

MASSAMA ESSO PANA

IMPACT DES TRAITEMENTS THERMIQUES SUR LA STRUCTURE DES PROTÉINES DE LENTILLES ET LEUR DIGESTIBILITÉ

Mémoire présenté

à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en sciences et technologie des aliments
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES ALIMENTS ET DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

Les lentilles produites au Canada sont peu transformées et peu valorisées, bien qu'elles constituent une importante source de protéines dont les effets santé sont de plus en plus reconnus. Certains bénéfices potentiels ayant été répertoriés incluent la séquestration des acides biliaires, l'inhibition de l'enzyme convertissant l'angiotensine-1, l'abaissement du cholestérol, l'équilibre de la glycémie, et des effets préventifs contre la maladie artérielle périphérique, le diabète et le cancer. Cependant, leur faible digestibilité et biodisponibilité liées aux facteurs antinutritionnels limitent l'utilisation des lentilles. Ce projet vise à étudier l'impact du traitement à la chaleur sur la structure et la digestibilité des protéines de lentilles. Dans un premier temps, l'impact des traitements thermiques sur la dénaturation et la gélification des protéines de lentilles a été étudié en faisant varier les conditions du milieu, notamment le pH et la force ionique. Le mécanisme de formation des gels a été étudié par calorimétrie DSC, FTIR et par rhéologie à petites déformations à différents pH 3, 7 et 9 en absence et en présence de CaCl_2 . Les résultats de DSC ont montré qu'aux pH 3, 7 et 9, il n'y a pas de différence significative ($0,05$) de la température de dénaturation (T_d) enregistrée. Par contre T_d augmente en présence de CaCl_2 mais reste significative ($p < 0,05$) à 50 mM de CaCl_2 . Avec le FTIR, nos résultats ont montré une intensité plus importante des bandes d'agrégation dans les conditions en présence de CaCl_2 . Cependant, la rhéologie dynamique à petite déformation a montré qu'à pH 9 en présence et en absence de CaCl_2 , le module d'élasticité (G') reste plus élevé que les autres pH dans les mêmes conditions.

Dans un deuxième temps, l'impact du traitement à la chaleur sur la digestibilité des protéines de lentilles a été étudié *in vitro*. La sensibilité aux enzymes digestives des protéines natives et dénaturées à la chaleur a été étudiée et comparée à celle des protéines gélifiées.

Les résultats de la deuxième partie ont montré que les protéines dénaturées avaient une sensibilité plus élevée à l'hydrolyse par les enzymes protéolytiques que les protéines natives. Les protéines gélifiées à pH 9 ont générées des peptides avec un poids moléculaires environ 3 kDa et moins, plus petits par rapport aux gels à pH 3 et 7. De même, la présence de CaCl_2 (50 mM) dans les différentes conditions de pH n'a pas

modifié la sensibilité à la dégradation des gels formés. Bien que le CaCl_2 favorise l'agrégation des protéines de lentilles, la chaleur semble nécessaire à l'exposition des sites d'attaques des enzymes protéolytiques, comparé à l'hydrolyse protéique des échantillons sans traitement thermique.

Abstract

Most lentils produced in Canada are not processed and valorized, although they constitute an important source of proteins, the health benefits of which are now well recognized. These health benefits include the sequestration of bile acids, inhibition of angiotensin-converting-enzyme-1, lowering of cholesterol, maintaining blood sugar levels, and preventive effects against peripheral arterial disease, diabetes and cancer. However, the low digestibility and bioavailability deriving from anti-nutritional factors limit the use of lentils. This project aims to study the impact of heat treatment on the structure and digestibility of lentils' proteins.

Initially, the impact of heat treatment on the denaturation and gelation of the proteins of lentils was studied by varying environmental conditions such as the pH and ionic strength. The mechanism of formation of gels was studied by DSC, FTIR and small deformation rheology at pH 3, 7 and 9, in absence and presence of CaCl₂. The results obtained from DSC indicate that at pH 3, 7 and 9, there is no significant difference ($p < 0.05$) between the denaturation temperatures (Td). However, the Td increases in the presence of CaCl₂ and is significantly higher ($p < 0.05$) when the concentration of CaCl₂ reaches 50 mM. Furthermore, FTIR results show a higher intensity of the aggregation bands in the presence of CaCl₂. On the other hand, small deformation rheology indicates that at pH 9, in the presence or absence of CaCl₂, the elastic modulus (G') is the highest.

The impact of heat treatment on the digestibility of lentils' proteins was then studied *in vitro*. The effects of digestive enzymes on native, heat denatured and gelled proteins were evaluated. The data indicate that the denatured proteins are more sensitive to proteolytic hydrolysis than the native proteins. At pH 9, the gelled proteins generate peptides with a molecular weight around 3 kDa or less, which are much smaller compared to that obtained at pH 3 and pH 7. Similarly, the presence of CaCl₂ (50 mM) in different pH conditions does not affect the degradation of the gels. Although CaCl₂ promotes the aggregation of lentil proteins, heat treatment is necessary to reveal the target sites of proteolytic enzymes.

Avant-propos

Ce mémoire de maîtrise est divisé en 7 sections dont les trois premières sont respectivement constituées de l'introduction générale, de la revue de littérature ainsi que de la présentation de l'hypothèse, du but et des objectifs qui ont motivé les travaux entrepris.

Le cœur de cet ouvrage est composé de deux textes écrits en français précédés chacun d'un résumé. Leur rédaction a été réalisée principalement par Massama Ezzo Pana qui a également effectué toutes les manipulations nécessaires à l'obtention des résultats présentés. Dre Muriel Subirade et Dre Joyce Boye ont, quant à elles, fourni un appui scientifique inestimable lors des expérimentations, de l'analyse des données et du processus de rédaction.

Le chapitre 4, intitulé « Étude du mécanisme de formation de gels thermiques de protéines de lentilles », porte sur l'impact des traitements thermiques sur la dénaturation et la gélification des protéines de lentille en fonction du pH et de la force ionique. De même, les propriétés rhéologiques de ces gels sont également étudiées.

Le chapitre 5, portant le titre « Impact des traitements thermiques sur la digestibilité des protéines de lentilles », évalue l'impact du pH et du CaCl_2 sur la vitesse de dégradation des protéines lors de l'hydrolyse enzymatique des gels thermiques formés.

Le chapitre 6 tient lieu de conclusion générale et donne une vision globale des travaux effectués et des résultats obtenus tout en mettant en lumière les perspectives de recherche. Enfin, la bibliographie, qui liste toutes les publications et les références électroniques citées dans le texte, vient compléter ce mémoire.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à mon Dieu, que ta volonté soit faite. Tu as été ma lumière, mon guide et mon secours. Tu n'as cessé de me montrer le bon chemin, le chemin de la vérité, du travail et de la réussite. Que ce travail honore et glorifie ton nom.

Je voudrais aussi par ces lignes, exprimer ma reconnaissance envers ma directrice de recherche, Dre Muriel Subirade, pour son excellent encadrement, son extraordinaire disponibilité. Votre méthode de travail, votre esprit de clarté et d'organisation, la rigueur dont vous avez fait preuve tout au long de ce travail ont suscité en moi beaucoup d'admiration et une confiance considérable. Tous nos sentiments de respect et de reconnaissance.

J'aimerais également souligner l'implication du Dre Joyce Boye qui, malgré vos multiples occupations, vos conseils et critiques apportés ont considérablement amélioré la réussite des travaux de recherche entrepris.

Je tiens à remercier l'Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) particulièrement le Centre de Recherche et de développement sur les Aliments (CRDA) pour son soutien financier par le biais du programme des adjoints de recherche (PAR).

De nombreuses personnes m'ont aidée ou encouragée pendant mes études. Un grand merci aux professionnels de recherche, Diane Gagnon, Sabine Ribéreau, qui m'ont apporté le support technique nécessaire à la réalisation de mes expériences. De même, mes remerciements vont à l'équipe de la Chaire de recherche du Canada sur les protéines, les biosystèmes et les aliments fonctionnels pour leurs conseils.

Ma maîtrise n'aurait pu être complétée sans l'appui constant de Dr-Ing. G. Elolo Osseyi, pour ses conseils qui m'ont été d'une grande utilité.

À mon épouse Carine Akofa Okankor Tay, pour son soutien moral, sa compréhension et sa patience. Son amour et sa présence ont joué un rôle important dans l'aboutissement de ce travail. Puisse ce travail renforcer davantage les liens qui nous unissent.

À mon fils, Péniel Essognim Pana, que Dieu te garde et te donne comble des grâces. À ma fille, Laël Kadesha Pana, puisse accomplir l'œuvre de Dieu sur cette terre. Je te dédie ce travail. À toute ma famille et à ma belle-famille, pour l'amour que vous avez toujours

manifesté à mon égard. Ce travail est le fruit de vos sentiments pour moi. Je remercie spécialement mes parents qui m'ont toujours soutenue tout au long de mon cursus, que Dieu vous bénisse.

En terminant, je voudrais remercier Dr Assimawè Paul Pana pour ses conseils.

Table des matières

RESUME	I
ABSTRACT	III
AVANT-PROPOS	IV
REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIERES	VII
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
1 INTRODUCTION	1
2 REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTÉINES DE LENTILLES	3
2.1.1 <i>Composition en acides aminés</i>	3
2.1.2 <i>Fractions et conformation des lentilles</i>	5
2.1.3 <i>Propriétés fonctionnelles des protéines de lentilles</i>	5
2.2 HYDROGELS PROTÉIQUES	6
2.2.1 <i>Gélfication thermique</i>	6
2.2.2 <i>Facteurs influençant la structure et les propriétés des gels thermiques</i>	8
2.3 DIGESTIBILITÉ DES PROTÉINES GLOBULAIRES ET IMPACT DES TRAITEMENTS THERMIQUES	8
2.3.1 <i>Action des protéases digestives</i>	8
2.3.2 <i>Influence de la structure protéique sur l'action des protéases digestives</i>	10
3 HYPOTHÈSE, BUT ET OBJECTIFS	12
3.1 HYPOTHÈSE	12
3.2 BUT ET OBJECTIFS	12
4 ÉTUDE DES TRAITEMENTS THERMIQUES SUR LA DENATURATION ET LA GÉLIFICATION DES PROTÉINES DE LENTILLES EN FONCTION DES CONDITIONS DU MILIEU	13
RESUME	13
4.1 INTRODUCTION	144
4.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	15
4.2.1 <i>Matériels</i>	15
4.2.2 <i>Préparation de l'extrait de protéines de lentilles</i>	15
4.2.3 <i>Composition physico-chimique de l'extrait protéique</i>	16
4.2.4 <i>Solubilité de l'extrait protéique</i>	17

4.2.5	<i>Préparation des dispersions protéiques</i>	17
4.2.6	<i>Formation de gel thermique</i>	18
4.2.7	<i>Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)</i>	18
4.2.8	<i>Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)</i>	19
4.2.9	<i>Mesures rhéologiques en petites déformations</i>	19
4.2.10	<i>Analyses statistiques</i>	20
4.3	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	21
4.3.1	<i>Composition physico-chimique de l'extrait protéique</i>	21
4.3.2	<i>Solubilité de l'extrait protéique</i>	22
4.3.3	<i>Calorimétrie différentielle à balayage</i>	22
4.3.4	<i>Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)</i>	27
4.3.5	<i>Gélification thermique</i>	30
4.3.6	<i>Mesures rhéologiques en petites déformations</i>	31
4.4	CONCLUSION	36
5	IMPACT DES TRAITEMENTS THERMIQUES SUR LA DIGESTIBILITÉ DES PROTÉINES DE LENTILLES	37
	RÉSUMÉ	37
5.1	INTRODUCTION	38
5.2	MATERIELS ET METHODES	40
5.2.1	<i>Concentré de protéines de lentilles (CPL)</i>	40
5.2.2	<i>Préparation des échantillons pour hydrolyse enzymatique</i>	40
5.2.3	<i>Hydrolyse enzymatique in vitro</i>	41
5.2.4	<i>SDS-PAGE Tris/Tricine</i>	43
5.3	RESULTATS ET DISCUSSION.....	44
5.4	CONCLUSION	53
6	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	53
7	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Composition en acides aminés des lentilles (Boye et al., 2010b).....	4
Tableau 2 :	Composition de l'extrait protéique de lentilles vertes.....	21
Tableau 3 :	Effets du pH et de la force ionique sur la température et l'enthalpie de dénaturation des protéines de lentilles.....	26
Tableau 4 :	Effets du pH et du CaCl ₂ sur la gélification thermique des protéines de lentilles.....	31
Tableau 5 :	Effets du pH et du calcium sur la température de dénaturation (Td) et la température de gélification (Trans) de l'extrait de protéines de lentilles.....	34

Liste des figures

Figure 1 :	Différentes étapes du processus d'extraction des protéines de lentilles vertes (Boye et al., 2010b).....	16
Figure 2 :	Solubilité des protéines de lentilles en fonction du pH.....	22
Figure 3 :	Thermogramme DSC des solutions de protéines de lentilles à 10% (p/v) à pH 3 avec 0, 10, 20 et 50 mM de CaCl ₂ chauffées de 20 à 120 °C à la vitesse de balayage de 5 °C/min.....	24
Figure 4 :	Thermogramme DSC des solutions de protéines de lentilles à 10% (p/v) à pH 7 avec 0, 10, 20 et 50 mM de CaCl ₂ chauffées de 20 °C à 120 °C à la vitesse de balayage de 5 °C/min.....	25
Figure 5 :	Thermogramme DSC des solutions de protéines de lentilles à 10% (p/v) à pH 9 avec 0, 10, 20 et 50 mM de CaCl ₂ chauffées de 20 °C à 120 °C à la vitesse de balayage de 5 °C/min.....	25
Figure 6 :	Spectres déconvolués des protéines de lentille dans du D ₂ O (10% p/v) aux différents pH avec et sans CaCl ₂ en fonction de la température pendant le chauffage de 25 °C à 95 °C.....	29

Figure 7 :	Effets du CaCl ₂ sur l'intensité des agrégats des protéines de lentilles (ratio entre feuillets β intermoléculaires et intramoléculaires durant le traitement thermique au FTIR).....	30
Figure 8 :	Évolution du module G' en fonction de la température de chauffage des solutions de protéines de lentilles à 10% (p/v) aux pH 3, 7 et 9 en absence (A) et en présence (B) de CaCl ₂	33
Figure 9 :	Modules G' des gels de protéines de lentilles obtenus à la fin du cycle de chauffage-refroidissement et ceux aux pH 3, 7 et 9 en présence et en absence de CaCl ₂	35
Figure 10 :	SDS-PAGE des protéines de lentilles natives (I) et dénaturées (II) traitées thermiquement à 100 °C pendant 30 minutes et hydrolysées.....	46
Figure 11 :	SDS-PAGE des protéines de lentilles à 10% sans CaCl ₂ et à pH 3 (A), à pH 7 (B) et à pH 9 (C) traitées thermiquement à 100 °C pendant 30 minutes et hydrolysées.....	49
Figure 12 :	SDS-PAGE des protéines de lentilles à 10% avec 50 mM de CaCl ₂ , à pH 3 (A), à pH 7 (B) et à pH 9 (C) traitées thermiquement à 100 °C pendant 30 minutes et hydrolysées.....	50

Liste des abréviations

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
B	Angle de perte
Ba ²⁺	Ion Baryum
Ca ²⁺	Calcium divalent
CaCl ₂	Chlorure de calcium
COOH	Groupement carboxyle
DSC	Differential Scanning Calorimetry
D ₂ O	Oxyde de deuterium
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
G'	Module de conservation ou module élastique
G''	Module de perte ou module visqueux
ΔH	Enthalpie de dénaturation
kDa	Kilo-Dalton
T _{trans}	Température de transition
T _d	Température de dénaturation
Mg ²⁺	Ion Magnésium
MW	Molecular Weight
MM	Masse Moléculaire
NaCl	Chlorure de sodium
NH ₂	Groupement amine
pI	Point isoélectrique
pH	Potentiel hydrogène
S	Unité Svedberg

Chapitre 1

INTRODUCTION

1 Introduction

Les légumineuses constituent une composante importante du régime alimentaire quotidien dans de nombreux pays (Pusztai et al., 2004). Le Canada est un grand producteur mondial de légumineuses. Selon les estimations de Statistique Canada, la production canadienne de légumineuses (pois sec, lentille, haricot sec, pois chiche) et de cultures spéciales (graine de moutarde, graine à canaris, graine de tournesol et sarrasin) pour 2009-2010 serait de 5,6 millions de tonnes (Mt), soit 4% de plus qu'en 2008-09. Malgré cette croissance accrue, la consommation canadienne de légumineuses dans l'alimentation humaine est faible par rapport à de nombreuses parties du monde. Environ 75 pour cent de la production de légumineuses du Canada sont exportés chaque année, habituellement dans 150 pays à travers le monde (Pulse Canada, 2010).

Parmi les légumineuses, les lentilles occupent aujourd'hui une place de plus en plus grande sur le marché mondial. Entre 2009 et 2010, la production de lentilles au Canada a atteint un record de 1,5 millions de tonnes. Actuellement, le Canada est le principal pays producteur et exportateur de lentilles, en vendant à plus de 100 pays chaque année (Statistique Canada, 2008). De plus dans la production Canadienne, les lentilles occupent la deuxième place, derrière les pois secs, avec 920,000 tonnes (Statistique Canada, 2008). Traditionnellement, les lentilles sont consommées en potages, en salades ou en soupes, mais aujourd'hui, l'utilisation des poudres de lentilles en boulangerie, en pâtisserie, ou encore dans la production des boissons s'est développée (Urbano et al., 1995 ; Boye et al., 2010b). Dans certaines préparations, les lentilles servent de succédané de viande en raison de la quantité et de la qualité de protéines qu'elles contiennent. Les légumineuses, dont les lentilles, sont de plus en plus étudiées pour leurs bénéfices pour la santé. Certains bénéfices potentiels des lentilles répertoriés incluent : la séquestration des acides biliaires, l'inhibition de l'enzyme convertissant l'angiotensine-1, l'abaissement du cholestérol, des effets préventifs contre des maladies coronariennes et cardiovasculaires. De plus, les lentilles peuvent aider à contrôler le diabète du type 2. En effet, étant donné l'indice glycémique faible des lentilles, de 55 ou moins, elles font moins fluctuer le taux des glucides dans le sang que d'autres aliments contenant les glucides (Agriculture et agroalimentaire Canada, 2008).

Ces dernières années, les protéines de lentilles ont fait l'objet de nombreux travaux mettant en évidence leurs propriétés bioactives (Roy et al., 2010). Certains peptides ayant des propriétés inhibitrices d'enzymes de conversion d'angiotensine I ont été identifiés (Barbana et Boye, 2010). Parallèlement, il a été démontré que les protéines de lentilles possèdent de bonnes propriétés fonctionnelles telles que l'hydratation, la stabilisation des mousses et des émulsions et la gélification (Boye et al., 2010a).

Cependant, la faible digestibilité des protéines de lentilles, due à la présence de substances anti nutritionnelles, limite leur utilisation (Gupta, 1982). De plus, plusieurs autres facteurs pourraient limiter la digestibilité des protéines de lentilles incluant leur structure leur capacité à interagir avec d'autres composants tels que les phytates, les tanins pour former des complexes (Nielsen, 1991).

Plusieurs travaux ont prouvé que le chauffage des protéines des légumineuses au-delà de 95 °C pouvait améliorer leur digestibilité (Walker et Kochar, 1982 ; Wang et al., 1997 et 2003). Cette amélioration pourrait être attribuée à l'inactivation des facteurs anti nutritionnels et au dépliement et/ou dénaturation des protéines (Liener, 1976 ; et Walker et Kochar, 1982). Cependant, suivant la concentration utilisée, l'application de chaleur peut induire la gélification des protéines de lentilles et moduler leur digestibilité.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude visent à étudier l'impact des traitements thermiques 1) sur la dénaturation et la gélification des protéines de lentille en fonction des conditions du milieu (pH et force ionique) et 2) sur leur digestibilité dans le but de comparer la sensibilité aux enzymes digestives des protéines natives, dénaturées et gélifiées.

Chapitre 2

REVUE DE LITTÉRATURE

2 Revue de littérature

Les lentilles (*Lens culinaris*) sont l'une des espèces végétales appartenant à la famille des légumineuses les plus importantes au monde en raison de leur qualité nutritionnelle (Costa et al., 2006). Elles sont composées de fibres alimentaires (8-9%), de glucides complexes (43-45%), d'une faible teneur en gras (1-1,5%) et d'une grande quantité de protéines dont le taux varie de 17-30%. Elles apportent également des vitamines du groupe B, des minéraux tels que le calcium, le phosphore, le potassium et le magnésium. Cependant, elles renferment un certain nombre de facteurs anti nutritionnels tels que les inhibiteurs de protéase, les lectines, les phytates et les polyphénols (Martin-Cabrejas et al., 2009). Certaines études ont néanmoins démontré des effets positifs sur la santé de certains de ces composés tels que les lectines (Hartmann et Meisel, 2007).

2.1 Propriétés physico-chimiques des protéines de lentilles

2.1.1 Composition en acides aminés

Les acides aminés principaux des protéines de lentilles sont l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'arginine, la leucine et la lysine. Par contre la méthionine, la cystine et le tryptophane sont présents dans des concentrations relativement inférieures (Wang et Daun, 2006) (Tableau 1). La quantité d'acides aminés chargés versus acides aminés hydrophobes joue un rôle important dans le processus de gélification et les caractéristiques des gels résultants. Toutefois la composition en acides aminés et la biodisponibilité de ces derniers dans l'alimentation permettront de prédire l'aptitude des protéines de lentilles à satisfaire ou non les besoins pour la synthèse des protéines et des différents composés azotés de l'organisme. Seul la composition en acides aminés ne définit pas la biodisponibilité des protéines (Savoie et al., 1989). D'un autre côté, le niveau élevé d'acides aminés à chaîne ramifiée et le faible niveau d'acides aminés aromatiques pourraient être bénéfiques pour la santé (Oomah, 2001 ; Boye et al., 2010), notamment sur la réponse insulinaire (Nilsson et al., 2004 ; Akhavan et al., 2010).

Tableau 1: Composition en acides aminés des lentilles (Boye et al., 2010b)

Acides aminés	Lentilles (<i>Lens culinaris</i>)	
	Référence ^A	Référence ^B
Isoleucine	5.06	9.58
Leucine	8.09	15.86
Lysine	5.69	12.64
Méthionine	1.18	1.63
Phénylalanine	5.55	10.64
Thréonine	5.62	7.57
Tryptophane	ND	ND
Valine	7.24	11.64
Arginine	9.10	14.04
Histidine	6.84	3.95
Alanine	21.32	39.81
Acide aspartique	11.17 ^a	26.10 ^a
Cystine	0.44	0.39
Acide glutamique	24.22 ^b	42.27 ^b
Glycine	10.22	12.66
Proline	8.88	11.36
Serine	11.20	15.60
Tyrosine	5.05	7.53

A (mg/g) sur base sèche (Roza, Yu-Haey et Lambein, 2001)

B (g/16g N) sur base sèche (Evans et Boulter, 1974)

a Acide aspartique + asparagine.

c Acide glutamique + glutamine

2.1.2 Fractions et conformation des lentilles

Les lentilles sont constituées de plusieurs fractions protéiques dont les albumines, les légumine, les vicilines, les glutélines et les prolamines. Ces fractions représentent respectivement 16,8%, 44,8%, 4,2%, 11,2% et 3,5% des protéines totales. La légumine 11S de poids moléculaire de 350 à 400 kDa et la viciline 7S (150 à 200 kDa) sont les deux principales globulines trouvées dans les lentilles. La légumine 11S a une structure quaternaire hexamérique. Chaque sous-unité est composée d'un polypeptide acide de masse moléculaire (MM) d'environ 40 kDa et d'un polypeptide basique (MM de ~20 kDa) reliés par un pont disulfure. La chaîne acide s'oriente vers la périphérie de l'hexamère tandis que la chaîne basique s'oriente vers le cœur du complexe. L'acide glutamique prédomine dans les sous unités acides, alors que l'alanine, la valine et la leucine l'emportent dans les sous unités basiques (Boye et al., 2010b).

La viciline 7S a une structure trimérique (Boye et al., 2010b), qui en raison de l'absence de cystéines, ne forme pas de ponts disulfure. Comme la légumine, la viciline a une structure secondaire riche en feuillets β .

2.1.3 Propriétés fonctionnelles des protéines de lentilles

Les propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires sont très importantes dans la transformation et la formulation des aliments (Boye et al., 2010b). Les protéines de lentilles possèdent aussi certaines propriétés comme la solubilité, la capacité de rétention d'eau, la capacité d'absorption de gras, les propriétés émulsifiante, moussante. Mais la plus importante induite par la chaleur est la gélification.

La variation du pH du milieu produit une modification de l'ionisation des divers groupes acido-basiques à la surface des protéines et la charge globale est affectée. Le pH joue donc un rôle majeur sur la solubilité. En effet, la plus haute solubilité des protéines de lentilles est observée à pH variant de 1 à 3 et 7 à 10. Elle est très faible aux pH proche du point isoélectrique (le point isoélectrique étant égal à 4,5). Dans l'ensemble, la solubilité des protéines de lentilles est bonne. Cependant elle peut dépendre de certains facteurs tels que la méthode d'extraction, la force ionique du milieu.

La gélification est l'une des plus importantes propriétés fonctionnelles utilisées pour modifier la texture des aliments (Ikeda et Nishinari, 2001). Par rapport aux pois secs et

aux pois chiches, les protéines de lentilles ont une meilleure capacité à former des gels par traitement à la chaleur (Boye et al., 2010a). Papalamprou et al. (2009) dans leurs travaux ont suggéré que les procédés de fabrication utilisés pour produire les extraits protéiques pourraient avoir un impact sur leurs propriétés de gélification. Aussi, le degré de chaleur et de modifications de la structure sans oublier la concentration des protéines peuvent affecter la propriété gélifiante des protéines de lentilles.

2.2 Hydrogels protéiques

Un gel protéique est un réseau formé de protéines dans lequel l'eau est emprisonnée. Le réseau est un ensemble de chaînes protéiques enchevêtrées, formant une structure tridimensionnelle. Le réseau est en fait le squelette du gel. Un réseau de protéines est généralement formé par des liaisons non covalentes telles que les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène ou des interactions électrostatiques, et moins fréquemment par des interactions covalentes telles que des ponts disulfures (Totosaus et al., 2002). La contribution relative de chaque type de liaison à un réseau de gel varie avec les propriétés des protéines et des conditions environnementales (Smith, 1994 ; Totosaus et al., 2002). L'intégrité physique du gel est maintenue par le contre équilibre des forces attractives et de répulsions entre les molécules de protéines. Le mécanisme de gélification est déterminé par cet équilibre de forces et par les interactions protéine-solvant (Zayas, 1997). Plusieurs traitements peuvent conduire à la formation de gels que ce soit par pression, par abaissement du pH au point isoélectrique, par addition d'urée, par préchauffage suivi d'un ajout de sel, par traitement thermique à la chaleur etc. Ce dernier traitement est cependant le plus couramment étudié en sciences alimentaires, principalement parce qu'il est responsable de la structure et de la texture de nombreux aliments subissant l'effet de la cuisson de tous les jours (Totosaus et al., 2002).

2.2.1 Gélification thermique

La gélification thermique est généralement considérée comme un processus en trois étapes: dans un premier temps, les protéines se déplient exposant les résidus d'acides aminés hydrophobes, puis se déroulent complètement de façon irréversible. L'agrégation

s'en suit avec l'association des chaînes protéiques jusqu'à l'obtention d'un gel. La température est l'un des facteurs les plus importants lors de la gélification thermique. La chaleur appliquée durant le processus de dénaturation protéique doit permettre aux protéines de perdre leurs structures tertiaire et quaternaire. Plus la température à laquelle les protéines sont soumises est proche de la température de dénaturation, plus les protéines se déplient complètement, exposant ainsi les sites réactifs de même que les zones hydrophobes aux interactions avec les chaînes voisines dans le processus de gélification. Si la concentration protéique atteint la concentration minimale de gélification, un réseau tridimensionnel emprisonnant l'eau est formé (Stading et Hermasson, 1990).

Les liaisons intermoléculaires et intramoléculaires qui stabilisaient la structure native des protéines sont affaiblies. Une nouvelle réorganisation se crée entre les groupements hydrophobes, les groupements thiols et des ponts disulfure auparavant orientés vers l'intérieur (Robin et al., 1993). D'autres types de liaisons, telles que les liaisons hydrogène ou les interactions hydrophobes peuvent également intervenir jusqu'à la formation du réseau. Et quand un nombre élevé de ces groupements sont exposés, les interactions sont inévitables entre ces sites provoquant l'agrégation des molécules de protéines (Nakai, 1983 ; Totosaus et al., 2002). La température de chauffage à laquelle les protéines sont soumises de même que le temps d'exposition affectent leur déroulement. Ceci aura un effet sur l'association des protéines et donc sur le gel formé. (Oakenfull et al., 1997 ; Totosaus et al., 2002). Pendant le refroidissement, il y a réorganisation des chaînes polypeptidiques au sein du réseau. Le réseau se renforce à travers les liaisons hydrogène intermoléculaires influençant la fermeté du gel (Lefèvre et Subirade, 2000).

La concentration protéique est un paramètre à considérer lors de la gélification thermique. En effet, les protéines ont une concentration critique de gélification. Une concentration minimale de 10% serait nécessaire pour former un gel plus ou moins ferme à partir d'un concentré de protéines de lentilles vertes obtenu par précipitation isoélectrique (Boye et al., 2010b).

En dehors de la concentration minimale de gélification qui est importante pour induire un gel thermique, d'autres facteurs influencent la structure et les propriétés des gels thermiques.

2.2.2 Facteurs influençant la structure et les propriétés des gels thermiques

Plusieurs facteurs influencent la structure et les propriétés des gels thermiques. Parmi ceux-ci, le pH et la force ionique jouent un rôle majeur. En effet, le pH peut impacter sur la charge nette des protéines et modifier les forces d'attraction et de répulsion, affectant ainsi les interactions protéines-protéines et protéines-solvant (Phillips et al., 1994). La charge nette d'une protéine à son point isoélectrique étant égale à zéro, lorsque l'environnement autour de la protéine s'éloigne plus de ce point isoélectrique, sa charge augmente plus. En conséquence, plus la charge nette est grande sur une molécule de protéine, plus il y a de répulsions électrostatiques entre les molécules (Langton et Hermansson, 1992 ; Ju et Kilara, 1998 ; Kavanagh et al., 2000).

Quant à la force ionique, elle a un effet sur l'intensité des interactions électrostatiques entre les chaînes protéiques dénaturées, sur l'absorption de l'eau, le gonflement et la solubilité des protéines. Tous ces effets auront un impact sur les caractéristiques finales et la microstructure des gels (Totosaus et al., 2002). La nature des ions présents dans le milieu va aussi influencer la formation des gels. Ainsi, les ions divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+}) sont très actifs dans le processus de gélification thermique comparés aux ions monovalents. Le CaCl_2 , par exemple, non seulement diminue les répulsions électrostatiques entre les chaînes polypeptidiques de par ses charges positives, mais forme des ponts dicalciques entre les charges négatives des groupements carboxyliques (COO^-) des résidus des chaînes polypeptidiques (Hongsparabhas et Barbut, 1997). Sa divalence explique aussi sa plus grande efficacité que le sodium à former un réseau tridimensionnel.

2.3 Digestibilité des protéines globulaires et impact des traitements thermiques

2.3.1 Action des protéases digestives

Après mastication et formation du bol alimentaire dans la bouche, la digestion des protéines commence par la pepsine présente dans le suc gastrique, se poursuit et s'achève par les protéases du suc pancréatique (trypsine, chymotrypsine, élastase, carboxypeptidases) et par les cellules de la muqueuse intestinales (aminopeptidases,

dipeptidases) (Roukik et al., 2006). L'action de la pepsine et l'agitation sont limités dans le corps principal de l'estomac, mais sont plus importante dans le canal pylorique. Une fois que le sphincter pylorique vide son contenu dans l'intestin grêle, les protéines sont exposées à un large éventail d'enzymes, y compris la trypsine et la chymotrypsine (Mackie et Macierzanka, 2010).

Alors que les carboxypeptidases et les aminopeptidases sont des exopeptidases qui agissent sur les extrémités des chaînes COOH et NH₂ des protéines, la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine sont des endopeptidases qui attaquent les liaisons peptidiques situées le long des chaînes et sont responsables de la dégradation des protéines / peptides en petits peptides et acides aminés (Bublin et al., 2008 ; Mills et al., 2004). La pepsine est sécrétée par la muqueuse gastrique sous forme de pepsinogène inactif, lequel est transformé sous l'effet des ions H⁺ dans la lumière gastrique en enzyme active dont le pH optimum est très bas (aux environs de 2). Elle va hydrolyser préférentiellement la liaison peptidique où est engagé le groupement aminé d'une phénylalanine et d'une tyrosine (Nalinanon et al., 2010).

La trypsine est contenue dans le suc pancréatique et poursuit dans l'intestin la digestion des protéines amorcée dans l'estomac par la pepsine. Elle est sécrétée par le pancréas également sous forme d'un précurseur inactif : le trypsinogène. Son activation en trypsine se fait par une transformation qui est soit autocatalytique (sous l'influence de la trypsine elle-même), soit catalytique par une autre enzyme protéolytique telle que l'entérokinase sécrétée par la muqueuse duodénale. La trypsine a un pH optimum voisin de 8. Elle agit au niveau des liaisons peptidiques auxquelles la lysine et l'arginine participent par leur carboxyle (Khantaphant et Benjakul, 2010).

La chymotrypsine est également sécrétée par le pancréas sous forme d'un zymogène, le chymotrypsinogène, transformé en chymotrypsine sous l'action de la trypsine. Elle a aussi un pH optimum voisin de 8. La chymotrypsine coupera préférentiellement les liaisons auxquelles participent les groupements carboxyliques des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) (Khantaphant et Benjakul, 2010).

Plusieurs facteurs ont un rôle majeur sur l'activité des enzymes (Boisen et Eggum, 1991). Il y a les facteurs intrinsèques qui sont ceux propres à l'aliment. On peut ainsi citer les substances anti-nutritionnelles (par exemple, les inhibiteurs de protéase, les lectines, les

phytates et les polyphénols) présentes dans l'aliment, la conformation des protéines et l'interaction des protéines avec des composants susceptibles de former des complexes (Nielsen, 1991). Les inhibiteurs de trypsine, par exemple, sont des protéines de faible poids moléculaire capable d'inactiver la trypsine (Salunkhe et Kadam, 1989). Les tanins peuvent en se liant aux protéines par des liens hydrogène et hydrophobes, former des complexes responsables de la faible digestibilité des protéines (Adsule et Kadam, 1989 ; Hahn et al., 1984). Les facteurs extrinsèques peuvent aussi modifier l'action des enzymes et notamment les traitements technologiques subis par l'aliment. On peut citer par exemple, le traitement à la chaleur qui peut réduire la teneur en substances anti-nutritionnelles dans l'aliment et favoriser la digestibilité des protéines (Moughan et al., 2008). La chaleur peut également dénaturer les protéines, rendant les protéines 1) soit plus facilement digestibles par bris d'interactions moléculaires et ouverture subséquente des structures protéiques, facilitant ainsi l'accessibilité des enzymes digestives, ou 2) soit plus difficilement digestibles par formation de nouvelles interactions moléculaires (cross-links) peu ou pas attaques par les enzymes du système digestif. Les traitements alcalins appliqués aux aliments pour augmenter leur solubilité peuvent aussi avoir des conséquences sur l'action des enzymes notamment les pH élevés (pH 10-11) en dénaturant les protéines ou alors en favorisant l'oxydation de certains acides aminés comme la méthionine, la cystéine (Friedman, 1996) ou la formation de lysinoalanine (Moughan et al., 2008).

De plus, étant donné que l'action des enzymes est largement fonction de la structure des protéines, de leur dénaturation et de leur agrégation, ce point est abordé dans le paragraphe suivant.

2.3.2 Influence de la structure protéique sur l'action des protéases digestives

La digestibilité des protéines est largement influencée par la présence ou non des facteurs antinutritionnels et de la structure-conformation des protéines. Les études ont montré l'impact de la structure secondaire sur la résistance à l'activité protéolytique. En effet, Yu (2005) a démontré qu'un niveau élevé de structure en feuillet- β pourrait être responsable de l'accès insuffisant aux enzymes protéolytiques et pourrait, par conséquent, diminuer la digestibilité des protéines. Or, les protéines globulaires ont un nombre élevé de structure

en feuillet β et le traitement à la chaleur ne diminue pas les régions en feuillet- β intermoléculaires (Lefèvre et Subirade, 2000). Carbonaro et al. (1997) dans leurs travaux ont démontré que les polypeptides basiques de la légumine 11S des légumineuses sont caractérisés par une structure très ordonnée et d'une hydrophobicité élevée. Avec leur structure hexamérique, les polypeptides basiques forment le noyau de la sous-unité (ou de la globuline) et sont donc protégés contre l'attaque des protéases. En 2000, Carbonaro et al. dans leurs travaux de digestion in vivo ont récupéré une forte concentration d'acides aminés hydrophobes, tels que l'alanine, la valine, la méthionine, l'isoleucine, la phénylalanine de protéines non digérées.

Selon Tang et al. (2009), le traitement thermique au-delà de 95 °C a une influence à la fois bénéfique et néfaste sur la digestibilité des protéines. Les effets bénéfiques comprennent l'inactivation des inhibiteurs d'enzymes digestives et le déroulement des protéines induit par la chaleur, tandis que l'agrégation de protéines dénaturées est l'un des effets néfastes importants avec formation de nouvelles interactions moléculaires qui sont peu ou pas attaques par les enzymes digestives. Or l'agrégation des protéines est étroitement liée à leur stabilité conformationnelle, tandis que cette dernière est largement tributaire de l'équilibre entre leurs résidus d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes. La faible digestibilité des protéines globulaires traitées à la chaleur pourrait être liée à l'hydrophobie élevée de polypeptides basiques. Ces polypeptides pourraient donner lieu à des macromolécules complexes de poids moléculaires très élevés à la chaleur et probablement stabilisées par la formation de liaison S-S dans les régions hydrophobes (Carbonaro et al., 2000). Dans la même perspective, Carbonaro et al. (1997 et 1993) ont mentionné que la formation d'agrégats de protéines par la chaleur à travers des groupes sulfhydriles et par des interactions entre des résidus acides et basiques produisant une résistance plus élevée aux protéases. De plus, Otterburn et al. (1977) ont suggéré que la formation d'un réseau tridimensionnel obtenu par les interactions électrostatiques, hydrophobes et les liens de réticulation en chauffant des protéines ou en ajoutant des sels, pourrait faire obstacle à la pénétration d'enzymes digestives ou masquer les sites d'attaques des enzymes.

Les travaux de Remondetto et al. (2004) ont montré également que la microstructure des gels a un impact majeur sur leur digestibilité modulant la diffusion des enzymes dans le réseau et donc leur dégradation. Abdel-Aal (2008) a indiqué que le choix des enzymes protéolytiques, des conditions de digestion, et la conformation des protéines pourraient aussi avoir un impact considérable sur la digestibilité des protéines.

Chapitre 3

HYPOTHÈSE, BUT ET OBJECTIFS

3 Hypothèse, but et objectifs

3.1 Hypothèse

L'hypothèse suivante est formulée : « Les conditions de dénaturation et gélification des protéines de lentilles permettent de moduler leur dégradation enzymatique au niveau gastro-intestinal »

3.2 But et objectifs

L'objectif principal de ce travail est d'étudier l'impact des différentes conditions de traitement thermique des protéines de lentilles sur leur sensibilité aux enzymes digestives dans le but de moduler leur digestibilité.

Pour atteindre notre but et de vérifier notre hypothèse, deux objectifs spécifiques ont été définis :

Objectif 1: Comprendre l'impact de la chaleur sur la dénaturation et les modifications de structure dans le processus de gélification des protéines de lentilles, en variant le pH et la force ionique du milieu.

Objectif 2: Évaluer l'impact de la chaleur à l'hydrolyse enzymatique des structures gélifiées, dénaturées et natives en simulant le système gastro-intestinal.

Chapitre 4

ÉTUDE DES TRAITEMENTS THERMIQUES SUR LA DÉNATURATION ET LA GÉLIFICATION DES PROTÉINES DE LENTILLES EN FONCTION DES CONDITIONS DU MILIEU

4 Étude des traitements thermiques sur la dénaturation et la gélification des protéines de lentilles en fonction des conditions du milieu

Résumé

L'influence du pH et de la force ionique sur la dénaturation et la gélification des protéines de lentilles a été étudiée par DSC, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et rhéologie. La dénaturation des protéines est un préalable nécessaire à un début de formation de gels dans toutes les conditions de pH et de force ionique étudiées. Le CaCl_2 augmente la température de dénaturation, par contre le pH n'a significativement pas d'effet sur les protéines traitées thermiquement à la chaleur. À pH 3 en présence et en absence de CaCl_2 et à pH 7 sans CaCl_2 , la chaleur nécessaire à la transition au gel est plus importante et au-delà de la température de dénaturation tandis qu'à pH 9 en présence et en absence de CaCl_2 et à pH 7 avec CaCl_2 , l'agrégation peut commencer avant le dépliage complet de la molécule. Les variations dans le comportement d'association-dissociation des protéines de lentilles pendant le chauffage en fonction du pH et de la force ionique ont eu un impact sur l'élasticité des gels de protéines de lentilles. En effet, en absence de CaCl_2 , l'élasticité des gels augmente avec le pH et est plus élevée à pH 9 qu'à pH 7 et à pH 3. En présence de CaCl_2 , le module élastique G' augmente également avec le pH mais cette augmentation est plus importante en présence qu'en absence de sel. De cette étude, il ressort que la présence de calcium a un effet sur la formation et les propriétés élastiques des gels dans toutes conditions étudiées. L'effet du pH est plus marqué à pH 9 et moins à pH 3. Dans le prochain chapitre, l'impact du traitement thermique à la chaleur sur la digestibilité de protéines de lentilles sera étudié.

4.1 Introduction

Les lentilles sont l'une des plus importantes légumineuses produites au Canada (Pulse Canada, 2010). Les lentilles contiennent 17 à 30% de protéines et apportent des quantités élevées de certains acides aminés essentiels comme la lysine, la leucine, l'isoleucine et la valine. Les lentilles sont considérées comme de nouvelles sources de protéines, à moindre coût et pouvant constituer une alternative intéressante pour remplacer les protéines déjà existantes (Lee et al., 2007). Par contre, dans certains pays, les lentilles servent déjà de succédané de viande en raison de la quantité et de la qualité des protéines qu'elles contiennent. Ces dernières années, les protéines de lentilles ont fait l'objet de nombreux travaux mettant en évidence tant leurs propriétés fonctionnelles que bioactives (Roy et al., 2009 ; Barbana et Boye, 2010 ; Boye et al., 2010c).

De plus, Barbana et Boye (2010) ont identifié des peptides ayant des propriétés inhibitrices d'enzymes de conversion d'angiotensine I. Par ailleurs, les protéines de lentilles ont des propriétés fonctionnelles intéressantes qui permettent d'améliorer la fabrication des produits alimentaires. Elles possèdent notamment la capacité à former des gels par traitements thermiques à la chaleur (Ikeda et Nishinari, 2001 ; Boye et al., 2010a). La formation de gels thermiques à la chaleur des protéines de lentilles, à l'instar des autres protéines globulaires, tel que le soya, est un processus complexe, comportant plusieurs étapes telles que la dénaturation, la dissociation-association et l'agrégation (Hermansson, 1978). Plusieurs facteurs tels que le pH et la force ionique peuvent affecter la dénaturation et la gélification des protéines.

En effet, le pH peut avoir un effet marqué sur la structure des protéines et les forces d'interaction protéines-protéines. Tout comme le pH la concentration en sels peut influencer les taux de dénaturation et de solubilité des protéines. Aussi, certains sels comme le calcium sont capables de former des liaisons sous forme de pontages entre chaînes de protéines voisines et aider à la formation d'un réseau de gel (Puppo et Anon 1999 ; Hua et al. 2005).

Cependant, l'impact de la chaleur sur la dénaturation et la gélification des protéines de lentilles en fonction du pH et de la force ionique n'a pas encore été étudié et fait l'objet du présent travail.

4.2 Matériels et Méthodes

4.2.1 Matériels

Les grains de lentilles vertes de la variété Laird provenant de Saskatchewan ont été fournis par Pulse Canada. Le décorticage a été réalisé à l'aide d'un moulin Quadro (Quadro Engineering Inc, Ontario, Canada) et la séparation des coques avec un séparateur d'air (Sullivan Forte Scott, Ontario, Canada). Les graines obtenues ont été broyées en fine farine avec un moulin Retsch centrifuge (Brinkmann Instruments, Ontario, Canada). Tous les matériaux et produits chimiques utilisés ont été de qualité analytique et ont été achetés chez Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA).

4.2.2 Préparation de l'extrait de protéines de lentilles

L'extrait de protéines de lentille a été préparé suivant la méthode de Boye et al. (2010b). Brièvement, le procédé d'extraction (Figure 1) consiste à disperser la farine de lentilles (après décorticage) dans de l'eau en utilisant un ratio farine/eau de 1/12. Le pH du mélange est ajusté à pH 9 et la préparation est laissée au repos pendant 180 minutes pour améliorer la solubilité des protéines. Le mélange est ensuite centrifugé pour éliminer toutes matières insolubles et le pH ramené au point isoélectrique (pH 4,5) afin de précipiter les protéines. Le mélange contenant le précipité isoélectrique est d'abord centrifugé pour récupérer les protéines puis de l'eau déionisée est ajoutée pour éliminer les sels. Le mélange est à nouveau centrifugé pour débarrasser les protéines de l'eau et des sels. L'extrait protéique ainsi récupéré est solubilisé dans de l'eau distillée en ajustant le pH à 7 avec le NaOH 5N avant d'être finalement lyophilisé et conservé à température pièce pour utilisation ultérieure.

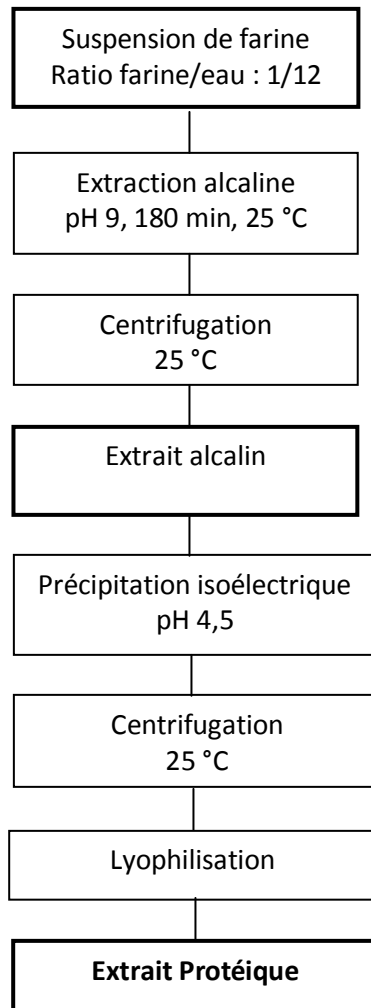


Figure 1 : Différentes étapes du processus d'extraction des protéines de lentilles vertes (Boye et al., 2010b).

4.2.3 Composition physico-chimique de l'extrait protéique

Les analyses physico-chimiques ont été réalisées pour connaître le niveau de pureté de l'extrait protéique. Les proportions de protéines, d'humidité, de gras, de cendres et d'amidon ont été mesurées.

La teneur en protéine a été déterminée en utilisant un appareil LECO (LECO FP-428, LECO Corp, Saint-Joseph, MI, USA), basée sur la méthode de Dumas (AOAC, 1995) ou encore la méthode de dosage de l'azote total par combustion. Le facteur de conversion de l'azote total généralement appliqué aux protéines de légumineuses est de 6,25. L'humidité

et la teneur en cendres ont été déterminées par des méthodes gravimétriques (AOAC 925.10, 2000) et (AOAC 942.05, 2000), respectivement.

Le kit de dosage d'amidon (amylase/amyloglucosidase) de SIGMA ALDRICH a été utilisé pour déterminer la teneur en amidon de l'extrait protéique. La teneur en matières grasses a été déterminée par la méthode Soxhlet (extraction par solvant) selon la méthode AOAC 945.39 (2000).

4.2.4 Solubilité de l'extrait protéique

L'indice de solubilité de l'azote (NSI) a été déterminé par la méthode Kjeldhal (IDF 20A : 1986). L'extrait protéique a été dispersé dans de l'eau bidistillée (1% (p/v)). Les solutions ont été ajustées aux pH 2, 3, 6, 7 et 8 avec du NaOH 1M ou du HCl 1M. Les solutions ont été agitées pendant 2 heures à 22 ± 2 °C tout en réajustant les pH aux 60 minutes, puis centrifugées pendant 10 minutes à 3000 g à 22 ± 2 °C. Le surnageant a été filtré sur un filtre Whatman Grade 1 utilisé en industrie alimentaire pour séparer les solides de l'état liquide. L'azote soluble a été dosé selon la méthode Kjeldhal.

L'indice de solubilité de l'azote (NSI) a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{NSI} = \text{Ns} / \text{Nt}$$

Où **Ns** est l'azote soluble, correspondant à l'azote total du filtrat et **Nt**, l'azote total de l'échantillon, avant dispersion.

4.2.5 Préparation des dispersions protéiques

Des études préliminaires effectuées à différentes concentrations en protéines dans des conditions variées de pH et de force ionique ont permis de fixer la concentration minimale de gélification des protéines à 10%. Les conditions de pH ont été choisies sur la base de la solubilité des protéines tout en excluant les conditions extrêmes de pH soient 2 et 10. Aussi le pH initial (pH $7 \pm 0,2$) de la protéine a également été étudié.

Les effets de la force ionique ont été observés en variant les concentrations en sels de 0, 10, 20 et 50 mM de CaCl₂.

4.2.5.1 Solutions protéiques avec et sans CaCl₂

Les solutions protéiques préparées en absence de sel ont été obtenues en dispersant 10% (p/v) de protéines de lentilles dans une solution de 0,1M de tampon phosphate à pH 3, 7 et 9. Les protéines ont été dispersées sous agitation pendant 10 heures à 4 ± 1 °C afin d'obtenir une meilleure dissolution. Les solutions ont ensuite été ajustées aux différents pH d'étude avec le NaOH 1N ou le HCl 1N juste avant le traitement à la chaleur.

Les solutions protéiques en présence de CaCl₂ ont été obtenues après ajout de 0,5 M de CaCl₂ concentré aux solutions protéines dissoutes dans les différents tampons phosphates 0,1 M à pH 3, 7 et 9 de manière à obtenir une préparation de 10, 20 et 50 mM de CaCl₂ en solution.

4.2.6 Formation de gel thermique

Les gels thermiques ont été réalisés en utilisant la méthode de Boye et al. (2010a). Les solutions protéiques ont été chauffées pendant 30 minutes dans un bain-marie maintenu à 100 °C. Afin d'éviter toute évaporation d'eau des échantillons, les contenants ont été fermés hermétiquement. Après le traitement thermique, les échantillons ont été refroidis dans un bain-marie à 25 °C puis laissés à la température pièce pour environ une heure avant de les conserver à la chambre froide à 4 ± 1 °C pour analyses ultérieures.

4.2.7 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La dénaturation thermique des protéines de lentilles dans différentes conditions de pH et de CaCl₂ a été suivie par calorimétrie différentielle à balayage (modèle 2910, TA Instruments Inc, New Castle USA). L'appareil a été calibré par le standard indium. La concentration en protéines des solutions analysées était de 10% (p / v). Des solutions protéiques à pH 3, 7 et 9 avec et sans sel ont été analysées. Les solutions avec sel contenaient 10, 20 ou 50 mM de CaCl₂. Une cuve en aluminium hermétiquement fermée contenait environ 10 mg de ces échantillons et l'autre cuve vide était considérée comme référence. Les échantillons ont été chauffés sous hélium de 20 à 120 °C à une vitesse de balayage de 5 °C/min et ensuite refroidis à 20 °C à la même vitesse. Les données ont été traitées en utilisant le logiciel « Universal Analysis TA Software ». Tous les échantillons ont été analysés en triple exemplaires.

4.2.8 Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les modifications de la structure moléculaire des protéines induites par chauffage dans différentes conditions de pH et de CaCl_2 ont été étudiées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Des solutions tampons phosphate de pH 3, 7 et 9 avec et sans CaCl_2 ont été préparées en utilisant D_2O . L'oxyde de deutérium (D_2O) a été utilisé au lieu de l'eau (H_2O) en raison du fait que D_2O ne possède pas de bande d'absorption dans la région où la bande amide I est observée (entre 1600 et 1700 cm^{-1}). L'extrait protéique a été dissout (126 mg/ml) dans les différents tampons D_2O , 24 heures avant l'analyse afin de permettre l'échange hydrogène-deutérium. Des aliquotes (10 μl) de chaque échantillon ont été placées dans une cellule infrarouge entre deux fenêtres CaF_2 , avec un espaceur de 25 μm , et les spectres infrarouge ont été enregistrés en variant la température de 25 °C à 95 °C à raison de 5 °C/min en utilisant un spectromètre FTIR (FTS 3000 Bio-Rad) équipé d'un détecteur DTGS, sulfate de triglycine deutéré (Bio-Rad Laboratories, Cambridge, MA). Le spectromètre a été purgé à l'air sec pendant 10 min avant l'enregistrement des spectres. Pour chaque échantillon, 256 scans ont été enregistrés avec une résolution de 2 cm^{-1} . Le rapport signal-bruit était > 20000:1. La déconvolution a été réalisée en utilisant le logiciel Digilab Merlin FTIR (version 3.4) avec comme paramètres de déconvolution une bande passante de 16 cm^{-1} et un facteur de rétrécissement de 2,8.

4.2.9 Mesures rhéologiques en petites déformations

La formation thermique des gels des différentes solutions de pH 3, 7 et 9 sans ou avec 50 mM de CaCl_2 a été suivie par des mesures rhéologiques en petites déformations avec un rhéomètre AR 1000-N (TA Instruments New Castle, Delaware, USA) équipé d'une géométrie plate (plaque-plaque) en acier de 40 mm de diamètre, d'angle 0°. Les mesures étaient effectuées à une contrainte imposée de 1 Pa et à une fréquence angulaire de la contrainte imposée de 6,28 rad/s, déterminées dans la région viscoélastique linéaire. Le cycle thermique a consisté d'abord en une étape de chauffage de 20 à 90 °C à une vitesse de 5 °C/min, suivie d'une étape isotherme de 30 min à 90 °C et enfin, d'une étape de refroidissement à 20 °C toujours à la même vitesse de balayage 5 °C/min. L'élasticité du gel a été évaluée par la mesure du module d'élasticité (G') durant le cycle de traitement

thermique (Renkema, 2004 ; Speroni et al., 2010). La température de gélification a été déterminée en repérant le point où G' commence à augmenter brusquement ou par delta degré β ($\beta = G''/G'$), qui est une propriété dynamique importante très utilisée qui permet de déterminer la température de transition du système. Une diminution de delta degré à partir de 45° , correspond à la transition de la solution à gélifier. G' indique le module de conservation, car il caractérise l'énergie emmagasinée dans l'échantillon sous forme élastique et G'' appelé module de perte, caractérise l'énergie dissipée dans l'échantillon sous forme visqueuse (Taherian et al., 2008).

4.2.10 Analyses statistiques

Cinq répétitions ont été effectuées dans chaque cas et les données ont été analysées en utilisant le programme informatique SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) pour déterminer le niveau de signification des paramètres tels que le pH et la concentration en CaCl_2 . L'analyse comparative des moyennes des températures et des enthalpies de dénaturation a également été effectuée en utilisant le test de Duncan ($p < 0,05$) pour déterminer les différences significatives.

4.3 Résultats et discussions

4.3.1 Composition physico-chimique de l'extrait protéique

L'extraction aqueuse alcaline suivie d'une précipitation isoélectrique a permis d'obtenir un extrait protéique de 1,8 kg à partir de 22 kg de farine de lentilles, soit un rendement d'extraction de 8,18 %.

La composition physico-chimique de l'extrait de protéines de lentilles vertes est mentionnée dans le Tableau 2. La teneur en protéine de l'extrait protéique était d'environ 85,6% sur base humide. Cette teneur en protéine semble être plus élevée que celle obtenue par Boye et al. (2010a) soit $79,1\% \pm 0,3$; par contre, elle est proche de celle obtenue par Bhatti et Christison (1984), soit 86,7%. En revanche, les taux de matière grasse et de cendres qui sont respectivement de 1,92% et 3,37% paraissent plus faibles que ceux de Bhatti et Christison (1984), qui sont de 3,9 % et 5,0% respectivement. Les différences dans la composition de l'extrait de protéines pourraient être liées aux conditions de traitement (temps et température de traitement, l'environnement, le matériel etc..) durant le processus d'extraction, de la variété utilisée et la saison de culture (Russin et al., 2007). La teneur d'humidité relevée dans l'extrait protéique est de 7,30%.

Tableau 2: Composition de l'extrait protéique de lentilles vertes.

Composition (%)	Extrait protéique	Références ⁽¹⁾	Boye et al. (2010a)
Protéine	$85,57 \pm 0,32$	86,7	$79,1 \pm 0,3$
Humidité	$7,30 \pm 0,03$	ND	ND
Matière Grasse	$1,92 \pm 0,22$	3,9	ND
Cendres	$3,37 \pm 0,15$	5,0	ND
Amidon	$1,12 \pm 0,07$	0,6	ND

ND : Non déterminé. (1) Ratio farine/eau de 1:10 ; 0,3M NaCl ; pH 6 ; pour 60 min à 25 °C. Centrifugation suivie de précipitation isoélectrique (Bhatti et Christison, 1984).

4.3.2 Solubilité de l'extrait protéique

Les résultats de solubilité, présentés à la figure 2, montrent que la solubilité de l'extrait protéique était plus élevée aux pH 2 et 8, soit 82 et 89 % respectivement. Par contre elle était plus faible à pH 6, soit 28 %. Ces résultats sont en accord avec ceux de Boye et al. (2010a) et de Carbonaro et al. (1997) qui montrent que la solubilité des protéines de légumineuses est plus élevée au fur et à mesure que l'on s'éloigne du point isoélectrique des protéines (pI= 4,6 pour les globulines). Ceci s'explique par le fait qu'au pI, il n'y a pas de charges nettes sur la protéine; par conséquent, il n'existe pas d'interactions répulsives et la solubilité est faible du fait des interactions protéines-protéines qui sont alors privilégiées (Singh et al., 2005). Quand on s'éloigne du pI, des charges nettes sont induites et les interactions protéines-eau sont alors favorisées, rendant la protéine soluble.

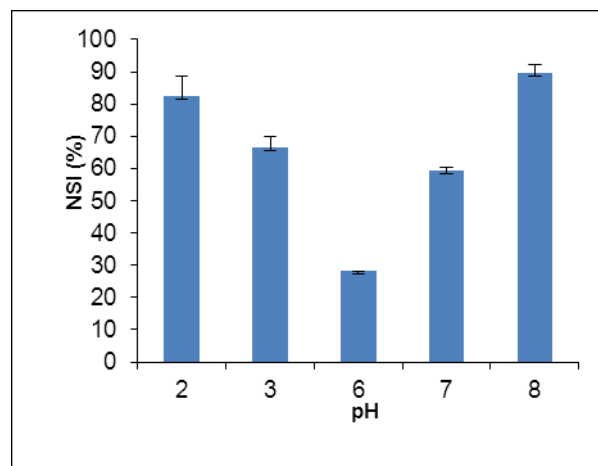


Figure 2: Solubilité des protéines de lentille en fonction du pH

4.3.3 Calorimétrie différentielle à balayage

Le DSC a permis de détecter des changements conformationnels induits thermiquement dans les différentes solutions protéiques à pH 3 (Figure 3), à pH 7 (Figure 4) et à pH 9 (Figure 5) avec et sans CaCl₂. Les expériences de DSC ont montré que les températures initiale et maximale de dénaturation étaient observées dans toutes les conditions étudiées; les résultats sont présentés dans le tableau 3. Ces résultats montrent qu'en l'absence de CaCl₂, il n'existe pas de différences significatives ($p < 0,05$) entre la température de dénaturation (Td) des différentes solutions protéiques à pH 3, 7 et 9. Par contre

l'enthalpie de dénaturation, qui exprime la somme de deux transitions endothermiques et exothermiques lors du traitement thermique, semblait plus faible à pH 3 et significativement différente ($p < 0,05$) que l'enthalpie à pH 7 et 9. Ce qui signifie que la chaleur spécifique nécessaire au chauffage et à la dénaturation des protéines est plus faible à pH 3. Bien que le nombre de groupes chargés des protéines soit différent et fortement lié à la quantité d'eau associée aux protéines, les changements de pH n'ont pas significativement modifié la température de dénaturation des protéines.

En présence de CaCl_2 aux différents pH d'étude, T_d semblait augmenter quand la concentration en sel augmentait. Mais cette augmentation restait non significative ($p < 0,05$) aux concentrations en CaCl_2 de 10 et 20 mM. Ce qui laisse suggérer que jusqu'à 20 mM de CaCl_2 , le sel a très peu d'effet sur la température de dénaturation. Par contre, l'augmentation de la température de dénaturation observée avec 50 mM de CaCl_2 restait significative dans toutes les conditions de pH étudiées. Par ailleurs, une seconde transition a été observée à 101,66 °C à pH 3 en présence de 50 mM de CaCl_2 par contre cette transition était significativement différente de celle obtenue à 86,37 °C ($p < 0,05$). À ce même pH et à la même force ionique, l'enthalpie de dénaturation (ΔH) qui mesure la quantité de chaleur mise en jeu dans le processus de dénaturation était très faible à 101,66 °C et significativement différent ($p < 0,05$) qu'à 86,37 °C (figure 3). Pour nos travaux en général, ΔH augmente quand la concentration en CaCl_2 augmente, mais l'augmentation reste non significative ($p < 0,05$) à 0, 10 et 20 mM et significative ($p < 0,05$) à 50 mM, ceci dans les trois cas de pH étudié.

La dénaturation, qui est une étape préalable à la formation de gel (Matsumura et Mori, 1996) permet d'exposer les sites hydrophobes qui pourront réagir ensemble. Aux pH 3, 7 et 9 en absence de CaCl_2 , on s'éloigne de la région du point isoélectrique et les interactions électrostatiques produites augmentent les répulsions protéines-protéines (Puppo et al., 1995). Le pH peut avoir un effet marqué sur le comportement structural et thermique des protéines et sur la quantité d'eau qui peuvent être liés aux protéines (Hermansson, 1979 ; Meng et Ma, 2000 ; Paredes-Lopez et al., 1991 ; Renkema, 2001).

Dans les conditions sans CaCl_2 aux différents pH 3, 7 et 9, les températures de dénaturation étaient significativement similaires. Par ailleurs, avec l'ajout de CaCl_2 , la répulsion électrostatique entre les chaînes polypeptidiques semblait diminuer lorsque la

force ionique augmentait, favorisant ainsi les interactions entre celles-ci. Au-dessus du point isoélectrique ($\text{pH} > \text{pI}$), plus le pH s'approchait du pI et plus l'ajout de sel augmentait la température de dénaturation. La Td à pH 7 avec 50 mM de CaCl_2 était plus élevée que celle à pH 9 en présence de 50 mM de CaCl_2 car pH 7 est plus proche du pI que pH 9. Seule une concentration de 50 mM était plus efficace à réduire des charges négatives des protéines dans les mêmes conditions de pH. Hermansson (1986) a également mentionné qu'une certaine quantité de CaCl_2 indépendamment des protéines, serait nécessaire pour neutraliser les charges des protéines et favoriser les interactions protéines-protéines quand le pH s'éloigne du pI. En d'autres termes, la concentration en ions calcium de 50 mM peut affecter les taux de dénaturation des protéines et la solubilité des molécules de protéines dénaturées. Le calcium est également considéré comme un agent efficace de réticulation de protéines. Dans la même perspective Privalov (1979) ; Hermansson (1986) ; Scilingo et Anon (2004) ont rapporté dans leurs études portant sur les protéines de soja, l'augmentation de la température de dénaturation en relation à l'ampleur des interactions entre les chaînes protéiques due à la quantité de CaCl_2 .

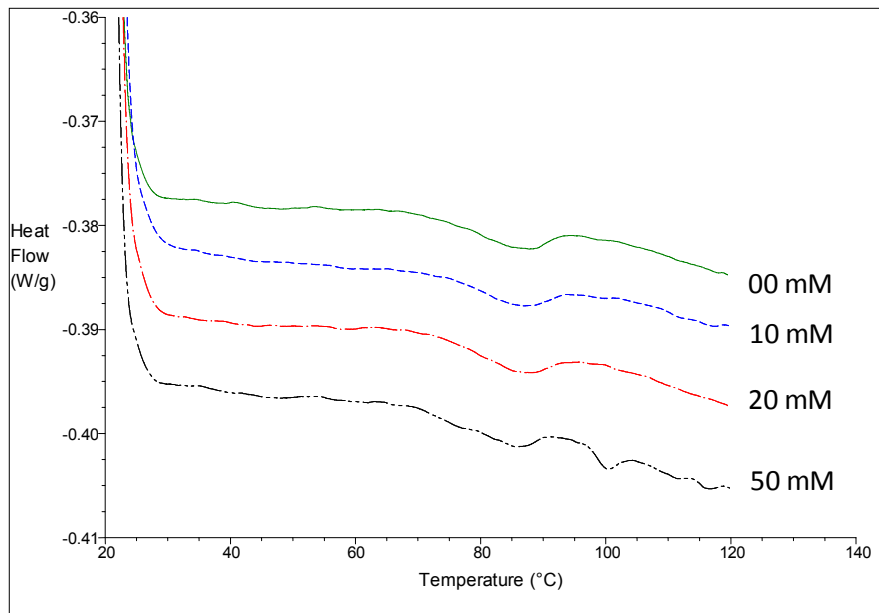


Figure 3: Thermogramme DSC des solutions de protéines de lentilles à 10% (p/v) à pH 3 avec 0, 10, 20 et 50 mM de CaCl_2 , chauffées de 20 à 120 °C à la vitesse de balayage de 5 °C/min.

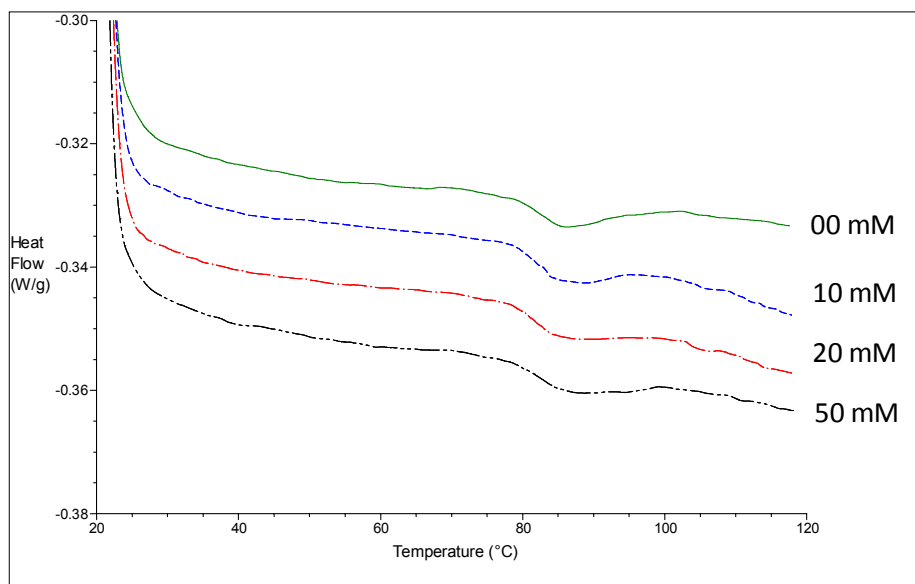


Figure 4: Thermogramme DSC des solutions de protéines de lentilles à 10% (p/v) à pH 7 avec 0, 10, 20 et 50 mM de CaCl₂, chauffées de 20 à 120 °C à la vitesse de balayage de 5 °C/min.

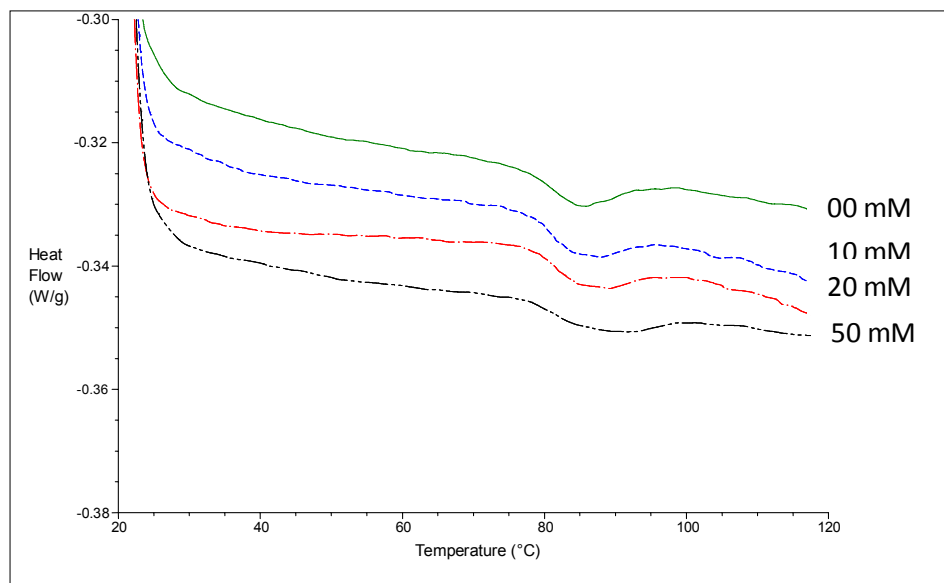


Figure 5: Thermogramme DSC des solutions de protéines de lentilles à 10% (p/v) à pH 9 avec 0, 10, 20 et 50 mM de CaCl₂, chauffées de 20 à 120 °C à la vitesse de balayage de 5 °C/min.

Tableau 3: Effets du pH et de la force ionique sur la température et l'enthalpie de dénaturation des protéines de lentilles

Concentration (%)	Types de solutions		Td (°C)	ΔH (J/g de protéine)
	pH	CaCl ₂ (mM)		
10	3	00	85,39 ± 0,04 ^a	2,72 ± 0,39 ^e
		10	85,61 ± 0,51 ^a	3,07 ± 0,18 ^e
		20	86,35 ± 0,38 ^a	3,17 ± 0,22 ^e
		50	86,37 ± 0,04 ^a	3,36 ± 0,27 ^e
			(101,66 ± 0,27) ^d	(0,63 ± 0,06) ^f
	7	00	85,28 ± 0,63 ^a	4,00 ± 0,64 ^g
		10	85,56 ± 0,53 ^a	4,08 ± 0,55 ^g
		20	86,12 ± 1,40 ^a	4,20 ± 0,30 ^g
		50	89,03 ± 0,35 ^b	5,26 ± 0,29 ^h
	9	00	85,30 ± 0,83 ^a	4,23 ± 0,27 ^g
		10	85,54 ± 0,36 ^a	4,26 ± 0,68 ^g
		20	85,89 ± 0,84 ^a	4,43 ± 0,19 ^g
		50	87,36 ± 0,55 ^c	5,07 ± 0,57 ⁱ

Variables indiquées par des lettres différentes dans une colonne sont significativement différentes à $p < 0,05$.

4.3.4 Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR a été utilisée pour observer les modifications de la structure moléculaire des protéines dans les différentes conditions de notre étude. En présence de sels, uniquement la concentration 50 mM de CaCl₂ a été étudiée car les études par DSC ont prouvé qu'il n'existait pas de différence significative de température de dénaturation pour les autres concentrations (10 et 20 mM).

La Figure 6 montre les spectres déconvolués dans la région de la bande amide I' (1700 - 1600 cm⁻¹, région sensible aux composants de la structure secondaire (Jackson et Mantsch, 1995)) des protéines à 10% dans du D₂O à pH 3, 7 et 9 en présence et en absence de CaCl₂. Les solutions protéiques ainsi préparées ont été chauffées de 25 à 95 °C. Dans ces conditions d'étude à 25 °C, la bande amide I' est composée de cinq composantes, qui correspondent à des structures secondaires. Les composantes situées à 1634 et 1691 cm⁻¹ sont attribuées aux feuillets β parallèles et antiparallèles respectivement. Le pic situé à 1652 cm⁻¹ est attribué aux hélices α et ceux présents à 1676 cm⁻¹ et à 1614 cm⁻¹ sont liés aux coudes et à la présence d'agrégats dans l'extrait protéique (Jackson et Mantsch, 1995).

Lorsque la température augmente, à pH 3, 7 et 9, des modifications ont été observées au niveau des échantillons en absence de CaCl₂. En effet, la bande à 1691 cm⁻¹ est disparue au-delà de 50 °C à pH 3 mais à 40 °C à pH 7 et dès 35 °C à pH 9. Ce changement dans la structure secondaire serait associé au début de la dénaturation des chaînes polypeptidiques (Boye et al., 1997). De plus, entre 50 et 55 °C, de nouveaux pics sont apparus à 1618 et à 1682 cm⁻¹. Le premier à 1618 cm⁻¹ serait attribué aux feuillets β intermoléculaires résultant de l'agrégation (Clark et al., 1981), tandis qu'à 1682 cm⁻¹ le pic d'absorption pourrait indiquer que feuillets β sont antiparallèles (Bandekar, 1992). Outre cela, les feuillets β intramoléculaires à 1634 cm⁻¹ ont diminué au profit des feuillets β intermoléculaires (1618 cm⁻¹) dus à l'agrégation à partir de 60-65 °C dans les trois cas de pH.

La figure 7 représente l'évolution du ratio des bandes 1618/1634 démontrant la formation d'agrégats durant le chauffage de 25 °C à 90 °C. Le ratio détermine l'intensité des feuillets β intramoléculaires à 1634 cm⁻¹ par rapport aux intermoléculaires à 1618 cm⁻¹. Dans les conditions sans sel et jusqu'environ 85 °C, les agrégats se sont formés plus

rapidement à pH 9 qu'à pH 7 et 3 mais beaucoup moins à pH 3. Au-delà de 85 °C, la formation d'agrégats à pH 3 est devenue plus importante.

En présence de CaCl₂, la température du début de dénaturation des chaînes polypeptidiques a été observée à plus de 50 °C, 40 °C et à 35 °C respectivement à pH 3, 7 et 9. La figure 7 montre que la formation d'agrégats a été plus importante à pH 7 qu'à pH 3 et 9 jusqu'à 65 °C. Au-delà de cette température, le processus d'agrégation était moins important qu'avec la variation de pH. La formation d'agrégats semble plus importante en présence de CaCl₂ que dans les conditions sans CaCl₂. Ces résultats confirment ceux obtenus au niveau du DSC où l'ajout de 50 mM de CaCl₂ aurait des actions différentes sur les chaînes de protéines durant le chauffage dépendamment des conditions de pH. Dans les conditions de pH proche du pI (pH ≈ pI), l'ajout de 50 mM de CaCl₂ augmenterait la température de dénaturation mais les agrégats se formaient beaucoup plus durant le processus de chauffage. Cette augmentation de la température de dénaturation peut être expliquée par le fait que le CaCl₂ aurait une action marquée sur la charge nette des sous unités protéiques pendant le début du processus de chauffage (Chronakis, 1996 ; Kroll, 1984). En effet, l'augmentation de l'intensité d'agrégation en présence de CaCl₂ pourrait dépendre de l'ampleur des interactions protéines-protéines. Dans les conditions à pH 7 et 9, le calcium sera impliqué dans la formation de pontages entre chaînes de protéines voisines. Ces liaisons seraient entre les ions Ca²⁺ et les charges négatives des groupements carboxyliques (COO⁻) des résidus des chaînes polypeptidiques aidant ainsi à la formation d'un réseau protéique. (Hongsparabhas et Barbut, 1997 ; Damodaran et Kinsella, 1982). À pH < pI, l'ajout de 50 mM de CaCl₂ a induit une augmentation de la température de dénaturation mais moins que dans les conditions à pH 7 et 9. Dans ce cas, les ions Ca²⁺ entreraient en concurrence avec les H⁺ pour les mêmes sites de liaisons (Kroll, 1984), de sorte que Ca²⁺ ne saurait établir des ponts avec la protéine. Les ions Ca²⁺ ont pu interagir avec de l'eau, modifiant ainsi le milieu aqueux de la protéine, ce qui justifie la valeur moins élevée de Td à pH 3 en présence de 50 mM de CaCl₂. Durant le chauffage, les ions affectent la conformation des protéines par des interactions électrostatiques avec les groupes chargés et les groupes de protéines polaires ou par des interactions hydrophobes entre les molécules de protéines (Damodaran et Kinsella, 1982), ce qui expliquerait l'augmentation des agrégats observée vers 95 °C.

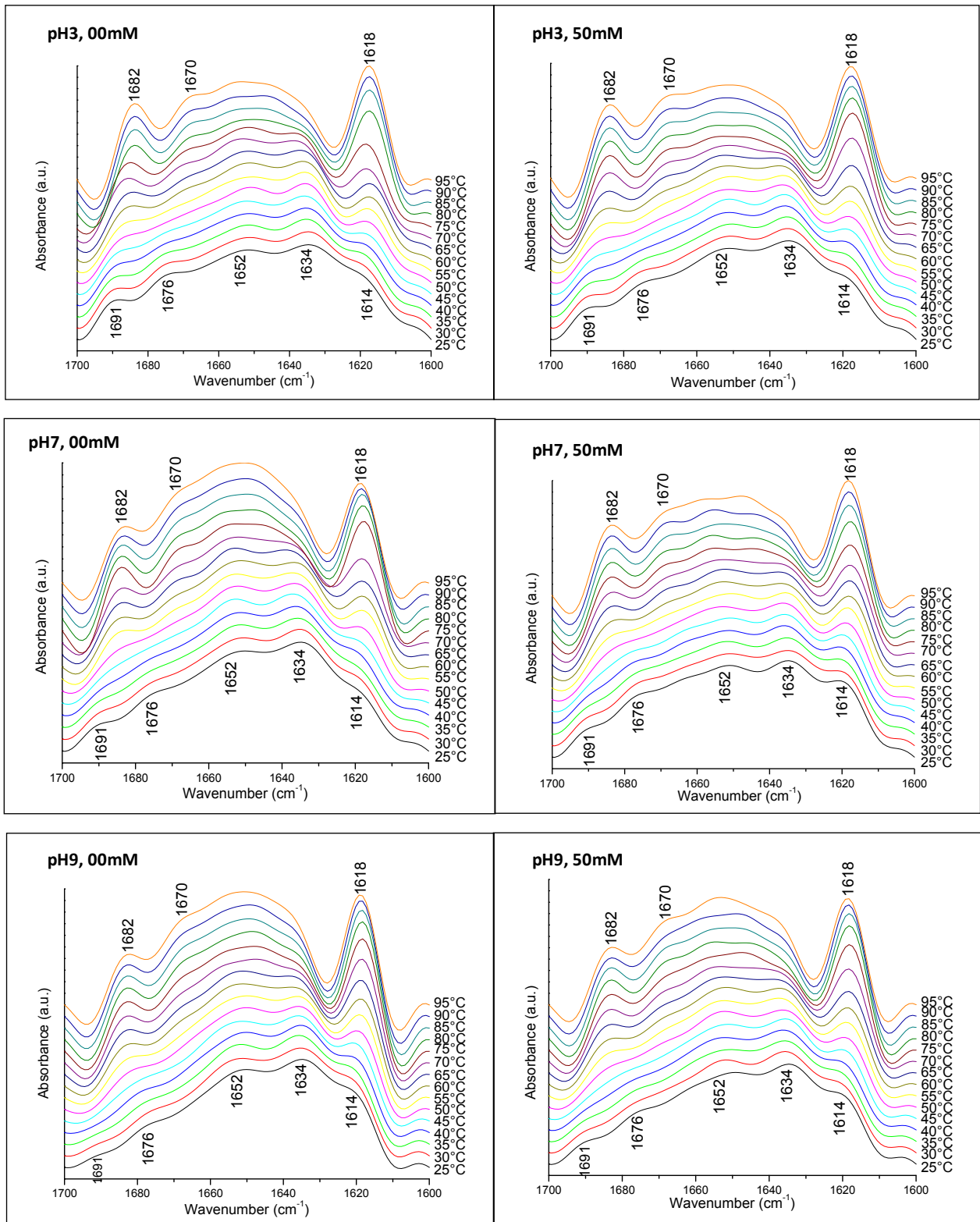


Figure 6: Spectres déconvolués des protéines de lentilles dans du D₂O (10% p/v) aux différents pH avec et sans CaCl₂ en fonction de la température pendant le chauffage de 25 à 95°C.

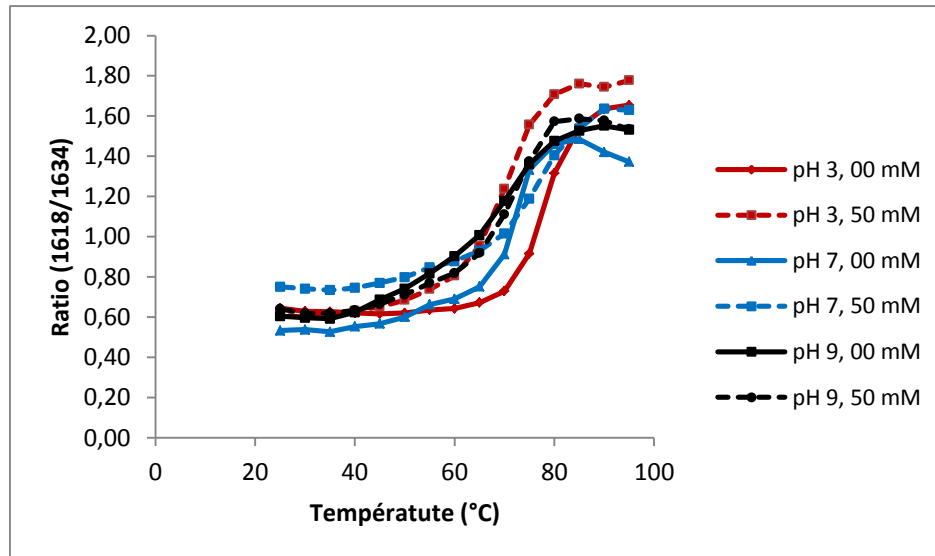


Figure 7: Effets du pH et du CaCl_2 sur l'intensité des agrégats des protéines de lentilles (Ratio entre feuillet β intermoléculaires et intramoléculaires durant le chauffage au FTIR).

4.3.5 Gélification thermique

L'impact des différents paramètres, pH, présence ou absence de CaCl_2 sur la formation des gels a été étudié et les résultats sont présentés dans le Tableau 4. Ce tableau montre deux sortes de gels en fonction du pH et du CaCl_2 . En effet, à pH 9 en présence et en absence de CaCl_2 , un gel thermique non fondant s'est formé. Aussi, la même observation a été faite à pH 7 en présence de CaCl_2 . Quant à pH 3 en présence et en absence de CaCl_2 et à pH 7 sans sel, on a observé un gel fondant. Le gel fondant obtenu à pH 3 en présence de 50 mM de CaCl_2 pourrait s'expliquer par le fait que le CaCl_2 diminuerait les liens protéines-eau au détriment de calcium-eau, modifiant ainsi le degré d'hydratation ainsi que l'orientation des molécules d'eau autour des résidus non polaires des chaînes polypeptidiques (Damodaran et Kinsella, 1982 ; Utsumi et Kinsella, 1985). À pH 3 sans CaCl_2 , les interactions électrostatiques entre les polypeptides acides augmentent les répulsions protéines-protéines. Les molécules d'eau se lieraient aux polypeptides acides des protéines, limitant ainsi le rapprochement entre les chaînes protéiques. À pH 7 en absence de sel, les travaux de Boye et al. (2010a) ont également souligné la formation d'un gel fondant avec une concentration protéique de 10%. Par contre, quand on

augmente la concentration protéique à 12 % dans les mêmes conditions, un gel ferme est formé (Boye et al., 2012a).

La formation de gel nécessite un équilibre entre les interactions protéines-protéines, protéines-eau, et des forces attractives et répulsives entre les chaînes polypeptidiques adjacentes (Totosaus et al., 2002). Pour mieux comprendre les effets du pH et du CaCl₂ dans la formation du réseau protéique, des essais dynamiques à oscillation contrôlée durant le processus de gélification ont été réalisés afin de déterminer les caractéristiques rhéologiques des gels formés.

Tableau 4: Effets du pH et du CaCl₂ sur la gélification thermique des protéines de lentilles.

Concentration (%)	Types de solutions		Gélification
	pH	CaCl ₂ (mM)	
10		00	GF
	3	50	GF
		00	GF
	7	50	G
		00	G
	9	50	G

G = Gel non fondant ; **GF** = Gel fondant

4.3.6 Mesures rhéologiques en petites déformations

La figure 8 montre l'évolution du module élastique G' en fonction de la température sur une rampe de 20 à 90 °C à 5 °C/minute de la solution de protéines de lentilles à 10% à pH 3, 7 et 9 en présence et en absence de 50 mM de CaCl₂. Les résultats de cette expérience ont permis de déterminer la température de transition (T_{trans}) au gel ou la température du début de gélification par les mesures de delta degré β (G''/G') et de G' sur cette rampe de température. T_{trans} a été définie de deux manières à savoir la

température à laquelle G' commence à augmenter brusquement (Renkema et al., 2000) ou la température à laquelle Δ degré diminue en bas de 45° (Taherian et al., 2008).

En absence de CaCl_2 (Figure 8 A) et à pH 3 et 7, il n'y a pas eu d'augmentation brusque de G' avant 90°C ; Δ degré était au-dessus 45° . Par contre dans les conditions sans CaCl_2 et à pH 9, T_{trans} a été observée à 81°C .

En présence de 50 mM de CaCl_2 (Figure 8 B) et à pH 3, T_{trans} pouvait être observée à une température supérieure à 90°C . En outre en présence de CaCl_2 à pH 7 et 9, le point d'augmentation de G' ou le point de diminution de Δ degré en bas de 45° a été observé respectivement à 82°C et 78°C , températures inférieures aux températures de dénaturation observées par DSC. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Renkema et al., (2001) et par Speroni et al. (2010) avec un isolat de protéines de soja. Ils conclurent que la gélification de l'isolat de protéines de soja, de la glycine et de la β -conglycinine peut commencer quelques degrés inférieurs à la température de dénaturation. Aussi, ce point indiquant le début de gélification des protéines peut dépendre de la définition qui lui est donnée. Cette diminution de la température de transition au gel en présence du CaCl_2 montre la participation du calcium et les résidus chargés négativement dans le pontage. Ces résultats suggèrent que le calcium modifie les phénomènes de dénaturation induits par la chaleur, générant diverses structures ayant des capacités différentes pour former un gel au cours du traitement thermique (Renkema et al., 2000) (Tableau 5).

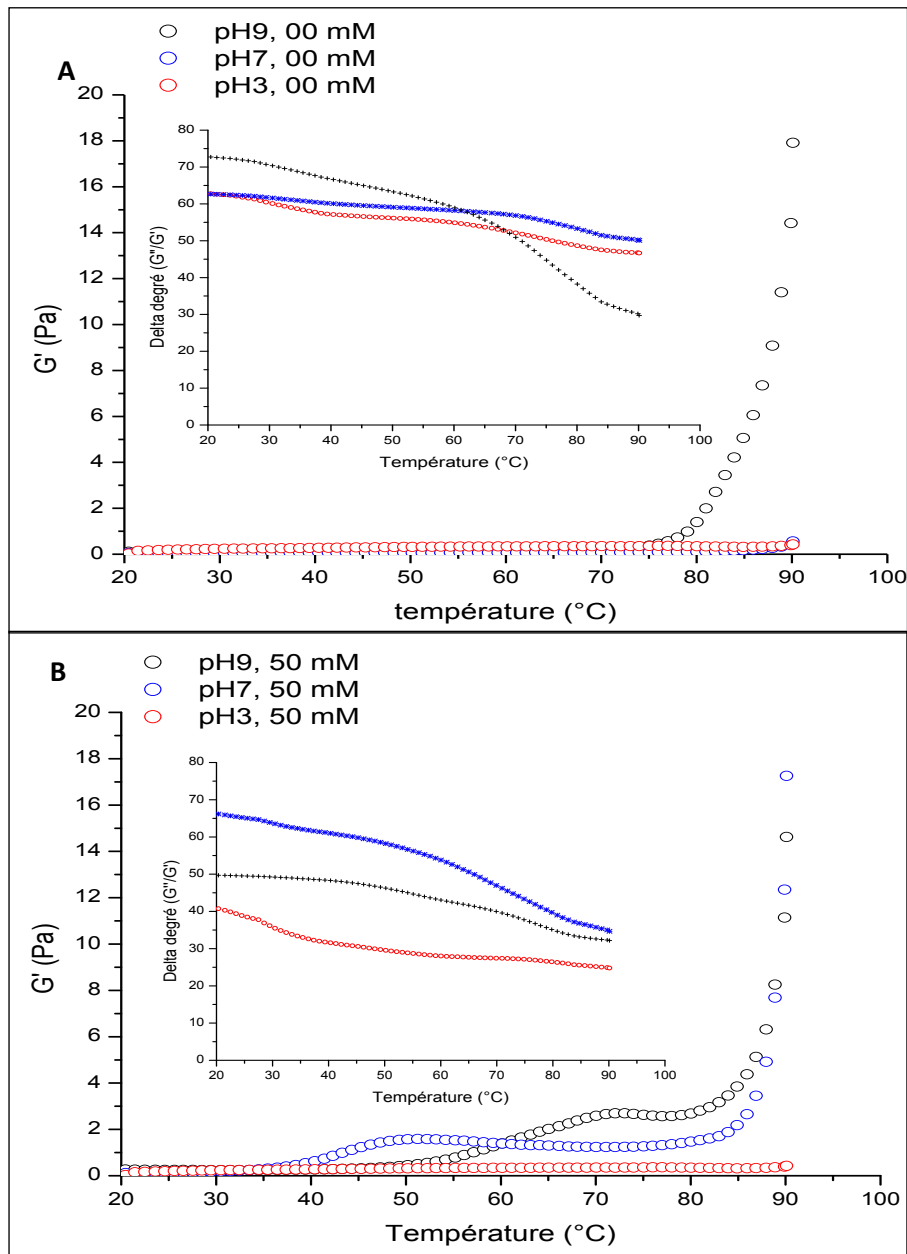


Figure 8: Évolution du module G' en fonction de la température de chauffage des solutions de protéines de lentilles à 10% (p/v) aux pH 3, 7 et 9 en absence (A) et en présence (B) de CaCl_2 .

Tableau 5: Effet du pH et du calcium sur la température de dénaturation (T_d) et la température de gélification (T_{trans}) de l'extrait de protéines de lentilles.

Concentration	Type de solutions		T_d (°C)	T_{trans} (°C)
	pH	CaCl ₂ (mM)		
10%	3	00	85,39 ± 0,04	> 90°C
		50	86,37 ± 0,04 (101,66 ± 0,27)	> 90°C
	7	00	85,28 ± 0,63	> 90°C
		50	89,03 ± 0,35	82°C
	9	00	85,30 ± 0,83	81°C
		50	87,36 ± 0,55	78°C

La mesure de la constante d'élasticité des gels protéiques G' en fonction des conditions est présentée à la figure 9. L'élasticité détermine la capacité des protéines à se dérouler de manière réversible pour adopter une conformation allongée et à reprendre spontanément leur forme enroulée dès que la tension est relâchée.

En absence de CaCl₂, le module élastique G' a augmenté avec le pH et était plus élevé à pH 9 qu'à pH 7 et à pH 3. En présence de CaCl₂, le comportement a été identique avec une augmentation des valeurs de G' avec le pH, cette augmentation étant plus marquée à pH 9. Ceci suggère que le CaCl₂ serait impliqué dans la formation du réseau de gel de protéines lentilles comme l'ont montré Scilingo et Anon (1996) ; Speroni et al. (2010) dans leurs études similaires. L'élasticité G' des gels serait le résultat des interactions impliquées durant le processus de chauffage et de refroidissement. En effet, durant la phase de refroidissement, les principales interactions impliquées dans le réseau de gel pourraient être des liaisons hydrogène comme l'a souligné Van Vliet (2002) mais le maintien des gels viendrait non seulement des liaisons hydrogène mais aussi des ponts disulfures comme rapporté par Utsumi et Kinsella (1985).

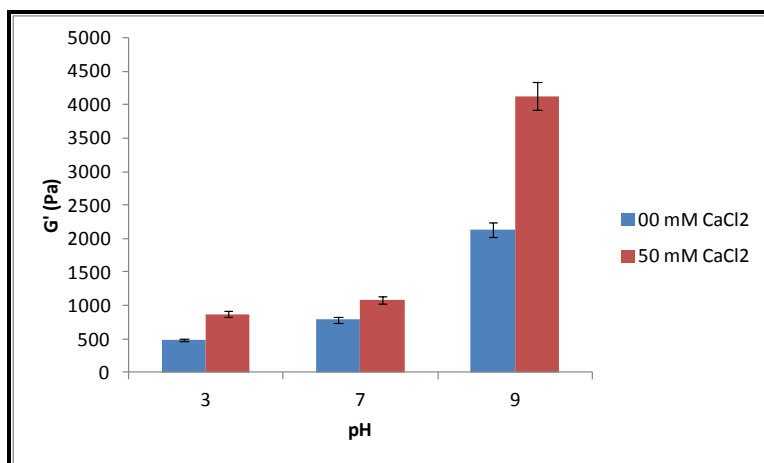


Figure 9: Modules G' des gels de protéines de lentilles obtenus à la fin du cycle de chauffage-refroidissement et ceux aux pH 3, 7 et 9 en présence et en absence de CaCl_2 .

Les résultats du FTIR nous montrent que le début de la dénaturation des protéines est un préalable nécessaire à un début de formation de gels dans toutes les conditions de pH et de force ionique étudiées. Les études similaires avec les protéines de soja l'ont également montré. Par contre les études réalisées par Renkema et al. (2001) et par Van Kleef (1986) ont montré une augmentation de G' quand le pH diminue à la même force ionique. En absence de sel (NaCl), G' était plus élevé à pH inférieur à 6. Ces résultats ne rejoignent pas ceux obtenus avec les protéines de lentilles. Cette différence pourrait être causée par des variations dans le comportement d'association/dissociation des protéines lors du chauffage en fonction du pH, de l'action différente des sels monovalents et divalents sur les protéines et de la teneur en acides aminés hydrophobes. Aussi, la concentration et la composition protéique différentes des protéines de soja et de lentilles pourraient également expliquer cette différence. Speroni et al. (2010) ont obtenu avec un isolat de protéines de soja, une augmentation de G' des gels en présence de 25 mM de CaCl_2 . Ce qui justifie l'effet du Calcium sur les propriétés élastiques des gels de protéines de lentilles.

4.4 Conclusion

La formation de gel par traitement thermique implique plusieurs processus tels que la dénaturation, l'agrégation, la formation de réseaux et le raffermissement du gel. La présence de calcium modifie les charges nettes des chaînes polypeptidiques et intervient sur les interactions qui sont produites lorsque les protéines ont été partiellement dénaturées. Le pH aurait un effet sur la structure des protéines et la quantité d'eau qui pourrait être liée à des protéines. Le pH aurait également affecté l'étendue de l'interaction protéine-protéine dans le processus de formation du réseau de gel.

Le gel formé à pH 9 en présence de CaCl_2 est plus élastique comparativement à celui obtenu à pH 3 en absence de CaCl_2 qui en est moins. Les prochains travaux permettront de comprendre l'impact de cette structure du réseau sur la digestibilité *in vitro* de l'extrait de protéines de lentilles.

Chapitre 5

Impact des traitements thermiques sur la digestibilité des protéines de lentilles

5 Impact des traitements thermiques sur la digestibilité des protéines de lentilles

Résumé

La sensibilité aux enzymes digestives des protéines natives et dénaturées thermiquement a été étudiée et comparée à celle de gels thermiques formés à la chaleur dans différentes conditions de pH et de CaCl₂. L'étude a été réalisée *in vitro* en simulant le système gastro-intestinal. Les profils de dégradation étudiés par SDS-PAGE ont montré que la sensibilité des enzymes protéolytiques est améliorée suite au traitement thermique à la chaleur. Dans cette étude, que ce soit en présence ou en absence de sel, le gel formé à pH 9 a généré après hydrolyse des peptides de faibles poids moléculaires de 2 kDa et moins comparé aux gels à pH 7 et 3. Ce qui signifie que l'ajout du sel n'a pas influencé l'action de la pepsine et de la pancréatine. Par rapport aux protéines natives, les protéines gélifiées et dénaturées sont plus susceptibles à la dégradation.

5.1 Introduction

La lentille, *Lens culinaris* est une légumineuse beaucoup consommée depuis les temps de la préhistoire dans le Moyen-Orient et les pays de la Méditerranée (Roy et al., 2010). Lorsqu'elles sont incluses dans le régime alimentaire, les lentilles assurent un apport en fibres, en amidon résistant, en oligosaccharides, en vitamines et minéraux, en certains acides aminés essentiels tels que la lysine, la leucine, l'isoleucine et la valine (Roy et al., 2010). En raison de leur importance comme source de protéines alimentaires et de leur utilisation potentielle comme ingrédients dans les denrées alimentaires, les protéines de lentilles suscite un intérêt.

Des études antérieures ont montré que la digestibilité des protéines végétales dans leur forme native est plus faible que celle des protéines animales (Mariotti et Tome, 1999). En effet, Gupta (1982) a montré que la digestion in vitro des protéines de lentilles et de pois était beaucoup plus faible que celles de la farine de viande et de la caséine. Les mêmes observations ont été faites sur les protéines de haricots (Gupta, 1981) et de soja (Chatterbuck et al., 1980). Cette réduction de biodisponibilité est essentiellement liée à la présence de certaines substances qui réduisent l'accessibilité des protéines à l'hydrolyse enzymatique (comme les tanins qui sont susceptibles de former des complexes avec les protéines) ou l'action enzymatique (par exemple les inhibiteurs de trypsine ou de chymotrypsine). Tous ces facteurs limitent la susceptibilité des protéines à l'hydrolyse et à terme leur biodisponibilité. Pour améliorer l'aptitude des protéines à répondre aux besoins de l'organisme, des études ont également prouvé que le traitement à la chaleur généralement utilisé dans les procédés technologiques pouvait réduire ou détruire la teneur en agents antinutritionnels et augmenter la sensibilité des protéines à l'hydrolyse enzymatique. Cette sensibilité est due à la dénaturation des protéines qui facilite ainsi l'accès des protéases aux sites d'action (Carbonaro et al., 2000).

Dans une étude précédente, nous avons démontré que la dénaturation est une étape préalable dans le processus de gélification thermique des protéines de lentilles et que l'ajout de 50 mM de CaCl_2 modifiait la température de dénaturation et avait un impact sur le processus de formation d'agrégats en fonction du milieu. Par contre, l'étude de l'hydrolyse des protéines de lentilles en fonction du pH et de la force ionique n'a pas

encore été explorée. Cette étude vise à étudier l'impact de la chaleur sur la dégradation enzymatique des protéines de lentilles en simulant le système gastro-intestinal. Dans un premier temps, la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique des protéines natives a été comparée à celle des protéines dénaturées par la chaleur. Dans un deuxième temps, la sensibilité à l'hydrolyse enzymatique de protéines gélifiées par traitement à la chaleur a été étudiée dans différentes conditions de pH et CaCl₂.

5.2 Matériels et Méthodes

5.2.1 Concentré de protéines de lentilles (CPL)

Le CPL a été obtenu par extraction alcaline à pH 9,0 suivie d'une précipitation isoélectrique à pH 4,5 selon la méthode décrite par Boye et al. (2010b). Le précipité isoélectrique a été centrifugé puis de l'eau déionisée a été ajoutée aux protéines pour éliminer les sels. Après une nouvelle centrifugation, les protéines ont été récupérées et solubilisées dans de l'eau distillée en ajustant le pH à 7,0 avec NaOH 5N. La dispersion a ensuite été lyophilisée et le concentré de protéines obtenu est conservé à la température pièce pour usage ultérieur. Les grains de lentilles vertes de la variété Laird utilisées dans cette étude proviennent de Saskatchewan et ont été fournis par Pulse Canada.

5.2.2 Préparation des échantillons pour hydrolyse enzymatique

5.2.2.1 Préparation de la solution protéique native

La solution protéique native a été obtenue en dispersant 10% (p/v) de protéines de lentilles dans une solution de 0,1M de tampon phosphate à pH 7. Les protéines ont été dispersées sous agitation pendant 10 heures à 4 ± 1 °C afin d'obtenir une meilleure dissolution. La solution a ensuite été ajustée à pH 7 avec le NaOH 1N ou le HCl 1N juste avant l'hydrolyse enzymatique.

5.2.2.2 Préparation de la solution protéique dénaturée

Afin d'éviter la gélification des protéines de lentilles, la solution protéique dénaturée a été obtenue en dispersant 5% (p/v) dans une solution de 0,1M de tampon phosphate à pH 7. Les protéines ont été dispersées sous agitation pendant 10 heures à 4 ± 1 °C afin d'obtenir une meilleure dissolution. La solution a ensuite été ajustée à pH 7 avec le NaOH 1N ou le HCl 1N juste avant le traitement thermique.

Le traitement à la chaleur a été réalisé selon la méthode de Boye et al. (2010a) en chauffant la solution préparée pendant 30 minutes dans un bain-marie maintenu à 100 °C. Afin d'éviter toute évaporation d'eau de l'échantillon, le contenant a été fermé hermétiquement. Après le traitement thermique, l'échantillon a été refroidi dans un bain-

marie à 25 °C puis laissé à la température pièce pour environ une heure avant l'hydrolyse enzymatique.

5.2.2.3 Préparation des gels protéiques

Les gels thermiques ont été réalisés en utilisant la méthode de Boye et al. (2010a). Après préparation des solutions protéiques à 10% (p/v) en absence et en présence de sel dans les différentes solutions tampon phosphate de 0,1M à pH 3, 7 et 9, les protéines ont été dispersées sous agitation pendant 10 heures à 4 ± 1 °C afin d'obtenir une meilleure dissolution.

Les solutions protéiques en présence de CaCl₂ ont été obtenues après ajout de 0,5 M de CaCl₂ concentré aux solutions protéines dissoutes de manière à obtenir une préparation de 50 mM de CaCl₂ en solution. Les solutions ont ensuite été ajustées aux différents pH d'étude avec le NaOH 1N ou le HCl 1N juste avant le traitement thermique. Les solutions protéiques ont été chauffées pendant 30 minutes dans un bain-marie maintenu à 100 °C, les contenants ont été fermés hermétiquement. Après le traitement thermique, les échantillons ont été refroidis dans un bain-marie à 25 °C puis laissés à la température pièce pour environ une heure avant l'hydrolyse enzymatique.

5.2.3 Hydrolyse enzymatique in vitro

Les échantillons ont été hydrolysés dans un appareil pH-stat (TIM 865, Radiometer Analytical, Canada) contrôlée, incluant la température, la concentration d'enzyme et la vitesse d'agitation. Les conditions d'hydrolyse enzymatique ont été définies selon le protocole de Vermeirssen et al. (2002) et de Barbana et Boye (2010) avec quelques modifications. Les enzymes ont été ajoutés à un rapport enzyme substrat de 1 :25 (p/p) (Gauthier et al., 1982).

5.2.3.1 Hydrolyse des protéines natives

10% de protéine correspondant à 400 mg d'azote ont été dispersés dans 20 ml d'HCl 0,1 N selon le protocole de Vermeirssen et al. (2002). Après amélioration de la dissolution pendant 10 heures à 4 ± 1 °C sous agitation, la solution protéique est amenée à pH 2 avec du HCl 1 N et maintenue à 37 °C avec le pH-stat (TIM 865, Radiometer Analytical,

Canada). La digestion est initiée en ajoutant 5 ml de solution de pepsine (pepsine gastrique du porc, P6887-10G, 20 mg de pepsine/ml dans HCl 0,1 N). La solution est incubée à 37 °C pendant 30 minutes puis, la réaction est arrêtée en ajustant le pH de l'hydrolysate peptique à 7,5 avec le NaOH 1 N. Une aliquote est alors été prélevée.

Dans une deuxième étape, la digestion pancréatique est amorcée en ajoutant 5 ml de solution pancréatique (pancréatine du pancréas du porc, Sigma P1750, 20 mg de pancréatine/ml dans 0,1 M de tampon phosphate, pH7, 5) à l'hydrolysate peptique. La solution est incubée à pH 7,5 à 37 °C puis, des prélèvements sont faits après 30, 60, 90, 120, 180, 240 minutes d'incubation pancréatique et mis dans les tubes d'ependorf. À chaque prélèvement, l'activité de la pancréatine est arrêtée en chauffant les tubes dans un bain à 90 °C pour 10 minutes. Ces tubes sont ensuite centrifugés à 3000 g pendant 5 minutes puis le surnageant séparé du culot. Le surnageant a alors été analysé par SDS-PAGE.

5.2.3.2 Hydrolyse des protéines dénaturées

5% de protéine équivalent à 200 mg d'azote ont été dispersés dans 20 ml d'HCl 0,1 N, selon la méthode modifiée de Vermeirssen et al. (2002). Après 10 heures à 4 ± 1 °C d'agitation pour amélioration de la solubilité, la solution protéique à 5% est traitée thermiquement pendant 30 minutes à 100 °C. Avec le pH-stat (TIM 865, Radiometer Analytical, Canada), la solution est maintenue à pH 2 avec le HCl 1 N. 5 ml de solution de pepsine (pepsine gastrique du porc, P6887-10G, 10 mg de pepsine/ml dans HCl 0,1 N, en tenant compte du ratio enzyme-substrat de 1:25 (p/p)) sont ajoutés. La température d'incubation est gardée à 37 °C. 5 ml de solution pancréatique (pancréatine du pancréas du porc, Sigma P1750, 10 mg de pancréatine/ml dans 0,1 M de tampon phosphate, pH7, 5) sont ajoutés à l'hydrolysate peptique pour débiter la digestion pancréatique. Les prélèvements d'échantillons, l'inactivation d'enzyme, la centrifugation et la récupération du surnageant ont été faits comme décrit précédemment.

5.2.3.3 Hydrolyse des protéines gélifiées

Après traitement thermique à 100 °C pendant 30 minutes, de 20 ml de solutions de protéines de lentilles (10% en protéines) aux différentes conditions de pH 3, 7 et 9, en

absence et en présence de 50 mM de CaCl₂ puis refroidissement à 25 °C, les gels sont laissés à la température pièce pour environ une heure et soigneusement démoulés et posés dans un panier afin d'éviter qu'ils ne se brisent sous l'effet de l'agitation. 25 ml de solution de pepsine (pepsine gastrique du porc, P6887-10G, 4 mg de pepsine/ml dans HCl 0,1N, avec un ratio enzyme-substrat de 1:25) sont ajoutés au milieu réactionnel qui est maintenu à pH 2 à 37 °C pendant 30 minutes avec le pH-stat (TIM 865, Radiometer Analytical, Canada). Après 30 minutes de digestion et l'inactivation de l'activité de la pepsine, la méthode pour l'hydrolyse de la phase intestinale reste la même tout en tenant compte du ratio enzyme-substrat de 1:25 (p/p).

5.2.4 SDS-PAGE Tris/Tricine

L'analyse SDS-PAGE des échantillons avant et après hydrolyse de même que le standard a été réalisée en utilisant des gels Tris/tricine de polyacrylamide de gradient 10 à 20% préfabriqués de Bio-Rad Criterion Cell (St. Louis, Mo, US). Les expériences ont été effectuées en conditions réductrices en ajoutant 10 µL de la solution d'échantillon à 20 µL de tampon de charge (dilution de l'échantillon au 1/3). Le tampon de charge était composé de 12 µl de β-mercaptoéthanol (2-ME) et de 288 µl de tampon Tricine de Bio-rad. La même procédure a été suivie pour le standard. Les échantillons ont été chauffés à 100 °C pendant 5 min avant de démarrer l'électrophorèse. Les gels ont été d'abord fixés, puis colorés avec du Bio-Rad bleu de Coomassie G-250. Après 60 minutes de coloration, les gels ont été décolorés par la solution de décoloration G-250. Le standard SDS-PAGE de poids moléculaire (MW de 2 à 250 kDa) de Bio-Rad « Precision Plus Protein Dual Xtra » a été utilisé comme contrôle moléculaire. Les traitements et les analyses ont été réalisés en triplicata.

5.3 Résultats et discussion

5.3.1 Étude de la digestibilité des protéines natives et dénaturées thermiquement

La figure 10 présente les électrophorégrammes obtenus par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des protéines natives (I) et des protéines dénaturées thermiquement (100 °C pendant 30 min) (II) avant et après hydrolyse par les enzymes digestives. Le standard (STD) présente 12 bandes dues à des poids moléculaires variant de 2 à 250 kDa.

L'électrophorégramme des protéines natives (Figure 10-I) présente au niveau du contrôle (protéine native non hydrolysée) environ 15 bandes, de poids moléculaires variant de 10 à 75 kDa. On observe que les largeurs des bandes et leur intensité varient selon les polypeptides. Les bandes les plus intenses sont à 45 kDa et à 20 kDa, correspondant aux sous unités acides (30-45 kDa) et aux sous unités basiques (20-25 kDa). Les bandes d'intensité faible, de poids moléculaires entre 50 et 98 kDa ainsi que les polypeptides de faible poids moléculaire (MW de moins de 20 kDa) sont très susceptibles d'être des fractions viciline et albumine (Shewry et al., 2004 ; Barbana et Boye, 2010). L'électrophorégramme des protéines dénaturées non digérées (témoin) (Figure 10-II) montre à peu près 12 bandes avec un poids moléculaire plus important que les protéines natives autour de 200 kDa, dont les plus intenses sont situées à peu près à 25 kDa et à 66 kDa. Cette augmentation du poids moléculaire observé vers 200 kDa pourrait être liée à l'association entre les chaînes polypeptides pendant le traitement à la chaleur (Carbonaro et al., 2004). Après 30 minutes d'hydrolyse pepsique, plusieurs bandes avec des poids moléculaires variables ont été observées avec les hydrolysats tant avec les protéines natives que dénaturées. Les sous unités acides et basiques des protéines natives n'ont pas été hydrolysées par la pepsine après 30 minutes d'incubation. Par contre, l'hydrolyse par la pepsine des protéines dénaturées a montré une baisse d'intensité des bandes (25 kDa et à 66 kD). Cette différence en intensité pourrait être liée à la libération des peptides de poids moléculaire plus courts ou à la concentration en protéines de moitié inférieure dans le cas des protéines dénaturées.

En présence de pancréatine les protéines natives non dégradées ont subi une hydrolyse et à 30 minutes d'incubation, certaines bandes de poids moléculaires d'environ 45 kDa, 30 kDa ont disparu et d'autres peptides de poids moléculaire à peu près à 5, 10 et 20 kDa ont apparus. Déjà après 60 minutes, de petits peptides de MW 4 et 5 kDa sont générés. Les mêmes poids moléculaires de 4 et 5 kDa sont également observés après 90, 120, 180 et 240 minutes respectivement. Par contre le peptide de poids moléculaire de 20 kDa semble résister à l'hydrolyse pancréatique.

Dans le cas des protéines dénaturées, les poids moléculaires des peptides à 30 minutes d'incubation par la pancréatine sont autour de 12 kDa et les plus petits à 5 kDa. De plus en plus de peptides générés ont des poids moléculaires plus petits lorsque le temps d'incubation augmente (de 60 à 240 minutes). À 240 minutes, on observe moins de 2 kDa, aussi l'intensité des bandes diminue fortement avec le temps.

La dénaturation des protéines à la chaleur (100 °C / 30 minutes) a nettement augmenté la sensibilité à l'hydrolyse par les enzymes protéolytiques. Cette sensibilité accrue pourrait être liée au déroulement des protéines induit par la chaleur et à l'inactivation des inhibiteurs de protéases.

Les résultats de la SDS-PAGE ont indiqué que les protéines natives non chauffées et hydrolysées par la pepsine puis par la pancréatine étaient moins sensibles à la protéolyse que dans les conditions ayant subi un traitement thermique à la chaleur. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus par Neves et Lourenço (1995) ; Neilsen et al. (1988) et Ahn et al. (1991).

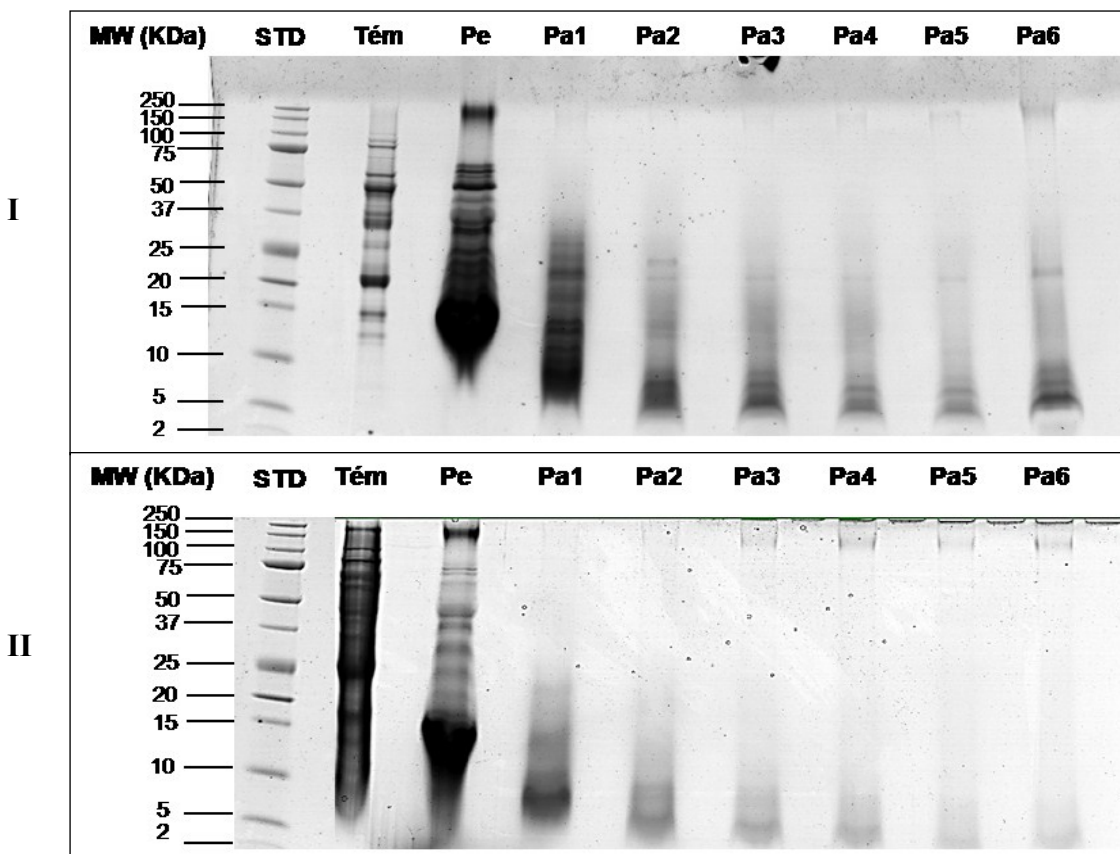


Figure 10 : SDS-PAGE des protéines de lentilles natives (I) et dénaturées (II) traitées thermiquement à 100°C pendant 30 min et hydrolysées. **Pe** (avec la pepsine pour 30 minutes), **Pa1**, **Pa2**, **Pa3**, **Pa4**, **Pa5**, **Pa6** (avec la pancréatine pour 30, 60, 90, 120, 180 et 240 minutes respectivement). **STD** étant le standard et **Tém** est le témoin ou le contrôle, échantillon avant hydrolyse.

5.3.2 Étude de la digestibilité des protéines gélifiées

La Figure 11 présente les profils électrophorétiques des protéines gélifiées thermiquement à 100 °C pendant 30 minutes sans CaCl₂ à pH 3 (Figure 11-A), à pH 7 (Figure 11-B) et à pH 9 (Figure 11-C) à 10% (p/v).

Le témoin (Tém) sur chaque profil est défini comme étant l'électrophorèse du gel sans hydrolyse enzymatique. Les témoins ou contrôles (Tém) présentés sur l'électrophorégramme à pH 3, 7 et 9 sans sel présentent un même nombre de bandes variant sensiblement de 10 à 75 kDa (Figures 11-A, 11-B et 11-C). Dans les conditions

gélifiées, les bandes sont plus intenses que celles obtenues pour les protéines natives. Dans les conditions gélifiées non hydrolysées (Témoins), les fractions caractéristiques des sous unités acides et basiques, de poids moléculaires respectifs d'environ 45 kDa et 20 kDa, (Shewry et al., 2004 ; Boye et al., 2010c) sont également observées à pH 3, 7 et 9 avec des différences au niveau de l'intensité des bandes. Les profils électrophorétiques des témoins des protéines gélifiées à pH 3, 7 et 9 sans CaCl₂ semblent présenter des différences au niveau des poids moléculaires des fractions de peptides engendrés.

En présence de pepsine et après 30 minutes d'incubation, plusieurs bandes sont générées et les poids moléculaires observés varient entre 50 kDa à 5 kDa. L'intensité et les bandes obtenues suggèrent une hydrolyse partielle des protéines par la pepsine. L'intensité est plus élevée à pH 3 et moins à pH 9. Après 30 minutes d'incubation avec la pepsine, le pH semble avoir un effet sur la dégradation des protéines gélifiées.

Par contre les gels protéiques sont très sensibles à la dégradation par la pancréatine et ce dès 30 minutes d'incubation. Cette dégradation est plus élevée à pH 9 générant des peptides de poids moléculaires de 2 kDa et moins. À pH 3 et 7, les fractions ou peptides générés ont un poids moléculaire de 5 kDa et moins et de 4 kDa et moins respectivement. Les bandes les plus intenses sont observées à pH 3, leur intensité diminue quand le pH augmente.

En présence de CaCl₂ à pH 3 (Figure 12-D), à pH 7 (Figure 12-E) et à pH 9 (Figure 12-F), les témoins (gels de protéines avec sel non hydrolysés) indiquent des profils similaires aux témoins observés dans les conditions sans sel surtout à pH 3 et à pH 9 avec le même nombre de bandes de poids moléculaires variant entre 10 kDa et 75 kDa. Par contre, la présence de bandes vers 250 kDa est également observée à pH 9, mais aucune donnée n'est disponible pour l'expliquer.

Après 30 minutes d'incubation à 37 °C des gels de protéines par la pepsine, les sous unités acides (45 kDa) et basiques (20 kDa) ont perdu leur intensité, montrant une production de peptides courts lors de la digestion. Dans les trois conditions de pH en présence de sel, les fractions polypeptidiques de poids moléculaires d'environ 28, 22, 18 et 12 kDa ont été observées sur l'électrophorégramme après l'hydrolyse par la pepsine. D'autres par contre ont été partiellement ou complètement dégradées en courts peptides

de poids moléculaires de 5 kDa et moins par la pepsine. L'action de la pepsine sur les gels protéiques en présence et en absence de sel semble similaire.

Les résultats de la phase intestinale (hydrolyse par la pancréatine) ont montré que dès 30 minutes d'incubation, les fractions protéiques non hydrolysées ou générées après la phase gastrique ont été presque complètement détruites par action de la pancréatine. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus en l'absence de CaCl_2 . À pH 3 les bandes obtenues ont un poids moléculaires de 2 à 5 kDa et sont plus intenses que celles obtenues à pH 7 et 9. À pH 7, le poids moléculaires des peptides générés varie entre 2 à 4 kDa. À pH 9, les peptides sont encore plus courts et leur poids moléculaires sont autour de 2 kDa et moins. L'hydrolyse par la pancréatine des gels protéiques élaborés en présence de sel à pH 3, 7 et 9 semble comparable. Dans les différents cas étudiés, la dégradation est optimale dans les 30 premières minutes d'incubation.

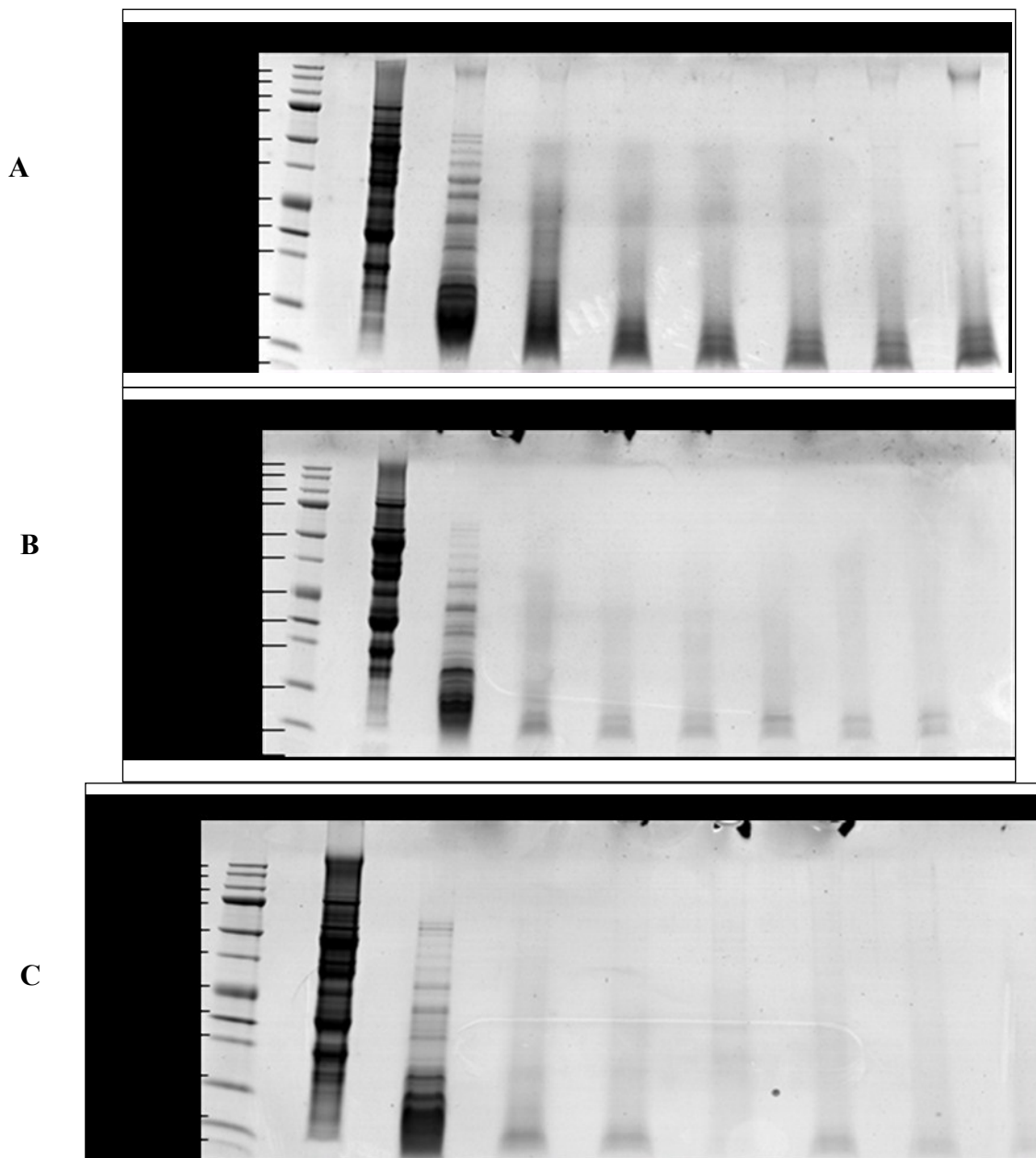


Figure 11 : SDS-PAGE des protéines de lentilles à 10% sans CaCl_2 à pH 3 (A), à pH 7 (B) et à pH 9 (C) traitées thermiquement à 100 °C pendant 30 min et hydrolysées. **Pe** (avec la pepsine pour 30 minutes), **Pa1**, **Pa2**, **Pa3**, **Pa4**, **Pa5**, **Pa6** (avec la pancréatine pour 30, 60, 90, 120, 180 et 240 minutes respectivement). **STD** étant le standard et **Tém**, le gel sans hydrolyse.

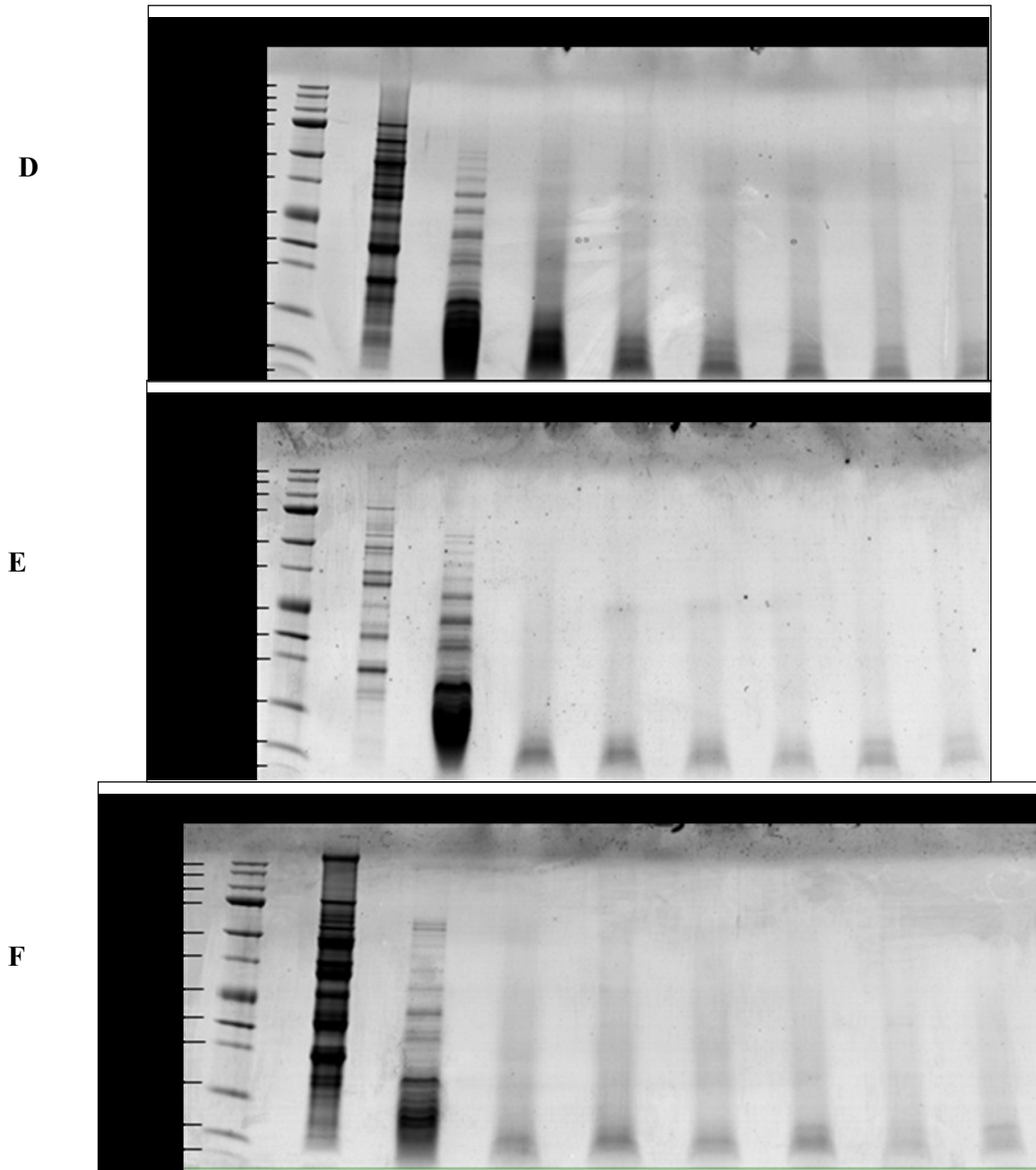


Figure 12 : SDS-PAGE des protéines de lentilles à 10% avec 50 mM de CaCl_2 à pH 3(D), à pH 7 (E) et à pH 9 (F) traitées thermiquement à 100 °C pendant 30 min et hydrolysées. **Pe** (avec la pepsine pour 30 minutes), **Pa1**, **Pa2**, **Pa3**, **Pa4**, **Pa5**, **Pa6** (avec la pancréatine pour 30, 60, 90, 120, 180 et 240 minutes respectivement). **STD** étant le standard et **Tém**, gel sans hydrolyse.

5.3.3 Impact de la structure sur la digestibilité des protéines de lentilles

Par rapport à la protéine native, les gels de protéines de lentilles obtenus à pH 3,7 et 9 en présence ou en absence de CaCl₂, présentent une meilleure sensibilité à l'hydrolyse dans la phase intestinale quelque soit le pH de formation. L'hydrolyse des gels protéiques par la pancréatine a généré des peptides de poids moléculaires plus petits que l'hydrolyse de la protéine native. Les résultats sont comparables en présence et en absence de sel.

La sensibilité à l'hydrolyse des protéines dénaturés et des gels protéiques en présence et en absence de sel en phase intestinale est améliorée comparée à la protéolyse de la protéine native. Entre les protéines dénaturées où les structures secondaires et tertiaires sont affaiblies et brisées par traitement à la chaleur et les protéines gélifiées où des réarrangements de la structure globale ont eu lieu, la sensibilité vis-à-vis des enzymes digestives semble ne pas présenter de différence même si la concentration des protéines dénaturées dispersée est seulement de 5%. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le traitement thermique à la chaleur ayant un effet sur le dépliement de la structure des protéines a exposé les sites d'attaques à l'action de la pepsine et de la pancréatine (Nielsen et al., 1988 ; Ahn et al., 1991). Bien que la phénylalanine, la tyrosine, la lysine ou l'arginine soient des cibles préférentielles d'attaques des enzymes pancréatiques (Savoie et al., 1989), la structure aussi influence la dégradation des protéines. De plus, certains travaux réalisés par Liener et Kakade (1980) ont montré que le traitement à la chaleur inactivait les inhibiteurs de protéases et améliorait la digestibilité. Ceci pourrait également justifier la sensibilité plus élevée des protéines dénaturées et des gels thermiques de protéines de lentilles à l'hydrolyse par la pancréatine.

La phénylalanine avec son caractère hydrophobe et localisée au cœur des protéines natives, pourrait différencier l'aptitude de la pancréatine à l'égard des protéines natives et chauffées. Les résultats observés montrent l'impact de la chaleur au-delà de 95 °C qui est une condition indispensable pour améliorer la dégradation des protéines de lentilles par les protéases digestives.

D'autres chercheurs par contre ont suggéré que la formation de protéines agrégées par traitement à la chaleur par l'oxydation de groupes sulfhydryl et par des interactions entre des résidus acides et de base, serait plus résistante aux protéases (Carbonaro et al., 1993 ; Darcy, 1984 ; Desrosiers et al., 1987). D'autres comme Otterburn et al. (1977) ont ajouté

dans le même sens que la formation d'un réseau tridimensionnel par chauffage impliquant des liaisons électrostatiques, des interactions hydrophobes et la participation des Ca^{+2} avait pour conséquence la diminution de la sensibilité aux protéases. Dans notre étude, comparé aux protéines dénaturées ou après formation du réseau de gel, la pancréatine a eu une action protéolytique plus améliorée que dans le cas des protéines natives, conduisant à des peptides de faible poids moléculaires (5 kDa et moins). Ces observations pourraient être le résultat de l'efficacité du traitement à la chaleur à inactiver les inhibiteurs de protéases et à modifier la structure des protéines.

5.4 Conclusion

Les protéines natives ont été moins sensibles à l'hydrolyse comparées aux protéines dénaturées, tant au niveau gastrique par la pepsine qu'au niveau intestinal par la pancréatine. Dans tous les cas, l'action de la pancréatine est optimale dès 30 minutes d'incubation et le profil électrophorétique après ce temps semble ne pas varier. Les protéines dénaturées et les protéines gélifiées aux différents pH ont été plus sensibles également à la dégradation que les protéines natives. Le traitement thermique à la chaleur aurait joué un rôle dans l'inactivation des inhibiteurs de protéases et dans le dépliement des chaînes protéiques, favorisant l'accessibilité des protéases digestives aux différents sites d'attaques. L'ajout de sel dans la formation de gels protéines n'a visiblement pas affecté la susceptibilité à l'hydrolyse par la pepsine et par la pancréatine.

Chapitre 6

Conclusion générale et perspectives

6 Conclusion générale et perspectives

Nos travaux de recherche ont permis d'étudier l'influence des conditions du milieu (pH, force ionique) sur la structure des protéines de lentilles natives, dénaturées thermiquement et gélifiées et sur leur sensibilité à la dégradation enzymatique.

Dans un premier temps, l'impact du traitement à la chaleur sur la dénaturation et la gélification des protéines de lentilles en fonction du milieu a été étudié. Les résultats ont indiqué que dépendamment du pH, la présence de calcium pourrait soit avoir une incidence sur la gélification en favorisant les forces attractives entre les chaînes protéiques et former des gels fermes, soit rentrer en compétition avec les molécules d'eau pour les sites de liaisons avec les protéines favorisant la formation de gels fondants. Dans les trois pH étudiés, les ions calcium ont affecté les températures de dénaturation des protéines de lentilles. Une fois les protéines dépliées, la capacité de la matrice à réorganiser le réseau et instaurer un équilibre entre les forces attractives et les forces de répulsion détermine le type de gels formés. De plus, plus le pH de la solution protéique est acide, moins le gel formé par traitement à la chaleur est élastique. La même observation est faite en présence de calcium.

Dans un deuxième temps, l'impact des enzymes digestives sur la dégradation des protéines natives, des protéines dénaturées et des protéines gélifiées a été étudié. L'étude a montré que les structures dénaturée et gélifiée des protéines de lentilles ont été plus sensibles aux enzymes digestives, comparées à la structure native. Ce qui suggère l'importance de la chaleur à exposer les sites d'attaques des protéines aux enzymes digestives. Le dépliement et la formation du réseau protéique a permis aux enzymes protéolytiques d'avoir accès à leurs sites d'attaques respectifs. Aussi, la chaleur aurait joué un rôle dans l'inactivation des inhibiteurs de protéases et favorisé l'accessibilité des protéases digestives à la dégradation

De plus, il ressort que la dégradation des gels protéiques ne dépend pas des conditions de pH ni de l'absence ou de la présence de calcium mais plutôt de la dénaturation, étape préalable dans le processus de formation de gels. Dans toutes les conditions de pH et de force ionique étudiées, l'hydrolyse des gels après l'action de la pancréatine a généré des

peptides courts de faibles poids moléculaires de 2 à 5 kDa à pH 3, de 2 à 4 kDa à pH 7 et de 2 kDa et moins à pH 9.

Ces travaux peuvent servir à l'élaboration et à la mise en place de nouvelles approches visant à optimiser les effets santé associés aux protéines de lentilles. Dans le futur, on suggérerait d'étudier la composition des acides aminés libérés après digestion et éventuellement leur implication dans la stimulation d'hormones qui induisent la satiété et l'insuline. Ceci aura pour conséquence la réduction de la prise alimentaire, l'apport énergétique et l'incidence du diabète du type 2.

Chapitre 7
Bibliographie

7 Références bibliographiques

AOAC, (1995). Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis, Method 992.15.*, Washington, DC.

Official Methods of Analysis of AOAC International (2000) 17th Ed., AOAC international, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 945.39

Official Methods of Analysis of AOAC International (2000) 17th Ed., AOAC international, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 925.10

Official Methods of Analysis of AOAC International (2000) 17th Ed., AOAC international, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 942.05

Abdel-Aal, E. S. M. (2008). Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two in vitro digestion methods. *LWT-Food Science and Technology*, 41, pp. 1282-1288.

Adsule, R.N.S., Kadam, S., Leung, H.K. (1989). Lentil in: CRC handbook of World Food Legumes (eds. D.K. Salunkehe and S.S. Kadam). Boca Raton, Florida, USA. C.R.C. Press.

Agriculture et Agroalimentaire Canada (2008). Aperçu statistique de l'industrie canadienne des légumineuses. <http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/>

Ahn, J.K., Sen, L.C., Whitaker, J.R. (1991). Stability of tertiary structure of phaseolin of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) as a limiting factor in proteolysis. *Journal of Food Biochemistry*, 15, pp. 263-278.

Akhavan, T., Luhovyy, B.L., Brown, P.H., Cho, C.E., Anderson, G.H. (2010). Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults *American Journal of Clinical Nutrition*, 91 pp. 966-975.

Barbana, C., Boye, J.I. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Research International*, 43(6), pp. 1642-1649.

Bandekar, J. (1992). Amide modes and protein conformation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120, pp. 123-143.

Bhatty, R.S., Christisin, G.I. (1984). Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L. spp. minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik) meals, protein concentrates and isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 34. 1, pp. 41-51.

Boisen, S., Eggum, B.O. (1991). Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, pp. 141-162.

Boye, J.I., Ma, C-Y., Ismail, A., Harwalkar, V.R., Kalab, M. (1997). Molecular and microstructural studies of thermal denaturation and gelation of β -lactoglobulins A and B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 1608-1618.

Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rajamohamed, S.H. (2010a). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, Vol 43 (2), pp. 537-546.

Boye, J.I., Roufik, S., Pesta, N., Barbana, C. (2010c). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties and SDS-PAGE of red lentil protein hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, Vol 43 (6), pp. 987-991.

Boye, J., Zare, F., Pletch, A. (2010b). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed *Food Research International* Vol 43 (2), pp. 414-431.

Bublin, M., Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O., Markie, A. R., Mills, E.N.C., Breiteneder, H. (2008). Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d2, a thaumatin-like protein. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, pp. 1130-1139.

Carbanaro, M., Cappelloni, M., Nicoli, S., Lucarini, M., Carnovale, E. (1997) Solubility–digestibility relationship of legume proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 pp. 3387-3394.

Carbonaro, M., Vecchini, P., Carnovale, E. (1993). Protein solubility of raw and cooked bean (*Phaseolus vulgaris*): role of the basic residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, pp. 1169-1175.

Carbonaro, M., Grant, G.M., Cappelloni Puszta, A. (2000). Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 742-749.

Clark, A.H., Saunderson, D.H.P., Suggett, A. (1981). Infrared and laser-raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels. *International Journal Peptide Protein Research*, 17, pp. 353-364.

Chatterbuck, K.L., Kehrberg, N.L., Marable, N.L. (1980) Solubility and in vitro digestibility of soy flours, concentrates and isolates. *Journal of Food Science*, 48, pp. 931-935.

Chronakis, I.S. (1996). Network formation and viscoelastic properties of commercial soy protein dispersions: effect of heat treatments, pH and calcium ions. In: *Food Research International*, 29, No. 2, pp. 123-134.

Costa, G.E., Queiroz-Monici, K., Reis, S., Oliveira, A.C. (2006). Chemical composition, dietary fiber and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes, *Food Chemistry*, 94, pp. 327-330.

Damodaran, S. (1988). Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: Effect on gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36, pp. 262-269.

Damodaran, S., Kinsella, J.E. (1982). Effect of conglycinin on the thermal aggregation of glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30, pp. 812-817.

Darcy, B., (1984). Availability of amino acids in monogastric animals. Variations of digestive origin. Cited by Desrosiers et al. *Journal of Food Science*, 1987, 52, pp 1525-1528.

Desrosiers, T., Bergeron, G., Savoie, L. (1987). Effect of heat treatment on in vitro digestibility of delactosed whey protein as determined by the digestion cell technique. *Journal of Food Science*, 52, pp. 1252-1528.

Evans, M., Boulter, D. (1974). Amino acid composition of seed meals of yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) and lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 5, pp. 919-922.

Gupta, Y.P. (1981) Flatulence and digestibility of pulses. *Pulse Crops Newsletter*, 1(3), pp. 63.

Gupta, Y.P (1982) Nutritive value of food legumes. In: Arora SK (ed.) *Chemistry and Biochemistry of Legumes*, pp 287-327 *New Delhi*: Oxford & IBH Publishing Co

Hahn, D.H., Rooney, L.W., Earp, C.F. (1984). Tannins and phenols of sorghum, *Cereal Foods World*, 29 (1984), pp. 776-779.

Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications *Current Opinion in Biotechnology* 18 (2), pp. 163-169.

Hermansson, A.M. (1986). Soy protein gelation. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 63, pp. 658-666.

Hermansson, A.M. (1978). Physico-chemical aspects of soy proteins structure formation. *Journal of Texture Studies*, 9, pp. 33-58.

Hermansson, A.M. (1979). Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59, pp. 272-279.

Hongsprabhas, P., Barbut, S. (1997). Protein and salt effects on Ca^{2+} -induced cold gelation of whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 62, pp. 382-385.

Hua, Y., Cui, S.W., Wang, Q., Mine, Y., Poysa, V. (2005). Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours. *Food Research International*, 38, pp. 377-38.

International IDF Standard 20A:1986: Milk. Determination of Nitrogen Content (Kjeldahl Method) and Calculation of Crude Protein Content *International Dairy Federation* IDF.

Ikeda, S., Nishinari, K. (2001). On solid-like rheological behaviors of globular protein solutions. *Food Hydrocolloids*, 15, pp. 401-406.

Jackson, M., Mantsch, H., (1995). The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(2), pp. 95-120.

Ju, Z.Y., Kilara, A. (1998). Gelation of pH-aggregated whey protein isolates solution induced by heat, protease, calcium salt, and acidulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp. 1830-1835.

Kavanagh, G.M., Clark, A.H., Ross-Murthy, S.B. (2000). Heat-induced gelation of globular proteins: part 3. Molecular studies on low pH β -lactoglobulin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, pp. 41-50.

Khantaphant, S., Benjakul S. (2010). Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*. 120(3), pp. 658-664.

Kroll, R.D. (1984). Effect of pH on the binding of calcium ions by soy proteins. *Cereal Chemistry*, 61, pp. 490-495.

Langton, M., Hermansson, A.L. (1992). Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH, *Food Hydrocolloids*, 5, pp. 523-529.

Lee, H.C., Htoon, A.K., Uthayakumaran, S., Paterson, J.L. (2007). Chemical and functional quality of protein isolated from alkaline extraction of Australian lentil cultivars: Matilda and Digger, *Food Chemistry*, 102, pp. 1199-1207.

Lefèvre, T., Subirade, M. (2000). Molecular differences in the formation and structure of fine-stranded and particulate β -lactoglobulin gels. *Biopolymers*, 54, pp. 578-586.

Liener, I.E., Kakade, M.L. (1980). Protease inhibitors. In Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, 2nd ed.; Liener, I. E., Ed.; Academic Press: New York, pp 7-71.

Leiner, I.E. (1976). Legume toxins in relation to protein digestibility-a review, *Journal of Food Science* 41, pp. 1076-1081.

Mackie, A., Macierzanka, A. (2010). Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Vol 15, (1-2), pp. 102-108.

Mariotti, F, Tome, D. (1999). The nutritional properties of plant proteins in the human diet. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 6, pp. 487-493.

Martín-Cabrejas, M.A., Aguilera, Y., Pedrosa, M.M., Cuadrado, C., Hernández, T., Díaz, S., Esteban, R.M. (2009). The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours. *Food Chemistry*, Vol 114, (3), pp. 1063-1068.

Matsumura, Y., Mori, T. (1996). Gelation. In: *Methods to Testing Protein Functionality*, G.M. Hall. pp. 76–109. Suffolk: Blackie Academic.

Meng, G.T., Ma, C.Y. (2000). Thermal properties of Phaseolus angularis (red bean) globulin. *Food Chemistry*, 73, pp. 453–460.

Mills, E.N., Jenkins, J.A., Alcocer, M.J., Shewry, P.R. (2004). Structural, biological, and revolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, pp. 379-407.

Moughan J.P., Rutherford M.S. (2008). Available lysine in foods: A brief historical overview. *Journal of AOAC international* 91 (4), 901-906.

Nakai, S. (1983). Structure-function relationship of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 31, pp. 676-683.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. (2010). Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (thunnus alalunga). *Food Chemistry*, 121(1), pp. 49-55. doi: 10.1016/Journal of food chemistry, 2009.11.089.

Neves, V.A., Lourenco, E.J. (1995). Isolation and in vitro hydrolysis of globulin G1 from lentils (Lens Culinaris, Medik). *Journal of Food Biochemistry*, 19, pp. 109-120.

Nielsen, S.S, Deshpande, S.S, Hermodson, M.A, Scott, M.P. (1988). Comparative digestibility of legume storage proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 36: pp. 896-902.

Nielsen, S.S. (1991). Digestibility of legume proteins, *Food Technology*, v. 45(9) pp. 112-114.

Nilsson, M., Stenberg, M., Frid, A.H., Holst, J.J., Bjorck, I.M. (2004). Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, pp. 1246-1253.

Oakenfull, D., Pearce, J., Burley, R.W. (1997). Protein gelation. In: *Food Proteins and Their Applications*, S. Damodaran & A. Paraf). pp. 111-142. New York: Marcel Dekker.

Oomah, B.D. (2001). Flaxseed as a functional food source, *Journal of Food Science*, 81, pp. 889-894.

Otterburn, M., Healy, M., Sinclair, W. (1977). The fermentation isolation and importance of isopeptides in heated proteins. In: M. Friedman (ed) Press, New York, p: 239.

Papalamprou, E.M., Doxastakis, G.I., Biliaderis, C.G., Kiosseoglou, V. (2009). Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates, *Food Hydrocolloids*, 23, pp. 337-343.

Paredes-Lopez, C., Ordorica-Falomir, Olivares-Vazquez, M.R. (1991). Chickpea protein isolates: Physicochemical, functional and nutritional characterization, *Journal of Food Science*, 56, pp. 726-729.

Phillips, L.G., Whitehead, D.M., Kinsella, J.E. (1994). Structure-function properties of food protein; *Academic Press*: San Diego. pp.271.

Privalov, P.L. (1979). Stability of proteins. Small globular proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 33, pp. 167-241.

Pusztai, A., Bardocz, S., Martin-Cabrejas, M.A. (2004). The mode of action of ANFs on the gastrointestinal tract and its microflora. In *Proceedings of the Fourth International Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds and Oilseeds*; EAAP: Wageningen, The Netherlands, pp. 87-100.

Pulse Canada, (2010). <http://www.pulsecanada.com/food-health/what-is-a-pulse/lentil>

Puppo, M.C., Anon, M.C. (1999). Soybean protein dispersions at acid pH. Thermal and rheological properties. *Journal of Food Science*, 64(1), pp. 50-56.

Puppo, M.C., Lupano, C.E., Anon, M.C. (1995). Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(9), pp. 2356-2361.

Remondetto, G.E., Beyssac, E., Subirade, M. (2004). Iron Availability from Whey Protein Hydrogels: An in Vitro Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26), pp. 8137-8143.

Renkema, J.M.S., Lakemond, C.M.M., De Jongh, H.H.J., Gruppen, H., Van Vliet, T. (2000). The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *Journal of Biotechnology*, 79(3), pp. 223-230.

Renkema, J.M.S., Knabben, J.H.M., Van Vliet, T. (2001). Gel formation by β -conglycinin and glycinin and their mixtures. *Food Hydrocolloids*, vol (15), Issue 4-6, pp.407-414.

Robin, O., Turgeon, S., Paquin, P. (1993). Functional properties of milk proteins. *In Dairy Science and Technology Handbook*; H. Hui, Ed.; VCH publishers: New York, pp 277-353.

Roufik, S., Gauthier, S.F., Turgeon, S.F. (2006). Physicochemical characterization and in vitro digestibility of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, Vol 17, Issue 5, pp 471-480.

Roy, F., Boye, J.I., Simpson, B.K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil *Food Research International*, 43(2), pp. 432-442.

Rozan, P., Yu-Haey, K., Lambein, F. (2001). Amino acids in seeds and seedlings of the genus *Lens*, *Phytochemistry*, 58, pp. 281-289.

Russin, T., Arcand, Y., Boye, J.I. (2007). Raw material particle size effect on yield and purity of soy protein isolates, *Journal of Food Processing and Preservation*, 31, pp. 308-319.

Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. (1989). Handbook of world food legumes, nutritional chemistry, processing technology and utilization, *CRC Press, Boca Raton, FL*, pp. 23-144.

Savoie, L., Charbonneau, R., Parent, G. (1989). In vitro amino acid digestibility of food proteins as measured by the digestion cell technique. *Plant Foods for Human Nutrition*, 39, pp. 93-107.

Scilingo, A.A, Anoon, M.C. (1996). Calorimetric study of soybean protein isolates: effect of calcium and thermal treatments. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, pp. 3751-3756.

Scilingo, A.A, Anon, M.C. (2004). Characterization of soybean protein isolates: the effect of calcium presence. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 81, pp. 63-69.

Shewry, P.R., Jenkins, J.A., Beaudoin, F., Clare Mills, E.N. (2004). The classification, functions and evolutionary relationships of plant proteins in relation to food allergies. *Plant food allergens*, pp. 24-41.

Singh, N., Kaur, M., Sandhu, K.S. (2005). Physicochemical and functional properties of freeze-dried and oven dried corn gluten meals. *Drying Technology*, 23, pp. 1-14.

Speroni, F., Jung, S., Lamballerie, M. (2010). Effects of Calcium and Pressure Treatment on Thermal Gelation of Soybean Protein. *Journal of food science*, Vol.75, Nr. 1, pp. 30-38.

Stading, M., Hermansson, A.M. (1990). Viscoelastic behaviour of β -lactoglobulin gel structures. *Food Hydrocolloids*, 4 (2), pp. 121-135.

Statistique Canada (2008). http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/display_afficher.do?id=1174596720488&lang=fra

Taherian, A.R., Fustier, P., Britten, M., Ramaswamy, H. (2008). Rheology and stability of beverage emulsions in the presence and absence of weighting agents: A review. *Food Biophysics*, 3, pp. 279-286.

Tanga, C.H., Chena, L., Mab C.Y. (2009). Thermal aggregation, amino acid composition and invitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *Food Chemistry*, 113 (4), pp. 957-963.

Totosaus, A., Montejano, J.G., Juan, A. Salazar, J.A., Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction *International Journal of Food Science & Technology*, Vol 37 (6), pp. 589-601.

Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Hernandez, J., Fernandez, M., Moreu, M.C., Frias, J., Diaz-Pollan, C., Prodanov, M., Vidal-Valverde, C. (1995). Nutritional assessment of raw, heated and germinated lentils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, pp. 1871-1877.

Utsumi, S., Kinsella, J.E. (1985). Forces involved in soy protein gelation: Effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S, and soy isolate. *Journal of Food Science*, 50, pp. 1278-1282.

Van Kleef, F.S.M. (1986). Thermally induced protein gelation: Gelation and rheological characterization of highly concentrated ovalbumin and soybean protein gels. *Biopolymers*, 25, pp. 31-59.

Van Vliet, T., Martina, A.H., Bosa, M.A. (2002). Gelation and interfacial behaviour of vegetable proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, Vol 7 (5-6), pp 462-468.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 4, 51(1), pp. 75-87.

Walker, A.F., Kochhar, N. (1982). Effect of processing including domestic cooking on nutritional quality of legumes. *Proceedings of the Nutrition Society*, Issue 1, 41, 41-51.

Wang, N., Daun, J.K., Malcolmson, L.J. (2003). Relationship between physicochemical and cooking properties, and effects of cooking on antinutrients, of yellow field peas (*Pisum sativum*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, pp. 1228-1237.

Wang, N., Lewis, M. Brennan, J.J.G., Tétard, A. (1997). Effect of processing methods on nutrients and anti-nutritional factors in cowpea, *Food Chemistry*, 58, pp. 59-68.

Wang, N., Daun, J.K. (2006). Effects of variety and crude protein content on nutrients and anti-nutrients in lentils (*Lens culinaris*), *Food Chemistry*, Vol 95, (3), pp. 493-502.

Yu, P. (2005). Protein secondary structures α -helix and β -sheet at a cellular level and protein fractions in relation to rumen degradation behaviours of protein: a novel approach. *British Journal of Nutrition*, 94, pp. 655-665.

Zayas, J.F. (1997). Functionality of Proteins in Foods. *Food / Nahrung*, Vol 41, Issue 5, pp. 310-365. Berlin: Springer-Verlag.