Emulgateurs peptidiques obtenus par l'hydrolyse enzymatique partielle de la protéine sérique du lait

par

R. JOST* et J. C. MONTI*

avec la collaboration technique de R. BAECHLER

et D. FUMEAUX

Résumé

Par l'action de différentes protéases sur la protéine sérique du lait *in vitro*, des hydrolysats partiels ont été obtenus. Ces derniers ont été ultrafiltrés pour obtenir une fraction peptidique sous forme du perméat d'ultrafiltration. Les préparations obtenues sont exemptes de lipides et composées essentiellement d'oligopeptides, de sels minéraux et d'un faible taux de lactose.

La tensioactivité des préparations peptidiques a été mesurée sur un instrument selon Lecomte du Noüy et dans un système huile d'arachide/phase aqueuse. Les préparations peptidiques ont provoqué des baisses de tension interfaciale plus ou moins fortes. Les préparations tryptiques et chymotryptiques ont montré l'effet le plus fort. Entre tensioactivité et longueur moyenne de la chaîne peptidique de nos préparations il existe une corrélation positive ($r = 0.9$ pour la régression linéaire). Les propriétés émulsifiantes ont été étudiées dans des émulsions de 20 % d'huile de pépin de raisin dans l'eau. Les préparations peptidiques à l'exception d'une, sont pratiquement exemptes de pouvoir émulsifiant. La préparation tryptique est capable de supprimer coalescence et de réduire l'instabilité au « creaming » de façon significative. Cette activité est mieux exprimée à pH neutre ou alcalin et diminue brusquement en dessous de pH 6.

* Département Recherche, Société d'Assistance Technique pour produits Nestlé S.A., CH-1814, La Tour-de-Peilz (Suisse).

Summary

PEPTIDE EMULGATORS OBTAINED BY PARTIAL ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CHEESE WHEY PROTEIN

Enzymatic whey protein hydrolysates were prepared by in vitro hydrolysis of ultrafiltrated cheese whey protein with different proteases. From the hydrolysates, purified peptide preparations were obtained by ultrafiltration. These preparations were devoid of any lipids or phospholipids and essentially composed of oligopeptides, mineral salts and some lactose.

Surfactant properties of the preparations were measured by ring-tensiometry in a system aqueous buffer/peanut oil. All oligopeptide preparations showed weak but significant tensioactivity. The tryptic and the chymotryptic preparations produced the strongest reduction in interphase tension. A positive correlation between tensioactivity and average peptide chain length ($r = 0.9$) was observed. Emulsifying properties of the peptide preparations were studied in macroemulsions containing 20 % by volume of grape seed oil. With the exception of one, the peptide preparations displayed a very poor emulsifying activity. The tryptic preparation had in contrast distinct emulsifying properties. It was able to suppress coalescence at concentrations of 1 % or higher. It reduced the creaming instability of fluid emulsions to a significant extent. The effect was pH-dependent and best activity displayed at pH 7 or higher.

Key words

Emulsion - Hydrolysis - Enzyme - Peptide - Protease - Protein - Tensioactivity - Trypsin - Surfactant - Whey - Ultrafiltration.

INTRODUCTION

Le pouvoir émulsifiant d'une protéine est lié à sa capacité d'occuper la surface des globules de graisse présents dans une émulsion (Todt, 1976 ; Shimizu *et al.*, 1981). L'énergie d'émulsification provoque une exposition des régions hydrophobiques de la protéine, capables d'interagir avec la phase lipidique. Il en résulte une nouvelle orientation de la chaîne peptidique à l'interphase huile/eau. La scission de la chaîne polypeptidique au cours d'une hydrolyse enzymatique donne naissance à des fragments plus ou moins courts, en fonction de la protéase utilisée et des conditions de l'hydrolyse. On peut s'attendre à ce que le pouvoir des peptides à stabiliser des émulsions diminue avec une longueur de chaîne décroissante. Les oligopeptides enfin, devraient être restreints à la phase aqueuse et exempte de pouvoir émulsifiant. A l'aide d'une dizaine d'hydrolysats différents produits à

partir de la protéine sérique du lait, nous avons cherché des rapports entre tensioactivité, pouvoir émulsifiant et spécificité ainsi que degré d'hydrolyse. Nous espérons qu'une meilleure connaissance de ces propriétés physiques de peptides, facilitera la recherche de nouvelles applications des hydrolysats de la protéine du lait.

MATERIEL ET METHODES

La protéine sérique ultrafiltrée (teneur en protéine 80 %) provenait d'une usine Nestlé. Les procédés de l'hydrolyse et de l'ultrafiltration seront décrits ailleurs (Jost *et al.*). La longueur moyenne des chaînes peptidiques a été déterminée par la méthode ninhydrin directe (Monti et Jost, 1979). La tensiométrie selon *du Noüy* (Lunkenheimer et Wantke, 1981) a été exécutée sur un instrument mis au points par la section Physique du département Recherche. Les tensions interfaciales entre l'huile d'arachide et la phase aqueuse ont été obtenues selon $\gamma(\text{dyne/cm}) \simeq 0.67 \times F(\text{mg})$.

Les mesures se sont faites à 25° à l'aide d'un batch d'huile d'arachide, exempte d'émulgateur exogène. La phase aqueuse a été composée de 5 % de glucose dans tampon phosphate 0.01 M, pH 7. Les émulsions ont été composées de la même phase aqueuse et 20 % (vol par vol) d'huile de pépin de raisin. 50 ml d'émulsion ont été préparés par 12 passages à travers un homogénéisateur à valve. Le diamètre moyen des globules d'huiles se situe entre 2-3 μm . La stabilité des émulsions (« *creaming stability* ») a été jugée selon la méthode de Tornberg (1977) en dosant l'eau présente dans la phase inférieure d'une émulsion reposée après centrifugation à 180 g.

RESULTATS

1. Tensioactivité des préparations peptidiques

Les préparations peptidiques (tableau 1) montrent un effet significatif sur la tension interfaciale. La baisse de tension provoquée par les peptides reste, dans la plupart des préparations, en dessous de la moitié de la tension interfaciale initiale du système (environ 18 dynes/cm). Les préparations trypsiques et chymotrypsiques provoquent la plus forte baisse de tension (fig. 1). Comparées à une même concentration (1 %), les préparations peptidiques montrent une corrélation positive nette entre longueur de chaîne peptidique moyenne et tensioactivité. On trouve un coefficient de $r = 0.9$ pour la régression linéaire (fig. 2). Une digestion de la préparation trypsique avec la plus forte tensioactivité avec pronase, ramène l'activité de cette dernière à un niveau très faible, indiquant que l'activité est lié à la présence des peptides. La tensioactivité de la protéine sérique intacte se situe

TABLEAU 1

Préparations peptidiques obtenus à partir d'hydrolysats de la protéine sérique par ultrafiltration
et leurs caractéristiques chimiques

Préparation (protéase utilisée)	% azote total	%-azote α -aminé de l'azote total	Longueur moyenne de chaîne pept.
1. Trypsine crystalline Novo	14.06	15.24	6.6 résidus
2. Trypsine « salt free » Novo	13.25	19.20	5.2
3. Chymotrypsine cryst. Novo	13.23	14.70	6.8
4. Pepsine cryst. Sigma	8.67	16.63	6.0
5. Papaïne cryst. Sigma	13.12	16.55	6.0
6. Thermolysine cryst. Böhringer	13.15	23.50	4.3
7. Subtilisine Carlsberg cryst.	13.25	25.60	3.9
8. B. subtilis protéase neutre	12.30	31.70	3.2
9. B. lichenif. protéase alcaline	12.25	31.40	3.2
10. Thermoactinomyces vulg. protéase	12.30	35.10	2.9
11. Pancréatine soluble Novo	12.36	32.40	3.1

fig. 1

Tensioactivité de préparations peptidiques mesurée à l'interphase
huile d'arachide / phase aqueuse

- a) : tension interfaciale du système.
- b) : mélange d'acides aminés à 2 %.
- c) : lécithine de soja à 0.5 %.
- : préparation pancréatique.
- : préparation thermitase.
- ▲ : préparation thermolysine.
- ◆ : protéine sérique.
- : préparation chymotrypsine.
- : préparation trypsine.

entre celle des peptides tryptiques et celle des préparations peptidiques moins actives (fig. 1).

2. Stabilisation d'émulsions huile dans l'eau

Une comparaison vise à établir lesquelles des préparations se montrent capables de supprimer toute coalescence d'une émulsion très

fig. 2

Relation entre tensioactivité et longueur de chaîne moyenne (partie gauche), relation entre stabilité d'émulsion et longueur de chaîne moyenne (partie droite). Les numéros correspondent à ceux du tableau 1.

fluide (tableau 2). L'efficacité de la protéine sérique se manifeste déjà à partir d'une concentration de 0,1 %, celle d'une lécithine de soja à partir de 0,5 %. Les hydrolysats bruts, à l'exception de deux (pancréatique et thermitase) stabilisent à partir de 1 % pour la plupart, tandis que les hydrolysats ultrafiltrés sont inefficaces même à une concentration de 5 %. L'exception notable étant la préparation tryptique, pour laquelle nous notons une activité à partir de 1 %. La plupart des perméats d'ultrafiltration ne stabilisent pas contre le « creaming » (tableau 2), seule les deux préparations tryptiques augmentent cette stabilité de façon importante, comparé à l'émulsion témoin sans émulsateur.

Deux préparations, caractérisées par un taux d'acides aminés libres élevé déstabilisent les émulsions de façon visible (tableau 2) et leur usage dans des émulsions pourrait poser des problèmes. A l'exception des préparations tryptiques, les perméats d'ultrafiltration sont donc exempts d'activité émulsifiante, ce qui indique que des principes émulsifiants ont été perdus dus à l'ultrafiltration. Il pourrait s'agir de phospholipides résiduels qui ont été retenus par

TABLEAU 2

Propriétés émulsifiantes des préparations peptidiques.
Suppression de coalescence et stabilisation vis-à-vis du « creaming »

Préparation (protéase utilisée)	Concentration (%) nécessaire pour suppression de coalescence	% de stabilité (concentration 2.5 %)
1. Trypsine cryst.	1	56.0 (52-58)
2. Trypsine « salt free »	2	47.5 (44-49)
3. Chymotrypsine	4-5	17.5 (14-20)
4. Pepsine	> 5	9.9 (9-11)
5. Papaïne	4-5	18.5 (16.5-22)
6. Thermolysine	> 5	20.0 (16.5-23)
7. Subtilisine	> 5	22.0 (19-25)
8. Protéase neutre	> 5	20.0 (18.5-24)
9. Protéase alcaline	> 5	25.0 (19.5-28)
10. Thermitase	> 5	14.0 (13-17)
11. Pancréatine	> 5	10.5 (9.0-13)
Témoin négatif		17.5 (14-19)
Lécithine de soja à 1 %	0.5	29.5 (26-33)
Protéine sérique à 1 %	0.2	41.5 (37-44)

la membrane. Dans l'activité émulsifiante des peptides tryptiques, le fait que la trypsine produit des peptides avec lysine ou arginine comme résidus carboxy-terminaux, pourrait être un élément déterminant. Une analogie entre la partie phosphatidyl-choline d'une lécithine et les carboxy-terminaux de peptides tryptiques est apparente (fig. 3). L'activité émulsifiante des peptides tryptiques est fortement dépendante du pH de l'émulsion (fig. 4). Cette activité est optimale à pH neutre ou alcalin, mais tombe brusquement en dessous de pH 7. Pour la protéine sérique, nous constatons un faible minimum à pH 4, mais l'activité de la protéine est beaucoup plus équilibrée le long de l'échelle pH.

fig. 3

Parallèle structurale entre le phosphatidyl-choline, résidu d'une lécithine (B) et un peptide tryptique en lysine (A) ou arginine (C).

CONCLUSIONS

L'hydrolyse enzymatique partielle de la protéine sérique, suivie d'une ultrafiltration mène à des préparations peptidiques qui permettent l'étude des propriétés émulsifiantes ou tensioactives de peptides sans interférence de lipides. Les peptides produits par l'action d'une protéase spécifique (trypsine, chymotrypsine) sont doués d'une tensioactivité plus forte que ceux obtenus par l'action de protéases non spécifiques.

fig. 4

« Creaming stability » d'une émulsion en fonction du pH
et de l'émulgateur

- : protéine sérique à 1.0 %.
- : préparation trypsique 1 à 2.5 %.
- : préparation trypsique 2 à 2.5 %.

A l'exception de la préparation trypsique, l'activité émulsifiante des perméats d'ultrafiltration est faible ou nulle. L'activité des peptides tryptiques n'a pas encore trouvé une explication satisfaisante. Une hypothèse de travail lie cette activité à une certaine analogie entre les peptides tryptiques et la partie polaire d'une lécithine, comme le principe actif.

Remerciements

Nous remercions M.A. Besson et ses collaborateurs de la section Physique du département Recherche pour l'introduction sur leur tensiomètre selon Lecomte du Noüy. Nous remercions également M.M. Friedrich, Institut f. Ernährung, Potsdam-Rehbrücke, DDR, pour un échantillon de thermitase, mis à notre disposition.

Bibliographie

- JOST (R.), BAECHLER (R.) et MONTI (J.C.). — Manuscrit en préparation pour *Milchwissenschaft*.
- LUNKENHEIMER (K.) and WANTKE (K.D.) (1981). — Determination of the surface tension of surfactant solutions applying the method of Lecomte du Noüy. *Colloid and Polymer Sci.*, 259, 354-366.
- MONTI (J.C.) and JOST (R.) (1979). — Papain-catalyzed synthesis of methionine-enriched soy plasteins. Average chain-length of the peptides. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1281-1285.
- SHIMIZU (M.), KAMIYA (T.) and YAMAUCHI (K.) (1981). — The adsorption of whey proteins on the surface of emulsified fat. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2491-2496.
- TODT (K.) (1976). — Einige Versuche zur Bestimmung der Grenzflächenkonzentration von Milchproteinen in 50 ligen O/W Emulsionen. *Milchwissenschaft*, 31, 83-85.
- TORNBERG (E.) and HERMANSSON (A.M.) (1977). — Functional characterization of protein stabilized emulsions: effect of processing. *J. Food Sci.*, 42, 468-472.
-