvenir, les procédés de séparation membranaire tels que l'ultrafiltration seront étudiés, notamment dans le cas des protéines de soja qui sont solubles malgré la présence de résidus supérieur à 10000 Da. En effet cette solubilité ne permet pas de séparer les résidus à haut poids moléculaire seulement par centrifugation ce qui est le cas pour les protéines de riz. Un couplage entre traitement par endoprotéase et ultra-filtration pourrait permettre l'élimination des isoflavones en premier lieu en hydrolysant que partiellement les protéines (comme cela a été montré dans ces travaux). Un deuxième étage de filtration couplée à un traitement par exopeptidase cette fois pourrait permettre de récupérer une fraction peptidique contrôlée sous 3000 Da.

Ces travaux de thèse ont aussi montré que l'hydrolyse des protéines de son de riz est possible mais nécessite une étude plus approfondie. Cette matière est abondante, peu coûteuse et peu utilisée. De par sa complexité et sa nature, il serait intéressant d'appliquer des méthodes à fortes contraintes thermo-mécaniques afin de solubiliser les protéines et permettre leur séparation par des méthodes de séparations membranaires

Références bibliographiques

Achouri, A., J. I. Boye and D. Belanger (2005). "Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability." Food Research International **38**(10): 1199-1204.

Adachi, M., J. Kanamori, T. Masuda, K. Yagasaki, K. Kitamura, B. Mikami and S. Utsumi (2003). "Crystal structure of soybean 11S globulin: glycinin A3B4 homohexamer." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7395-7400.

Adebiyi, A. P., A. O. Adebiyi, T. Ogawa and K. Muramoto (2007). "Preparation and characterization of high-quality rice bran proteins." Journal of the Science of Food and Agriculture **87**(7): 1219-1227.

Adlercreutz, H., H. Honjo, A. Higashi, T. Fotsis, E. Hämäläinen, T. Hasegawa and H. Okada (1991). "Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet." The American Journal of Clinical Nutrition **54**(6): 1093-1100.

AFSSA (2005). "Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations."

Agboola, S., D. Ng and D. Mills (2005). "Characterisation and functional properties of Australian rice protein isolates." Journal of Cereal Science **41**(3): 283-290.

Agostoni, C., I. Axelsson, O. Goulet, B. Koletzko, K. F. Michaelsen, J. Puntis, D. Rieu, J. Rigo, R. Shamir, H. Szajewska, D. Turck and E. C. o. Nutrition: (2006). "Soy Protein Infant Formulae and Follow-On Formulae: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **42**(4): 352-361 310.1097/1001.mpg.0000189358.0000138427.cd.

Amnuaycheewa, P. and E. G. de Mejia (2010). "Purification, characterisation, and quantification of the soy allergen profilin (Gly m 3) in soy products." Food Chemistry **119**(4): 1671-1680.

Apinunjarupong, S., S. Lapnirun and C. Theerakulkait (2009). "Preparation and Some Functional Properties of Rice Bran Protein Concentrate at Different Degree of Hydrolysis using Bromelain and Alkaline Extraction." Preparative Biochemistry and Biotechnology **39**(2): 183-193.

Araújo, J. M. A., M. V. Silva and J. B. P. Chaves (2007). "Supercritical fluid extraction of daidzein and genistein isoflavones from soybean hypocotyl after hydrolysis with endogenous β-glucosidases." Food Chemistry **105**(1): 266-272.

Asano, K., K. Shinagawa and N. Hashimoto (1982). "Characterization of Haze-Forming Proteins of Beer and Their Roles in Chill Haze Formation." American Society of Brewing Chemists **40**: 01-47.

Baber, R. (2010). "Phytoestrogens and post reproductive health." Maturitas **66**(4): 344-349.

Bandyopadhyay, K., G. Misra and S. Ghosh (2008). "Preparation and Characterisation of Protein Hydrolysates from Indian Defatted Rice Bran Meal." Journal of Oleo Science **57**(1): 47-52.

Barnes, S. (2010). "The Biochemistry, Chemistry and Physiology of the Isoflavones in Soybeans and their Food Products." Lymphatic Research and Biology **8**(1): 89-98.

Barnes, S., L. Coward, M. Kirk and J. Sfakianos (1998). "HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) **217**(3): 254-262.

Barnes, S., M. Kirk and L. Coward (1994). "Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry." J. Agric. Food Chem. **42**(11): 2466-2474.

Benedetti, S., E. S. Prudêncio, J. M. G. Mandarino, K. Rezzadori and J. C. C. Petrus (2011). "Concentration of soybean isoflavones by nanofiltration and the effects of thermal treatments on the concentrate." Food Research International **50**(2): 625–632.

Bennetau-Pelissero, C., B. B. Breton, B. Bennetau, G. Corraze, F. Le Menn, B. Davail-Cuisset, C. Helou and S. J. Kaushik (2001). "Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout Oncorhynchus mykiss." Gen Comp Endocrinol **121**(2): 173-187.

Bennetau-Pelissero, C., P. Sauvant, G. Peltre, P. Auriol, A. Rocca and F. Rancé (2004). "Phyto-œstrogènes du soja : problèmes posés chez le nourrisson allergique au lait de vache et consommant des formules à base de soja." Cahiers de Nutrition et de Diététique **39**(1): 24-32.

Berk, Z. (1992). Technology of production of edible flours and protein products from soybeans, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome.

Cagampang, G. B., L. J. Cruz, S. G. Espiritu, R. G. Santiago and B. O. Juliano (1966). "Studies on the extraction and composition of rice protein." Cereal Chemistry **43**(2): 145-155.

Chandra, A. and M. G. Nair (1996). "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Daidzein and Genistein from Soybean Products." Phytochemical Analysis **7**(5): 259-262.

Chen, L. and D. Houston, F. (1970). Solubilization and Recovery of Protein from Defatted rice Bran. AACC Meeting. Chicago. **47**.

Cho, S. Y., Y. N. Lee and H. J. Park (2009). "Optimization of ethanol extraction and further purification of isoflavones from soybean sprout cotyledon." Food Chemistry **117**(2): 312-317.

Collison, M. W. (2008). "Determination of Total Soy Isoflavones in Dietary Supplements, Supplement Ingredients, and Soy Foods by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: Collaborative Study." Journal of AOAC International **91**(3): 489-500.

Cordle, C. T. (2004). "Soy Protein Allergy: Incidence and Relative Severity." The Journal of Nutrition **134**(5): 1213S-1219S.

Danielsson, C. E. (1949). "Seed globulins of the Gramineae and Leguminosae." Biochemical Journal **44**(4): 387-400.

Du Toit, G., R. Meyer, N. Shah, R. G. Heine, M. A. Thomson, G. Lack and A. T. Fox (2010). "Identifying and managing cow's milk protein allergy." Archives of disease in childhood - Education & practice edition **95**(5): 134-144.

Dubuisson, C., S. L. Vieille and A. Martin (2002). Allergies alimentaires : Etat des lieux et propositions d'orientations, AFFSA.

El-Agamy, E. I. (2007). "The challenge of cow milk protein allergy." Small Ruminant Research **68**(1–2): 64-72.

Eldridge, A. C. (1982). "Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates, and isolates." J. Agric. Food Chem. **30**(2): 353-355.

European Food Safety Authority, P. o. D. P., Nutrition and Allergies (NDA) (2014). "Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae." EFSA Journal.

Fabian, C. and Y. H. Ju (2011). "A Review on Rice Bran Protein: Its Properties and Extraction Methods." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **51**(9): 816-827.

Frémeaux, P. and J. Leybros (1990). "Extraction solide-liquide. Aspects théoriques." Techniques de l'Ingénieur.

Frias, J., Y. S. Song, C. Martínez-Villaluenga, E. G. l. De Mejia and C. Vidal-Valverde (2008). "Immunoreactivity and Amino Acid Content of Fermented Soybean Products." J. Agric. Food Chem. **56**(1): 99-105.

Friedman, M., C. E. Levin and A. T. Noma (1984). "Factors Governing Lysinoalanine Formation in Soy Proteins." Journal of Food Science **49**(5): 1282-1288.

Fritsché, R. (1998). "Induction of oral tolerance to cow's milk proteins in rats fed with a whey protein hydrolysate." Nutrition Research **18**(8): 1335-1341.

Fritshe, R. and L. Bovetto (2006). Hypoallergenic formulae inducing oral tolerance to soy proteins. Europe. **EP1236405B1**.

Giles, C. H., D. Smith and A. Huitson (1974). "A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical." Journal of Colloid and Interface Science **47**(3): 755-765.

Godon, B. (1996). Protéines végétales, Technique & Documentation, Lavoisier.

González-De-Olano, D., C. Pastor-Vargas, M. S. Pérez-Bustamante, A. S. Maroto, E. González-Mancebo, M. Gandolfo-Cano and B. Bartolomé (2012). "Occupational allergy to rice involving α-amylase inhibitor as the relevant allergen." Annals of Allergy, Asthma & Immunology **109**(1): 71-72.

González-Rábade, N., J. A. Badillo-Corona, J. S. Aranda-Barradas and M. d. C. Oliver-Salvador (2011). "Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review." Biotechnology Advances **29**(6): 983-996.

Gremli, H. and B. O. Juliano (1970). "Studies on alkali-soluble, rice-bran hemicelluloses." Carbohydrate Research **12**(2): 273-276.

Gugger, E. T. and D. G. Dueppeu (1997). Production of isoflavone enriched from soy protein extracts.

Gupta, S., G. K. Chandi and D. S. Sogi (2008). "Effect of Extraction Temperature on Functional Properties of Rice Bran Protein Concentrates." International Journal of Food Engineering **4**(2).

Hamada, J. S. (1997). "Characterization of Protein Fractions of Rice Bran to Devise Effective Methods of Protein Solubilization." Cereal Chemistry Journal **74**(5): 662-668.

Hamada, J. S. (1999). "Use of proteases to enhance solubilization of rice bran proteins." Journal of Food Biochemistry **23**(3): 307-321.

Hamada, J. S. (2000). "Characterization and Functional Properties of Rice Bran Proteins Modified by Commercial Exoproteases and Endoproteases." Journal of Food Science **65**(2).

Hameed, B. H., I. A. W. Tan and A. L. Ahmad (2008). "Adsorption isotherm, kinetic modeling and mechanism of 2,4,6-trichlorophenol on coconut husk-based activated carbon." Chemical Engineering Journal **144**(2): 235-244.

Han, S.-W., K.-M. Chee and S.-J. Cho (2015). "Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein." Food Chemistry **172**(0): 766-769.

Harjo, B., C. Wibowo, E. J. N. Zhang, K. Q. Luo and K. M. Ng (2006). "Development of Process Alternatives for Separation and Purification of Isoflavones." Industrial & Engineering Chemistry Research **46**(1): 181-189.

Hosny, M. and J. P. N. Rosazza (2002). "New Isoflavone and Triterpene Glycosides from Soybeans." Journal of Natural Products **65**(6): 805-813.

Hutabarat, L. S., H. Greenfield and M. Mulholland (2000). "Quantitative determination of isoflavones and coumestrol in soybean by column liquid chromatography." Journal of Chromatography A **886**(1): 55-63.

Jankowiak, L., D. Méndez Sevillano, R. M. Boom, M. Ottens, E. Zondervan and A. J. van der Goot (2015). "A Process Synthesis Approach for Isolation of Isoflavones from Okara." Industrial & Engineering Chemistry Research **54**(2): 691-699.

Johns, P., J. Suh and A. Daab-Krzykowski (2000). Process for isolating phytoestrogens from plant protein. **US006020471A**.

Jou, H. J., S. C. Wu, F. W. Chang, P. Y. Ling, K. S. Chu and W. H. Wu (2008). "Effect of intestinal production of equol on menopausal symptoms in women treated with soy isoflavones." Int J Gynaecol Obstet **102**(1): 44-49.

Ju, Z. Y., N. S. Hettiarachchy and N. Rath (2001). "Extraction, denaturation and hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins." Journal of Food Science **66**(2): 229-232.

Juliano, B. O. (1994). Le riz dans la nutrition humaine, Collection FAO: Alimentation et nutrition

Jung, S., A. Mahfuz and D. Maurer (2009). "Structure, Protein Interactions and In Vitro Protease Accessibility of Extruded and Pressurized Full-Fat Soybean Flakes." Journal of the American Oil Chemists' Society **86**(5): 475-483.

Jung, S., P. A. Murphy and I. Sala (2008). "Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans." Food Chemistry **111**(3): 592-598.

K. Hilaly, A., B. Sandage and J. Soper (2004). Process for producing high purity isoflavones. US. **7,524,526B2**.

Kammerer, J., R. Carle and D. R. Kammerer (2010). "Adsorption and Ion Exchange: Basic Principles and Their Application in Food Processing." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(1): 22-42.

Kao, T.-H., J.-T. Chien and B.-H. Chen (2008). "Extraction yield of isoflavones from soybean cake as affected by solvent and supercritical carbon dioxide." Food Chemistry **107**(4): 1728-1736.

Kao, T. H., Y. F. Lu and B. H. Chen (2005). "Preparative column chromatography of four groups of isoflavones from soybean cake." European Food Research and Technology **221**(3-4): 459-465.

Kinsella, J. (1979). "Functional properties of soy proteins." Journal of the American Oil Chemists' Society **56**(3): 242-258.

Klejdus, B., L. Lojková, O. Lapčík, R. Koblovská, J. Moravcová and V. Kubáň (2005). "Supercritical fluid extraction of isoflavones from biological samples with ultra-fast high-performance liquid chromatography/mass spectrometry." Journal of Separation Science **28**(12): 1334-1346.

Klejdus, B., R. Mikelová, V. Adam, J. Zehnálek, J. Vacek, R. Kizek and V. Kubáň (2004). "Liquid chromatographic–mass spectrometric determination of genistin and daidzin in soybean food samples after accelerated solvent extraction with modified content of extraction cell." Analytica Chimica Acta **517**(1-2): 1-11.

Klemola, T., T. Vanto, K. Juntunen-Backman, K. Kalimo, R. Korpela and E. Varjonen (2002). "Allergy to soy formula and to extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy: A prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years." The Journal of Pediatrics **140**(2): 219-224.

Klump, S. P., M. C. Allred, J. L. MacDonald and J. M. Ballam (2001). "Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy by extraction, saponification, and liquid chromatography: collaborative study." Journal of AOAC International **84**(6): 1865-1883.

Krishnan, H. B., J. A. White and S. G. Pueppke (1992). "Characterization and localization of rice (Oryza sativa L.) seed globulins." Plant Science **81**(1): 1-11.

Lai, Y. P., M. Mondor, C. Moresoli, H. Drolet, M. Gros-Louis, D. Ippersiel, F. Lamarche and Y. Arcand (2013). "Production of soy protein isolates with low phytic acid content by membrane technologies: Impact of the extraction and ultrafiltration/diafiltration conditions." Journal of Food Engineering **114**(2): 221-227.

Lapčík, O. (2007). "Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule?" Phytochemistry **68**(22–24): 2909-2916.

Lawhon, J. T., I. K. Rhee and E. W. Lusas (1981). "Soy Protein Ingredients Prepared by New Processes Aqueous Processing and Industrial Membrane Isolation." Journal of the American Oil Chemists' Society **58**(3): 377-384.

Le Bourvellec, C. and C. M. G. C. Renard (2012). "Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **52**(3): 213-248.

Lee, J. O., S. I. Lee, S. H. Cho, C. K. Oh and C. H. Ryu (2004). "A new technique to produce hypoallergenic soybean proteins using three different fermenting microorganism." Journal of Allergy and Clinical Immunology **113**(2, Supplement): S239.

Li-Hsun, C., C. Ya-Chuan and C.-M. J. Chang (2007). "Continuous hot pressurized fluids extraction of isoflavones and soyasaponins from defatted soybean flakes." Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers **38**(3-4): 313-319.

Li-Hsun, C., C. Ya-Chuan and C. Chieh-Ming (2004). "Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures." Food Chemistry **84**(2): 279-285.

Li, H., J. Liu, D. Li and H. Wang (2012). "Study on Separation and Purification of Genistein in the Soybean Residue Using Macroporous Resin Adsorption." Industrial & Engineering Chemistry Research **51**(1): 44-49.

Li, H., K. Zhu, H. Zhou and W. Peng (2012). "Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula." Food Chemistry **132**(2): 808-814.

Li, H., K. Zhu, H. Zhou, W. Peng and X. Guo (2013). "Comparative Study About Some Physical Properties, In vitro Digestibility and Immunoreactivity of Soybean Protein Isolate for Infant Formula." Plant Foods for Human Nutrition **68**(2): 124-130.

Liener, I. E. (1994). "Implications of antinutritional components in soybean foods." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **34**(1): 31-67.

Limousin, G., J. P. Gaudet, L. Charlet, S. Szenknect, V. Barthès and M. Krimissa (2007). "Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement." Applied Geochemistry **22**(2): 249-275.

Lin, L., H. Zhao, Y. Dong, B. Yang and M. Zhao (2012). "Macroporous resin purification behavior of phenolics and rosmarinic acid from Rabdosia serra (MAXIM.) HARA leaf." Food Chemistry **130**(2): 417-424.

Liu, W., Z. L. Wu, Y. J. Wang, R. Li, N. N. Yin and J. X. Jiang (2014). "Separation of isoflavone aglycones using chitosan microspheres from soy whey wastewater after foam fractionation and acidic hydrolysis." Journal of Industrial and Engineering Chemistry **25**: 138–144.

Lopes Barbosa, A. C., F. M. Lajolo and M. I. Genovese (2006). "Influence of temperature, pH and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates." Food Chemistry **98**(4): 757-766.

Lotan, R., H. W. Siegelman, H. Lis and N. Sharon (1974). "Subunit Structure of Soybean Agglutinin." Journal of Biological Chemistry **249**(4): 1219-1224.

Lumia, G. (2011). Extraction par fluide supercritique. Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs. F. Chemat, Dunod.

Luthria, D., R. Biswas and S. Natarajan (2007). "Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean." Food Chemistry **105**(1): 325-333.

Mahmoud, M. I., W. T. Malone and C. T. Cordle (1992). "Enzymatic Hydrolysis of Casein: Effect of Degree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties." Journal of Food Science **57**(5): 1223-1229.

Malaypally, S. P. and B. Ismail (2010). "Effect of Protein Content and Denaturation on the Extractability and Stability of Isoflavones in Different Soy Systems." J. Agric. Food Chem. **58**(16): 8958-8965.

Maldonado, J., A. Gil, E. Narbona and J. A. Molina (1998). "Special formulas in infant nutrition: a review." Early Human Development **53**(1): S23-S32.

Marini, H., A. Bitto, D. Altavilla, B. P. Burnett, F. Polito, V. Di Stefano, L. Minutoli, M. Atteritano, R. M. Levy, R. D'Anna, N. Frisina, S. Mazzaferro, F. Cancellieri, M. L. Cannata, F. Corrado, A. Frisina, V. Adamo, C. Lubrano, C. Sansotta, R. Marini, E. B. Adamo and F. Squadrito (2008). "Breast safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: a follow-up study." J Clin Endocrinol Metab **93**(12): 4787-4796.

Maruyama, N., M. Adachi, K. Takahashi, K. Yagasaki, M. Kohno, Y. Takenaka, E. Okuda, S. Nakagawa, B. Mikami and S. Utsumi (2001). "Crystal structures of recombinant and native soybean β-conglycinin β homotrimers." European Journal of Biochemistry **268**(12): 3595-3604.

Masel, R. l. (1996). Principles of Adsorption and Reaction on Solid Surfaces, Wiley-Blackwell.

Messina, M. (2010). "Insights gained from 20 years of soy research." J Nutr **140**(12): 2289s-2295s.

Montgomery, J. M. (1985). Water treatment: principles and design, Montgomery, J.M.

Moongngarm, A., N. Daomukda and S. Khumpika (2012). "Chemical Compositions, Phytochemicals, and Antioxidant Capacity of Rice Bran, Rice Bran Layer, and Rice Germ." APCBEE Procedia **2**: 73-79.

Morita, T. and S. Kiriyama (1993). "Mass Production Method for Rice Protein Isolate and Nutritional Evaluation." Journal of Food Science **58**(6): 1393-1396.

Moure, A., J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. a. José Núñez and J. C. Parajó (2001). "Natural antioxidants from residual sources." Food Chemistry **72**(2): 145-171.

Münzing, K. (1991). "DSC studies of starch in cereal and cereal products." Thermochimica Acta **193**: 441-448.

Murphy, P. A., K. Barua and C. C. Hauck (2002). "Solvent extraction selection in the determination of isoflavones in soy foods." Journal of Chromatography B **777**(1): 129-138.

Murphy, P. A. H., J.; Barua,K.; Hauck, C.C. (2008). "Group B Saponins in Soy Products in the U.S. Department of Agricultures Iowa State University Isoflavone Database and Their Comparison with Isoflavone Contents." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**: 8534-8540.

Mustafa, A. and C. Turner (2011). "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review." Anal Chim Acta **703**(1): 8-18.

Nakada, M., M. Imai and I. Suzuki (2009). "Impact of ethanol addition on the solubility of various soybean isoflavones in supercritical carbon dioxide and the effect of glycoside chain in isoflavones." Journal of Food Engineering **95**(4): 564-571.

Nakamura, Y., S. Tsuji and Y. Tonogai (2000). "Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake." Journal of AOAC International **83**(3): 635-650.

Nations, F. a. A. O. o. U. (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation. F. F. A. N. PAPER. Rome, FAO. **92**.

Nielsen, N. (1985). "The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans." Journal of the American Oil Chemists' Society **62**(12): 1680-1686.

Nielsen, P. M., D. Petersen and C. Dambmann (2001). "Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis." Journal of Food Science **66**(5): 642-646.

Okita, T. W., Y. S. Hwang, J. Hnilo, W. T. Kim, A. P. Aryan, R. Larson and H. B. Krishnan (1989). "Structure and expression of the rice glutelin multigene family." Journal of Biological Chemistry **264**(21): 12573-12581.

Osborne, T. B. (1909). The vegetable proteins. London [etc.], Longmans, Green.

Pauli, G. (2011). "Allergènes végétaux alimentaires identifiés (en dehors de l'arachide)." Revue Française d'Allergologie **51**(1): 56-62.

Pediatrics, A. A. o. (2000). "Hypoallergenic Infant Formulas." American Academy of Pediatrics.

Peñas, E., R. Gomez, J. Frias, M. L. Baeza and C. Vidal-Valverde (2011). "High hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products." Food Chemistry **125**(2): 423-429.

Plietz, P., B. Drescher and G. Damaschun (1987). "Relationship between the amino acid sequence and the domain structure of the subunits of the 11S seed globulins." International Journal of Biological Macromolecules **9**(3): 161-165.

Pollard, M. and M. A. Suckow (2006). "Dietary Prevention of Hormone Refractory Prostate Cancer in Lobund-Wistar Rats: A Review of Studies in a Relevant Animal Model." Comparative Medicine **56**(6): 461-467.

Pourali, O., F. S. Asghari and H. Yoshida (2009). "Sub-critical water treatment of rice bran to produce valuable materials." Food Chemistry **115**(1): 1-7.

Pyo, D., J. Yoo and J. Surh (2009). "Comparison of Supercritical Fluid Extraction and Solvent Extraction of Isoflavones from Soybeans." Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies **32**(7): 923-932.

Qi, W., Y. Yu and Z. He (2006). "Quantitative analysis of complex casein hydrolysates based on chromatography and membrane." Frontiers of Chemistry in China **1**(2): 199-202.

Rickert, D. A., M. A. Meyer, J. Hu and P. A. Murphy (2004). "Effect of Extraction pH and Temperature on Isoflavone and Saponin Partitioning and Profile During Soy Protein Isolate Production." Journal of Food Science **69**(8): C623-C631.

Rostagno, M. A., J. M. A. Araújo and D. Sandi (2002). "Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour." Food Chemistry **78**: 111-117.

Rostagno, M. A., M. Palma and C. G. Barroso (2004). "Pressurized liquid extraction of isoflavones from soybeans." Analytica Chimica Acta **522**(2): 169-177.

Rostagno, M. A., A. Villares, E. Guillamon, A. Garcia-Lafuente and J. A. Martinez (2009). "Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods." J Chromatogr A **1216**(1): 2-29.

Rougé, P., E. Brunet, J. P. Borges, A. Jauneau, B. Saggio, T. Bourrier, F. Rancé, A. Didier and A. Barre (2011). "Les protéines à motif cupine : allergènes majeurs des graines." Revue Française d'Allergologie **51**(1): 36-40.

Rudzinski, W. and W. Plazinski (2006). "Kinetics of Solute Adsorption at Solid/Solution Interfaces: A Theoretical Development of the Empirical Pseudo-First and Pseudo-Second Order Kinetic Rate Equations, Based on Applying the Statistical Rate Theory of Interfacial Transport." The Journal of Physical Chemistry B **110**(33): 16514-16525.

Saitoh, S., M. Urushibata, K. Ikuta, A. Fujimaki and H. Harada (2000). "Antigenicity in soybean hypocotyls and its reduction by twin-screw extrusion." Journal of the American Oil Chemists' Society **77**(4): 419-424.

Saperstein, S. (1965). Preparing hypoallergenic milk protein composition. U. S. P. Office. US. **US3174866**.

Schreihofer, D. A. (2015). Chapter 39 - Neuroprotection by Dietary Isoflavones and Their Role in Cerebral Ischemia. Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease. R. R. W. R. Preedy. San Diego, Academic Press**:** 385-394.

Sereewatthanawut, I., S. Prapintip, K. Watchiraruji, M. Goto, M. Sasaki and A. Shotipruk (2008). "Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis." Bioresour Technol **99**(3): 555-561.

Shao, S. (2009). "Tracking isoflavones: From soybean to soy flour, soy protein isolates to functional soy bread." Journal of Functional Foods **1**(1): 119-127.

Shao, S., A. M. Duncan, R. Yang, M. F. Marcone, I. Rajcan and R. Tsao (2011). "Systematic evaluation of pre-HPLC sample processing methods on total and individual isoflavones in soybeans and soy products." Food Research International **44**(8): 2425-2434.

Shaw, L. J., P. Morris and J. E. Hooker (2006). "Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms." Environmental Microbiology **8**(11): 1867-1880.

Shewry, P. R. and N. G. Halford (2002). "Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization." Journal of Experimental Botany **53**(370): 947-958.

Shi, Y., X. Kong, C. Zhang, Y. Chen and Y. Hua (2013). "Adsorption of soy isoflavones by activated carbon: Kinetics, thermodynamics and influence of soy oligosaccharides." Chemical Engineering Journal **215-216**: 113-121.

Shibuya, N. and T. Iwasaki (1985). "Structural features of rice bran hemicellulose." Phytochemistry **24**(2): 285-289.

Shih, F. and K. Daigle (2000). "Preparation and characterization of rice protein isolates." Journal of the American Oil Chemists' Society **77**(8): 885-889.

Singh, G. (2010). The soybean: Botany, Production and Uses, CABI International.

Sissons, J. W., A. Nyrup, P. J. Kilshaw and R. H. Smith (1982). "Ethanol denaturation of soya bean protein antigens." Journal of the Science of Food and Agriculture **33**(8): 706-710.

Smith, A. K. and S. J. Circle (1938). "Peptization of Soybean Proteins Extraction of Nitrogenous Constituents from Oil-Bases with and Without Added Slats." Industrial & Engineering Chemistry **30**(12): 1414-1418.

Smith, A. K. and S. J. Circle (1939). "Soybean protein." Industral and engineering chemistry **31**(10): 1284-1288.

Song, Y. S., J. Frias, C. Martinez-Villaluenga, C. Vidal-Valdeverde and E. G. de Mejia (2008). "Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products." Food Chemistry **108**(2): 571-581.

Spellman, D., E. McEvoy, G. O'Cuinn and R. J. FitzGerald (2003). "Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis." International Dairy Journal **13**(6): 447-453.

Speroni, F., V. Milesi and M. C. Añón (2010). "Interactions between isoflavones and soybean proteins: Applications in soybean-protein–isolate production." LWT - Food Science and Technology **43**(8): 1265-1270.

Subramanian, S., G. Stacey and O. Yu (2007). "Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation." Trends in Plant Science **12**(7): 282-285.

Suh, J., K. Ostrom and L. Ndife (2002). Process for treating plant proteins and nutritional products made therefrom. Europe. **EP0929231B1**.

Sunphorka, S., W. Chavasiri, Y. Oshima and S. Ngamprasertsith (2012). "Kinetic studies on rice bran protein hydrolysis in subcritical water." The Journal of Supercritical Fluids **65**(0): 54-60.

Tavano, O. L. (2013). "Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **90**(0): 1-11.

Tikkanen, M. J. and H. Adlercreutz (2000). "Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens: Could they have a role in coronary heart disease prevention?" Biochemical Pharmacology **60**(1): 1-5.

Tsumura, K., W. Kugimiya, N. Bando, M. Hiemori and T. Ogawa (1999). "Preparation of Hypoallergenic Soybean Protein with Processing Functionality by Selective Enzymatic Hydrolysis." Food Science and Technology Research **5**(2): 171-175.

Van de Lagemaat, J., J. Manuel Silván, F. Javier Moreno, A. Olano and M. Dolores del Castillo (2007). "In vitro glycation and antigenicity of soy proteins." Food Research International **40**(1): 153-160.

Vandenplas, Y., E. De Greef, T. Devreker and B. Hauser (2011). "Soy infant formula: is it that bad?" Acta Paediatrica **100**(2): 162-166.

Viegas, R. C., M. Campinas, H. Costa and M. Rosa (2014). "How do the HSDM and Boyd's model compare for estimating intraparticle diffusion coefficients in adsorption processes." Adsorption **20**(5-6): 737-746.

Villares, A., M. A. Rostagno, A. García-Lafuente, E. Guillamón and J. A. Martínez (2010). "Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of the Production Process." Food and Bioprocess Technology **4**(1): 27-38.

Vupadhyayula, P. M., J. C. Gallagher, T. Templin, S. M. Logsdon and L. M. Smith (2009). "Effects of soy protein isolate on bone mineral density and physical performance indices in postmenopausal women-a 2-year randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Menopause **16**(2): 320-328 310.1097/gme.1090b1013e3181844893.

Wang, H. and P. A. Murphy (1994). "Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods." J. Agric. Food Chem. **42**(8): 1666-1673.

Wang, L. and C. L. Weller (2006). "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants." Trends in Food Science & Technology **17**(6): 300-312.

Wang, M., N. S. Hettiarachchy, M. Qi, W. Burks and T. Siebenmorgen (1998). "Preparation and Functional Properties of Rice Bran Protein Isolate." J. Agric. Food Chem. **47**(2): 411-416.

Wang, T., G. X. Qin, Z. W. Sun and Y. Zhao (2014). "Advances of research on glycinin and beta-conglycinin: a review of two major soybean allergenic proteins." Crit Rev Food Sci Nutr **54**(7): 850-862.

Watchararuji, K., M. Goto, M. Sasaki and A. Shotipruk (2008). "Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal." Bioresour Technol **99**(14): 6207-6213.

Wen, T.-N. and D. S. Luthe (1985). "Biochemical Characterization of Rice Glutelin." Plant Physiology **78**(1): 172-177.

Werner J. Bauer, Raphaël Badoud, Jürg Löliger and Alain Etournaud (2010). Science et technologie des aliments, Principe de chimie des constituants et technologie des procédés, Presses polytechniques et universitaires romandes.

Wiboonsirikul, J., Y. Kimura, Y. Kanaya, T. Tsuno and S. Adachi (2008). "Production and Characterization of Functional Substances from a By-Product of Rice Bran Oil and Protein Production by a Compressed Hot Water Treatment." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **72**(2): 384-392.

Wilson, S., K. Blaschek and E. G. de Mejia (2005). "Allergenic Proteins in Soybean: Processing and Reduction of P34 Allergenicity." Nutrition Reviews **63**(2): 47-58.

Wu, A. H., M. C. Yu, C. C. Tseng and M. C. Pike (2008). "Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk." British Journal of Cancer **98**(1): 9-14.

Wu, X. and J. Kang (2011). Phytochemicals in Soy and Their Health Effects InTech.

Xia, N., J.-M. Wang, Q. Gong, X.-Q. Yang, S.-W. Yin and J.-R. Qi (2012). "Characterization and In Vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction." Journal of Cereal Science **56**(2): 482-489.

Xia, N., J. Wang, X. Yang, S. Yin, J. Qi, L. Hu and X. Zhou (2012). "Preparation and characterization of protein from heat-stabilized rice bran using hydrothermal cooking combined with amylase pretreatment." Journal of Food Engineering **110**(1): 95-101.

Xiao, M., J. Ye, X. Tang and Y. Huang (2011). "Determination of soybean isoflavones in soybean meal and fermented soybean meal by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC)." Food Chemistry **126**(3): 1488-1492.

Yamagishi, T., K. Matsuda and T. Watanabe (1975). "Isolation and partial characterization of proteoglycans from rice bran." Carbohydrate Research **43**(2): 321-333.

Yan, L. and E. L. Spitznagel (2009). "Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis." Am J Clin Nutr **89**(4): 1155-1163.

Yang, S., L. Wang, Q. Yan, Z. Jiang and L. Li (2009). "Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable β-glucosidase from Paecilomyces thermophila." Food Chemistry **115**(4): 1247-1252.

Young, V. R. and P. L. Pellett (1994). "Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition." The American Journal of Clinical Nutrition **59**(5): 1203S-1212S.

Zafra-Gómez, A., A. Garballo, L. E. García-Ayuso and J. C. Morales (2010). "Improved sample treatment and chromatographic method for the determination of isoflavones in supplemented foods." Food Chemistry **123**(3): 872-877.

Zuo, Y. B., A. W. Zeng, X. G. Yuan and K. T. Yu (2008). "Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous methanol modified supercritical carbon dioxide." Journal of Food Engineering **89**(4): 384-389.

Résumé

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont pour but de développer des procédés industriels pour la production de quatre ingrédients alimentaires infantiles ayant des propriétés hypoallergéniques et des teneurs réduites en phytoestrogènes. Les propriétés nutritionnelles des protéines de riz et de soja en font des sources intéressantes. Néanmoins, plusieurs problématiques liées aux caractéristiques des produits apparaissent aujourd'hui : la présence de phytoestrogènes (isoflavones) dans les isolats protéiques de soja ; la difficulté à solubiliser et isoler les protéines de riz et la forte allergénicité des protéines dans le cas du soja. Ces travaux présentent l'étude du fractionnement des protéines de soja et de riz pour le développement : d'isolat protéique à teneur réduite en isoflavones ; isolat protéique de riz ayant une teneur supérieure à 90% de protéines ; hydrolysats protéiques de soja et de riz dont le profil de poids moléculaire est maitrisé et potentiellement hypoallergénique. Afin d'y parvenir, la réduction de la taille des protéines par des processus enzymatiques puis le contrôle de leur poids moléculaire ont dû être étudiés. Concernant l'élimination des phytoestrogènes (isoflavones), deux méthodes ont permis d'atteindre de hauts rendements d'extractions. En premier lieu, l'étude de l'extraction par éthanol *via* une optimisation à petite échelle, suivie d'une mise à l'échelle industrielle ont permis de développer un premier produit à teneur résiduelle en isoflavones inférieure à 50 µg/g de produit sec représentant une réduction de près de 98% de la teneur en isoflavones. Le second procédé étudié a été la rétention des isoflavones sur résine d'adsorption à partir d'un hydrolysat protéique de soja préalablement mis au point, et ceci, par l'utilisation de solution aqueuse sans étape préalable d'extraction. Ce procédé a fait l'objet d'une mise à l'échelle industrielle et d'une étude du comportement chromatographique des isoflavones. L'extraction des isoflavones par eau subcritique et CO_2 supercritique est aussi présentée dans cette thèse. Elle a permis de mettre en évidence l'influence de la polarité des différents composés et de la teneur en protéines des produits de soja utilisés. Ces travaux de thèse ont aussi permis de définir un nouveau procédé pour la production d'isolat protéique de riz par l'intermédiaire d'enzymes de types cellulolytiques et amylases, à partir de coproduits issus de l'industrie du sirop de glucose. Des études sur des matières moins transformées telles que le son de riz et la farine ont aussi été étudiées pour la concentration des protéines. L'étude de l'hydrolyse des protéines de soja et de riz a été possible par le suivi de différents indicateurs tels que le pH, la solubilité des protéines, le degré d'hydrolyse, le profil de poids moléculaire par électrophorèse et par chromatographie d'exclusion stérique. Ces procédés ont permis la production de quatre nouveaux ingrédients pouvant être testés pour leurs caractéristiques hypoallergéniques avant une éventuelle production industrielle.

Abstract

The objectives of these works were to develop industrial processes for the production of four infant food ingredients with hypoallergenic properties and reduced levels of phytoestrogens. For this purpose, the nutritional properties of the rice and soy protein are promising. However, due to the presence of phytoestrogens (isoflavones) the consumption of soy protein isolates is a big concern for infant food security because the high exposure to these compounds, known to be endocrine disruptors. Consequently, it was first intended to develop a soy protein isolate with reduced content of isoflavones below 50 µg/g following the recommendations of French and European health authorities. Rice protein isolates are either non-existent on the market, or extremely rare. Therefore, the development of rice protein isolate with a minimum content of 90 % protein was another objective. For the sensitive population, such as infants, the aim of this work was also to develop soy and rice protein hydrolysates conferring hypoallergenic properties. To achieve this goal, the reduction of the size of proteins and the control of their molecular weight was studied. Two methods were used to achieve high extractions yields. A study of ethanol extraction ranging from small-scale optimization to industrial scale was used for a final product with a residual content in isoflavones below 50 µg/g. The second method was to retain isoflavones on adsorption resin from a soy protein hydrolysate. This was possible without preliminary extraction step by solvent. This method was also tested in the industrial scale. The chromatographic behavior of different isoflavones was also studied. The extraction of isoflavones with subcritical water and supercritical CO2 is also presented in this thesis even though these methods were not retained. These pressurized extractions showed the influence of the polarity of isoflavones and the protein content of soy products onto the isoflavone extraction. These works also identified a novel process for the production of rice protein isolate by the hydrolysis of polysaccharides with cellulolytic enzymes and amylases from concentrated protein byproducts from the glucose syrup industry. Studies on less processed materials such as rice bran and flour were also studied for protein isolation. The study of the hydrolysis by proteases of soy and rice proteins were monitored by various indicators such as pH, protein solubility, the degree of hydrolysis, the molecular weight profile by electrophoresis, and size exclusion chromatography. These processes are enabled for the production of four new ingredients that will be tested for their hypoallergenic characteristics before a large scale production.