

---

# Influence de l'hème sur le fractionnement d'un hydrolysât peptidique d'hémoglobine bovine par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration

**Mathieu Vanhoute(\*,\*\*), Pascal Dhulster\*, Loubna Firdaous(\*,\*\*), Rénato Froidevaux\*, Didier Lecouturier\*, Didier Guillochon\*, Laurent Bazinet\*\***

\* IUTA – Université Lille 1

Laboratoire ProBioGEM, Polytech'lille, Boulevard Langevin 59655 Villeneuve d'Ascq

\*\* Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), département des sciences des aliments et de nutrition, Université de Laval, Québec, Canada G1K 7P4

mat.vanhoute@gmail.com, pascal.dhulster@univ-lille1.fr, [Laurent.Bazinet@fsaa.ulaval.ca](mailto:Laurent.Bazinet@fsaa.ulaval.ca)

**Sections de rattachement : 62, 64**  
**Secteur : secondaire**

*RÉSUMÉ. Des procédés combinant un champ électrique comme force motrice à des membranes poreuses ont été récemment développés pour la séparation de protéines et de mélanges de peptides pour obtenir des produits purifiés avec de meilleures fonctionnalités. L'objectif dans ce travail était le fractionnement par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (ÉDUF) d'un mélange peptidique issu de l'hydrolyse pepsique d'hémoglobine bovine ayant un degré d'hydrolyse (DH) de 15 %. Deux types d'hydrolysât peptidique d'hémoglobine bovine ont été traités par ÉDUF : un hydrolysât brut et un hydrolysât décoloré où l'hème a été précédemment retiré par ultrafiltration. L'ÉDUF a été très sélective puisque des populations différentes de peptides ont été récupérées dans les solutions de séparation adjacentes : KCl1 vers l'anode et KCl2 vers la cathode. En raison de la nature et de la quantité des peptides présents dans les hydrolysats, les conditions utilisées dans ce travail ont favorisé pour les deux hydrolysats une migration des peptides dans le compartiment KCl2. En outre, les taux de migration étaient plus élevés pour l'hydrolysât décoloré, avec une migration de peptide doublée en comparaison de l'hydrolysât brut. De plus, il est apparu lors de l'évaluation physique des membranes et de la mesure du potentiel d'écoulement qu'un encrassement s'était formé lors du traitement de l'hydrolysât brut. En effet, l'hème contenu dans l'hydrolysât brut aurait diminué la migration des peptides par un encrassement stérique de la membrane.*

*MOTS-CLÉS : électrodialyse, ultrafiltration, peptides, extraction, encrassement.*

## **1. Introduction**

La capacité à produire des aliments fonctionnels à partir de sources naturelles devient de plus en plus attractive pour les industries alimentaires. Des peptides bioactifs (opioïdes, antimicrobiens, satiants...) peuvent apparaître lors de la protéolyse enzymatique de certaines protéines telle que lors de l'hydrolyse par la pepsine de l'hémoglobine bovine (Piot et al., 1992a). Cependant ces peptides doivent être extraits des hydrolysats pour obtenir des fractions peptidiques purifiées avec de meilleures fonctionnalités. Les méthodes actuelles d'extraction des peptides par ultrafiltration sont trop peu sélectives tandis que la chromatographie classique est onéreuse. C'est pourquoi des procédés innovants se développent, tels l'ÉDUF qui associe des membranes d'ultrafiltration à un champ électrique comme force motrice pour fractionner des mélanges peptidiques (Bazinet et al, 2005). Le but de ces travaux fut l'évaluation de l'impact de l'hème sur le fractionnement d'hydrolysat peptidique d'hémoglobine bovine par ÉDUF.

## **2. Matériels et méthodes**

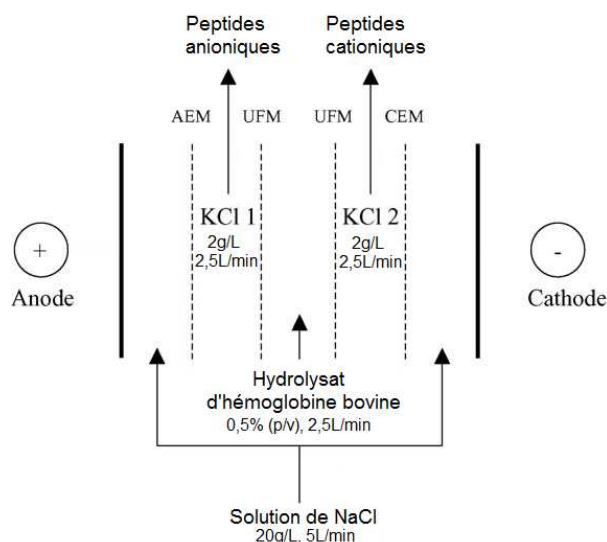
### **2.1. Préparation des hydrolysats**

L'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine fut effectuée à 23°C et maintenue à pH 3 par addition de HCl 1M. La solution d'hémoglobine (1%, p/v) fut mise en incubation avec de la pepsine porcine (E.C. 3.4.23.1 ; 3450 UAE/mg de solide ; E/S = 2,5%, p/p) pendant 10h. L'action de la pepsine fut stoppée en augmentant le pH à 10 avec du NaOH 5M. Cette première procédure conduisit à un hydrolysat brut de degré d'hydrolyse (DH) de 15% (Adler-Nissen et al., 1978). Pour produire un hydrolysat décoloré (DH 15%), l'hème fut retiré par ultrafiltration (Dhulster et al., 2002).

### **2.2. Configuration de la cellule d'électrodialyse**

#### **2.2.1. Cellule d'extraction**

La cellule d'électrodialyse utilisée pour ces expériences était une cellule de type MP (surface effective de 100cm<sup>2</sup>) (ElectroCell AB) avec une membrane cationique Neosepta CMX-SB (Tokuyama Soda Ltd.), une membrane anionique Neosepta AMX-SB (Tokuyama Soda Ltd.) et deux membrane en ester de cellulose avec un seuil de coupure de 20 kDa (Spectrum Laboratories Inc). La configuration de la cellule, présentée dans la figure 1, présente quatre boucles de circulation. Chaque boucle fermée fut connectée à un réservoir extérieur pour permettre une recirculation des solutions. Les solutions circulaient à l'aide de quatre pompes centrifuges et les débits étaient contrôlés à l'aide de débitmètres. L'anode (DSA) et la cathode (électrode en acier inoxydable de type 316) étaient fournies avec la cellule MP. La différence de voltage fut maintenue constante grâce à un générateur de tension variable de 0 à 100V. Le système n'était pas équipé pour maintenir les solutions à température constante.



**Figure 1.** Configuration du module d'électrodialyse avec deux membranes d'ultrafiltration pour la séparation simultanée des peptides anioniques et cationiques d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 15%). UFM : membrane d'ultrafiltration. AEM : membrane échangeuse d'anions. CEM : membrane échangeuse de cations.

### 2.2.2. Cellule de désorption

Une cellule d'électrodialyse de type MicroFlow (ElectroCell, Täby, Suède) d'une surface effective de 10 cm<sup>2</sup> fut utilisée. Un premier montage devait permettre aux membranes d'ultrafiltration coté cathode de libérer les peptides chargés positivement dans les compartiments contenant la solution de rinçage KCl2. Un second montage devait permettre aux membranes d'ultrafiltration coté anode de libérer les peptides chargés négativement dans les compartiments contenant la solution de rinçage KCl1. Chacun des liquides des trois compartiments recirculaient à l'aide de pompes centrifuges, en boucle fermée, connectés à des réservoirs extérieurs. Les débits étaient contrôlés grâce à des débitmètres. L'anode et la cathode étaient de même type que celles utilisées dans le premier montage en extraction. La différence de voltage fut maintenue constante grâce à un générateur de tension variable de 0 à 30V.

## 2.3. Protocoles

### 2.3.1. Protocole d'extraction

Dans cette expérience, la configuration d'EDUF développée par Poulin et al. (2006) fut utilisée dans le but de séparer simultanément les peptides bioactifs chargés positivement et négativement présents initialement dans les hydrolysats d'hémoglobine bovine. L'extraction fut effectuée à un voltage constant de 8 V, choisit grâce à la détermination

du courant limite (Cowan et Brown, 1959). Le traitement dura 2 h. Le pH était maintenu constant à pH 7,0 par l'addition dans chaque compartiment de HCl ou de NaOH (0,01 M) afin de compenser les variations de pH dues aux migrations des différents ions et peptides. Le pH fut choisit pour avoir à la fois dans la solution d'hydrolysats d'hémoglobine bovine des peptides chargés positivement et négativement. Trois répétitions furent menées avec les mêmes membranes pour l'hydrolysats brut, et de nouvelles membranes furent utilisées pour trois répétitions avec l'hydrolysats décoloré. 10mL d'hydrolysats et des solutions de KCl furent prélevés avant d'appliquer le voltage, puis toutes les 30 minutes. Le profil peptidique des solutions d'hydrolysats et de KCl furent ensuite déterminés par analyses en CLHP-PI. La concentration en protéines fut déterminée par un dosage à l'aide des réactifs d'essai BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) en prenant l'hydrolysats d'hémoglobine bovine comme standard pour la courbe d'étalonnage. À la fin des trois extractions d'ÉDUF, deux morceaux de chaque membrane d'UF de 30 mm x 35 mm ont été découpé afin de mesurer le potentiel d'écoulement des membranes. De mêmes des photographies numériques de chacune des membranes d'UF ont été prises lors du démontage final de la cellule.

### *2.3.2. Protocole de désorption*

La cellule de désorption fut configurée sur les mêmes bases que la cellule d'extraction en remplaçant la solution d'hydrolysats par une solution de KCl à 2g/L. Les mêmes analyses que précédemment ont été effectuées.

### *2.4. Analyses CLHP-PI*

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

### *2.5. Potentiel d'écoulement*

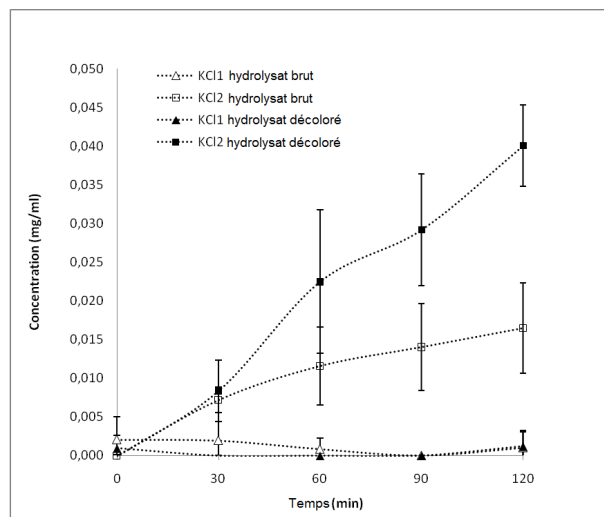
La cellule dédiée à la mesure du potentiel d'écoulement est constituée de deux plaques en plexiglas, la partie inférieure contenant deux électrodes en platine. Entre ces deux électrodes sont placés 2 échantillons de la même membrane (les couches actives sont face à face) séparés par un canal en téflon. Deux manomètres sont placés à l'entrée et à la sortie de la cellule permettant la lecture visuelle des pressions appliquées. La circulation des solutions est assurée à l'aide d'une pompe centrifuge (Baldor industrial motor). Les mesures sont effectuées avec des solutions de KCl  $10^{-3}$  M dans une gamme de pH de 4 à 9 et une gamme de pression allant de 0,60 à 1,80 bar avec un incrément de 0,2 bar. Pour l'ensemble des expériences, la température est maintenue constante à 25°C. Chaque expérience est réalisée en triplicata.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. La migration peptidique au cours de l'extraction

##### 3.1.1. Migration peptidique globale

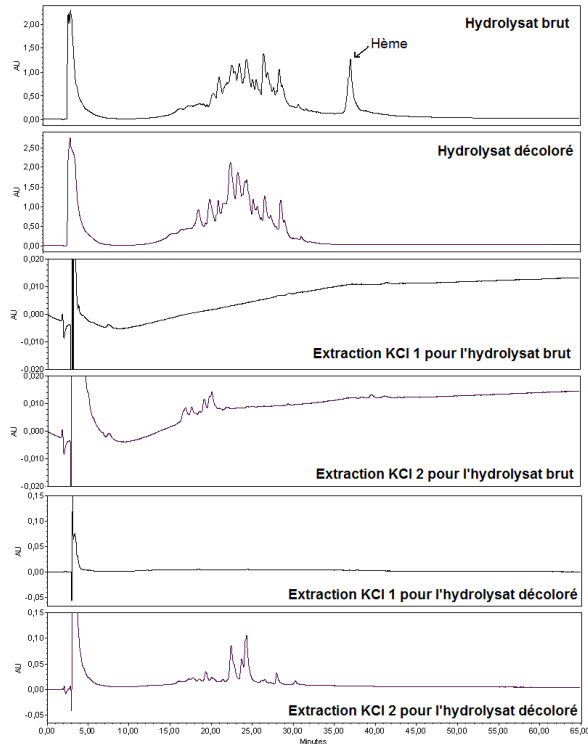
La migration des peptides présents dans les hydrolysats d'hémoglobine bovine vers les compartiments KCl1 (vers l'anode pour les peptides chargés négativement) et KCl2 (vers la cathode pour les peptides chargés positivement) étaient rendue possible en plaçant les solutions à pH 7 où les peptides à la fois chargés positivement et négativement sont présents. Cependant, comme le montre la figure 2, les peptides ont effectivement migrés dans le compartiment KCl2 mais étaient absents du compartiment KCl1. Les concentrations finales dans le compartiment KCl2 après les 2 h d'extractions étaient de 0,016 mg/ml pour l'hydrolysat brut et 0,040 mg/ml pour l'hydrolysat décoloré.



**Figure 2.** Evolution de la concentration peptidique dans les solutions de KCl en fonction du temps pendant l'électrodialyse.

##### 3.1.2. Profils chromatographiques

Les profils chromatographiques des hydrolysats peptidiques et des extractions dans les compartiments KCl1 et KCl2 sont présentés dans la figure 3. Le premier grand pic observé à 3min correspondait au volume mort où notamment étaient extraits les sels. On confirmait l'absence d'hème dans le profil initial de l'hydrolysat décoloré.



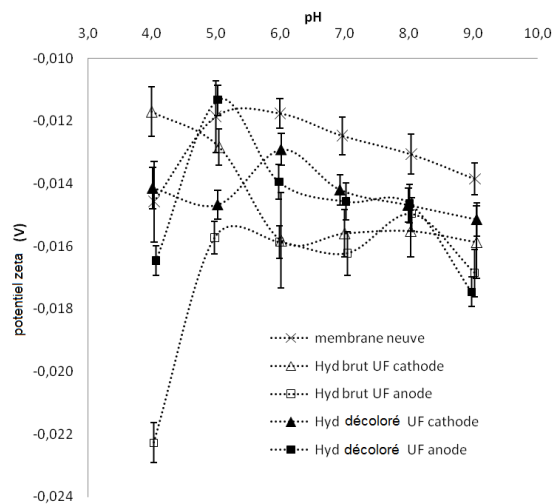
**Figure 3.** Profils chromatographiques en CLHP-PI d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (DH 15%) brut et décoloré, et des solutions d'extraction des compartiments KCl1 et KCl2 pour chaque hydrolysat après le troisième protocole d'extraction de 2h.

On observait également l'absence de peptides dans le compartiment KCl1 et la présence de peptides dans les compartiments KCl2, avec toutefois des intensités plus faibles dans le cas de l'hydrolysat brut qu'avec l'hydrolysat décoloré. Ceci correspondrait à un encrassement dû à l'hème.

### 3.2. L'encrassement

#### 3.2.1. Potentiels d'écoulement après extraction

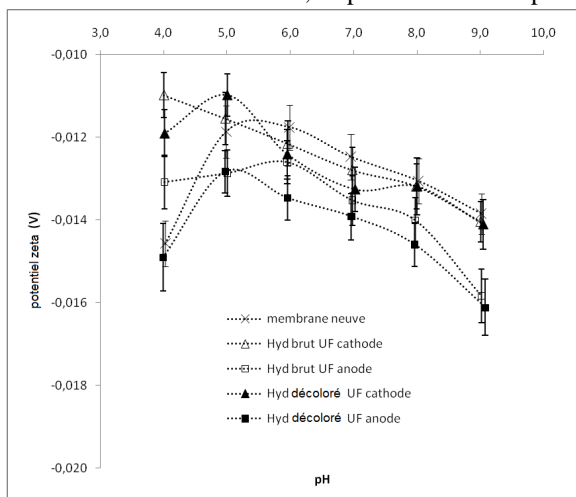
Les potentiels d'écoulement de membranes d'ultrafiltration après les extractions en EDUF sont présentés dans la figure 4. La membrane neuve présentait une charge globalement négative comprise entre -15mV et -11mV. Dans le cas de l'hydrolysat décoloré, la membrane était sensiblement chargée de la même manière. L'encrassement était donc faible. Avec l'hydrolysat brut, on observait des variations allant jusqu'à un écart de 10mV, ce qui témoigne d'un encrassement plus important des membranes.



**Figure 4.** Evolution du potentiel d'écoulement en fonction du pH pour les membranes d'ultrafiltration après 3 extractions EDUF avec les hydrolysats d'hémoglobine bovine.

### 3.2.2. Potentiels d'écoulement après désorption

Les potentiels d'écoulement de membranes d'ultrafiltration après désorption en EDUF sont présentés dans la figure 5. Les charges à la surface des membranes étaient du même ordre de grandeur que celles de la membrane neuve. Les peptides en transit dans la membrane ont donc bien fini de la traverser, l'opération de désorption était efficace.



**Figure 5.** Evolution du potentiel d'écoulement en fonction du pH pour les membranes d'ultrafiltration après désorption avec les hydrolysats d'hémoglobine bovine.

#### 4. Conclusion

L'EDUF apparait comme une méthode d'extraction très sélective car seuls quelques peptides sont extraits dans les fractions KCl. Cependant cette séparation est dépendante de nombreux paramètres tels que la charge même de la membrane qui ne permet, dans nos conditions expérimentales, que d'extraire les peptides vers la cathode. De plus, la présence d'hème influe fortement sur la vitesse de transfert des peptides dans le compartiment KCl2. En effet un encrassement fut mis en évidence par les mesures des potentiels d'écoulement des membranes d'ultrafiltration.

#### 5. Bibliographie

Adler-Nissen J., Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, *J. Agric. Food Chem.* 27, 1978, 1256–1262.

Bazinet L., Amiot J., Poulin J.-F., Tremblay A., Labbé D., Process and system for separation of organic charged compounds. Demande de *Brevet* PCT/CA2005/000337

Cowan, D.A., Brown, J.H., Effect of turbulence on limiting current in electro dialysis cells, *Ind. Eng. Chem.* 51 (12), 1959, 1445–1448.

Dhulster P., Kapel R., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Fertin-Bazus A., Choïnard L., Guillochon D., Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction, *Desalination* 148, 2002, 221-226.

Piot J.-M., Zhao Q., Guillochon D., Ricart G., Thomas D., Isolation and characterization of two opioid peptides from bovine hemoglobin peptic hydrolysate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992a, 189 : 101-110

Poulin, J.-F., Amiot, J., Bazinet, L., Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by Electro dialysis with ultrafiltration membrane. *Journal of Biotechnology*, 123 (3), 2006, 314-328.