Réticulation enzymatique des protéines de pois pour la formation de microparticules : application à l'encapsulation de la riboflavine

Attaf Djoullah

▶ **To cite this version:**

Attaf Djoullah. Réticulation enzymatique des protéines de pois pour la formation de microparticules : application à l'encapsulation de la riboflavine. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS072 . tel-01375883

HAL Id: tel-01375883

https://theses.hal.science/tel-01375883

Submitted on 3 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
&
AgroSupDijon (UMR PAM)

THÈSE
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences des aliments

Réticulation enzymatique des protéines de pois pour la formation de microparticules. Application à l'encapsulation de la riboflavine

Par

Attaf DJOULLAH

03 juin 2015

Jury :

Pr. DHULSTER, Pascal	(Univ.Lille 1)	Rapporteur
Pr. MARCHESSEAU, Sylvie	(Univ. Montpellier 2)	Rapporteur
Pr. DEGRAEVE, Pascal	(Univ. Lyon 1)	Examinateur
Pr. SAUREL, Rémi	(AgroSup Dijon)	Directeur de thèse
Dr. HUSSON, Florence	(AgroSup Dijon)	Co-Directrice de thèse

Remerciements

Les travaux de recherche qui font l'objet de ce mémoire ont été réalisés au sein de l'équipe Procédés Alimentaires et Physico-Chimie (PAPC) de l'UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (PAM) d'AgroSup Dijon dans le cadre d'une bourse du gouvernement Algérien.

Tout d'abord je tiens à remercier ***DIEU*** *le tout puissant pour la chance qu'il m'a accordé et le courage qu'il m'a donné pour réaliser ce travail de thèse.*

Je souhaite à travers ces quelques lignes exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude aux différentes personnes qui, chacune à sa façon, a rendu possible cette grande aventure qu'aura été mon doctorat.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Hadji ZARHOUNI, Directeur Central de l'Intendance, de m'avoir accordé une bourse afin de réaliser cette thèse.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mes directeurs de thèse, Monsieur Rémi SAUREL et Madame florence HUSSON. La pleine confiance qu'ils m'ont accordée, m'a permis d'élaborer un plan de thèse personnel et propre à mes aspirations. Je voudrais spécifiquement les remercier pour le temps, la disponibilité, la qualité et la rigueur scientifiques, les qualités humaine dont ils ont fait preuve pendant, tout le long de la thèse ainsi que pour m'avoir donné une véritable liberté d'action et ce, dans d'excellentes conditions logistiques et financières. Je tiens par ailleurs à les remercier pour leur accord à suivre le parcours double compétences en réalisant deux masters (MAE et MIB) ainsi que pour leur délégation d'encadrement de trois stagiaires de master recherche qui m'ont permis d'évoluer sur le plan managériale au sens large.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Sylvie MARCHESSEAU, Monsieur Pascal DHULSTER et Monsieur Pascal DEGRAEVE qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Je remercie les membres de mon comite de thèse pour toutes ces discussions toujours très fructueuses : Madame Muriel SUBIRADE et Monsieur Pascal DEGRAEVE et bien sur mes directeurs de thèse, Rémi et Florence.

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec l'ensemble des membres de l'équipe PAPC. Je les remercie pour leur implication et leur participation active dans cette thèse et en particulier Alexandra pour sa bonne humeur au quotidien.

J'ai une pensée amicale pour l'ensemble des stagiaires, doctorants et post-doctorants passés ou présents. Merci en particulier à Koi, Mohamed, Yanis, Ghali, Soufyane et bien évidement Jean-Luc. On a fait un sacré bout de chemin ensemble et cette réussite n'aurais pas été possible sans votre contribution efficace.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à ma famille : Mes parents, mes frères, ma sœur, mes enfants, tous mes proches et amis, et plus particulièrement à ma femme, mon partenaire de choc, qui m'a accompagné, aidé, soutenu et encouragé, voir supporté tout au long de mes projets.

Résumé

Dans ce travail, le comportement des protéines de pois vis-à-vis de la gélification enzymatique par la transglutaminase microbienne (MTGase) a été évalué à l'état natif et après dénaturation (réduction chimique ou thermo-dénaturation). L'application finale concernait la formation de microparticules protéiques permettant d'encapsuler la riboflavine, choisie comme molécule active hydrophile modèle. Le procédé d'extraction des fractions protéiques de pois a été optimisé de manière à affecter le moins possible la structure des protéines et de récupérer des fractions natives riches en albumines (Alb) et en globulines (Glob), ou leur mélange. La mise en place des méthodes de suivi de la réaction enzymatique a permis de mettre en évidence leur complémentarité ainsi que leurs limites. Deux nouvelles méthodes de suivi de la réticulation enzymatique ont été développées. L'une basé sur la RMN permet la détermination simultanée de la quantité du fragment glutamine-lysine, produit de la réaction enzymatique, et le degré de réticulation ; l'autre méthode, basée sur les techniques de mesure de taille (SDS-PAGE et DLS), permet de visualiser les liaisons intramoléculaires. L'étude du traitement enzymatique appliqué aux fractions Alb et Glob de pois à l'état natif et dénaturé, ainsi qu'en mélange natif, a montré que la réaction enzymatique est fortement liée à la structure et à la conformation des protéines. Contrairement à la fraction Alb, la fraction Glob constitue un bon substrat pour la MTGase et la réticulation met en jeu des sous-unités constitutives des globulines différentes pour chaque condition de traitement. Néanmoins, la fraction Alb peut être utilisée en tant que booster de réaction enzymatique ce qui peut faire l'objet d'une voie innovante d'amélioration de la susceptibilité des protéines vis-à-vis de la MTGase. Le mécanisme semble basé sur un phénomène d'affinité sélective. Les bonnes propriétés mécaniques et de capacité de rétention d'eau du gel de la fraction protéique de pois totale ont été exploitées pour produire des microparticules à partir de la dispersion de la solution protéique sous forme d'émulsion suivie d'une gélification enzymatique par la MTGase. Les microparticules ont été pratiquement insolubles dans les milieux gastro-intestinaux en absence d'enzymes et lentement dégradable en présence d'enzymes. La libération de la riboflavine est gouvernée par un phénomène de diffusion en absence d'enzyme et de dégradation de support en présence d'enzymes selon des cinétiques compatibles avec des applications nutraceutiques.

Abstract

In this work, pea proteins behavior toward enzymatic gelation by microbial transglutaminase (MTGase) was studied at native state and after denaturation (chemical reduction or thermal denaturation). The final application was the formation of protein microparticules to encapsulate riboflavin, chosen as hydrophilic active molecule model. The extraction process of the pea protein fractions has been optimized in such a way to minimize as possible protein denaturation and recover native fractions rich in albumin (Alb) and globulin (Glob) or a mixture of both.The setting up of the enzymatic reaction monitoring methods has brought out their complementarity as well as their limits. Two new monitoring methods of enzymatic cross-linking reaction have been developed. The first one, based on the NMR, allows to the simultaneous determination of the glutamine-lysine isopeptide bond, product of the enzymatic reaction, and the degree of crosslinking; the second method, based on size measuring techniques (SDS-PAGE and DLS), permit to view the intramolecular links. The study of enzymatic treatment applied to pea Alb and Glob at the native and denatured states, as well as thier native mixture showed that the enzymatic reaction is strongly related to the structure and conformation of proteins. Unlike Alb, the Glob fraction is a good substrate to transglutaminase and crosslinking reaction involves different subunits constituting globulins for each treatment condition. However, the Alb can be used as a booster of enzyme reaction which can be an innovative way for improving the proteins susceptibility toward transglutaminase treatment. The mechanism seems to be based on a selective affinity phenomenon. The good mechanical properties and water holding capacity of total pea proteins gel have been exploited to produce microparticles from a water-in-oil emulsion followed by enzymatic gelation. The produced microparticles were practically insoluble in gastrointestinal media in the absence of enzymes and slowly degradable in the presence of enzymes. The release mechanisms of riboflavin in digestive environments are governed by a diffusion phenomenon in the absence of enzymes and by support degradation phenomenon in the presence of enzymes according to kinetics compatible with nutraceutical applications.

Valorisation scientifique

Publications

Djoullah, A., Sok, N., Djemaoune, Y., Husson, F. and Saurel, R. (2013). 1H NMR Spectroscopy As Tool To Study Transglutaminase Crosslinking Of Pea Globulin. In: FaBE 2013 International Conferences on Food and Biosystems Engineering, Vol. 2, pp. 351-355 (Petrotos, K. and Filintas, A., Eds.) Technological Educational Institute of Thessaly, Skiathos Island, GREECE.

Djoullah, A., Sok, N., Djemaoune, Y., Penouilh, M. J., Husson, F., Saurel, R. (2015). Monitoring of transglutaminase crosslinking reaction by ^{1}H NMR spectroscopy on model substrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 475, 69-74.

Djoullah, A. Djemaoune, Y. Husson, F. Saurel, R. (2015). Pea albumins and globulins behaviors at native state toward transglutaminase treatment. *Process biochemistry*. Sous presse.

Djoullah, A., Krechiche, G., Husson, F., Saurel, R. (2016). Size measuring techniques as tool to monitor proteins intramolecular crosslinking by MTG treatment. *Food Chemistry*. 190, 197-200.

Djoullah, A. Husson, F., Saurel, R. (2015) Pea albumins and globulins behaviors at denatured state toward transglutaminase treatment. Food Hydrocolloids. En préparation.

Djoullah, A. Husson, F., Saurel, R. (2015). Innovative tool to hence the susceptibility of proteins toward enzymatic crosslinking reaction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* En préparation.

Djoullah, A. Meraimi, S. Husson, F., Saurel, R. (2015). Encapsulation of riboflavin in pea proteins microparticles prepared by subsequent emulsion-enzymatic gelation process. *Journal of Food Engineering.* En préparation.

Communications orales

Djoullah, A., Sok, N., Djemaoune, Y., Husson, F. and Saurel, R. Suivi de la réticulation enzymatique de protéines de pois par spectrométrie RMN ^{1}H. ***18° Forum de jeunes chercheurs***. Septembre 6-7, 2012, Besançon, France.

Djoullah, A. Krechiche, G. Husson, F. and Saurel, R. Mise en place de méthodes de suivi des interactions intramoléculaires formées suite à la réticulation enzymatique. ***19° Forum de jeunes chercheurs***. Juin 13-14, 2013, Dijon, France.

Djoullah, A. Husson, F. and Saurel, R Effet de la dénaturation des protéines de pois sur la réticulation enzymatique (MTGase). Journée du Plateau « Rhéologie et structure des Matériaux Biologiques », Chaire Itinérante « Diffusion de Neutrons et Matière Molle ». AgroSupDijon 27-28 novembre 2013, Dijon, France.

Djoullah, A. Meraimi, S. Husson, F., Saurel, R. (2015). Encapsulation of riboflavin in pea proteins microparticles prepared by subsequent emulsion-enzymatic gelation process. ***21eme Forum des jeunes chercheurs***. Juin 18-19, 2015, Dijon, France.

Communications par affiche

Djoullah, A. Djemaoune, Y., Husson, F. and Saurel, R. Cross-linking of pea globulin by microbial transglutaminase. ***8th international congress Taste Nutrition Health***, Mars 19-20, 2013, Dijon, France.

Djoullah, A., Sok, N., Djemaoune, Y., Husson, F. and Saurel, R. ^{1}H NMR spectroscopy as tool to study transglutaminase crosslinking of pea globulin. ***International Conference on Food and Biosystems Engineering (FaBE)***. 30 May - 02 June 2013, Skiatos Island, Greece. **Prix 2eme meilleur poster.**

Djoullah, A. Djemaoune, Y., Husson, F. and Saurel, R. Réticulation des globulines de pois par la transglutaminase microbienne. ***19° Forum de jeunes chercheurs***. Juin 13-14, 2013, Dijon, France.

Djoullah, A. Krechiche, G. Husson, F. and Saurel, R. Size measuring techniques as tool to monitor proteins intramolecular crosslinking by MTG treatment. ***BIOPOLYMERS 2013: Biopolymer Assemblies for Material Design***. Décember 4-6 2013, Nantes, France.

Djoullah, A. Krechiche, G. Husson, F. and Saurel, R. Pea proteins behavior toward transglutaminase treatment at native and denatured state. ***15th Food Colloids Conference***. Avril 13-16, 2014, Karlsruhe, Germany.

Djoullah, A. Krechiche, G. Husson, F. and Saurel, R. Comportement de la protéine de pois native et dénaturée envers la réticulation enzymatique par la transglutaminase. ***20eme Forum des jeunes chercheurs***. Juin 23-24, 2014, Besançon, France.

Djoullah, A. Meraimi, S. Husson, F., Saurel, R. Encapsulation of riboflavin in pea proteins microparticles prepared by subsequent emulsion-enzymatic gelation process. ***12th International Congress on Engineering and Food. ICEF 2015***. June14-18, 2015, Quebec, Canada.

Vulgarisation

Participation au programme **les Entrepreneuriales** (Dijon 2013) par la création d'une start-up **« BioPréventiva »** qui développe des compléments alimentaire à libération contrôlée pour lutter contre les maladies neurodégénératives. « **Prix Entreprendre ».**

Liste des abréviations

Alb : fraction des albumines

Albp : fraction d'albumine pure

CBZ-Gln-Gly : N-carbobenzoxy-Lglutamyl-glycinine

CMG_{Enzy} : concentration minimale de gélification enzymatique

CMG_{ther} : concentration minimale de gélification thermique

DEEMM : diethylethoxymethylene-malonate

DEEMM : diethylethoxymethylene-malonate

DLS : diffusion dynamique de la lumière/ dynamic light scattering

DSC : Analyse enthalpique différentielle / dynamic scanning calorimetry

DTNB : réactif d'Ellmane (acide 5,5'-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic))

DTT : dithiothreitol

EP : éther de pétrole

Eth : éthanol

Gln-Lys: fragment ε-(γ-glutamine)-lysine

Glob : fraction des globulines

HPLC : chromatographie en phase liquide haute performance

MCBL : microscopie confocale à balayage laser

MTGase : transglutaminase microbienne

OPA : acide O-phtaldiadehyde

pI: pH isoélectrique

PPT : fraction de protéines de pois totale

RITC : rhodamine isothiocyanate

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis

SH_L : SH libre

SH_T : SH totaux

TCA : acide trichloroacétique

TFA : acide trifluoroacétique

TNBS : acide trinitrobenzène sulfonique

Liste des tableaux

Chapitre I : Introduction

Tableau.I.1. Caractéristiques de la MTGase de différentes origines.....5

Tableau.I.2. Comportement de quelques protéines vis-à-vis du traitement enzymatique en présence (+) et en absence (-) du dithiothreitol (DTT).....8

Tableau.I.3. Composition moyenne en acides aminés des fractions protéiques du pois et du soja. 19

Chapitre II : Préparation et caractérisation des matières premières

Tableau.II.1. Gradient d'élution pour la détermination des dérivés d'acides aminés par HPLC.....37

Tableau.II.2. Composition de la farine de pois en fractions azotées 44

Tableau.II.3. Rendement d'extraction des fractions d'albumines et de globulines. 44

Tableau.II.4. Composition physico-chimique de la farine et des fractions albumines et globulines....45

Tableau.II.5. Composition en acides aminés (%, g/100g protéines) des fractions albumines et globulines. 49

Tableau.II.6. Teneurs en ponts disulfures (SS) et en groupements (SH) dans les fractions purifiées d'albumines et de globulines. 50

Tableau.II.7 : Propriétés thermiques des fractions protéiques préparées. 50

Chapitre III : Mise en place des méthodes de suivi de la réticulation enzymatique

Tableau.III.1. Compositions des mélanges de substrats modèles analysés par RMN ^{1}H. 69

Chapitre V : Application à l'encapsulation de la riboflavine

Tableau.V.1. Taille, rendement d'encapsulation (RE) et capacité d'encapsulation (CE) des microparticules de PPT préparées sous différentes conditions. 172

Liste des figures

Chapitre I : Introduction

Figure.I.1. Mécanisme catalytique de la transglutaminase **(Djoullah et al., 2015)**.....4

Figure.I.2. Profils électrophorétiques des protéines de lactosérum traités avec 100 unités de MTGase / g de protéine à 50 °C pendant 5 h à différents pH. **(Eissa et al., 2004).**.....9

Figure.I.3. Profils électrophorétiques de la β-lactoglobuline (BLG, 1% m/m) traités avec 10 unités de MTGase / g de protéine à pH 6 et 40 °C dans différentes conditions. **(**D'après **De Jong et Koppelman, 2002).**.....10

Figure.I.4. Profils électrophorétiques de l'isolat protéique de soja (SPI, 5% m/m) traités avec 13 unités de MTGase / g de protéine à pH 7 et 40 °C pendant 2.5 h. **(**D'après **Walsh et al., 2003).**.....11

Figure.I.5. Possibilités d'exploitations potentielles de la TGase. D'après **(Gaspar et Goes-Favoni, 2015 ; Yokoyama et al., 2004).** 13

Figure.I.6. Modèle de structure quaternaire trigonale bipyramidale envisageable pour les globulines 11S de dicotylédones. Chaque sphère représente un polypeptide acide α ou basique β, constitutifs des sous-unités des légumines. (d'après **Marcone et al., 1998a**). 17

Figure.I.7. Composition et structure des principales fractions de protéines de pois. Le gel d'électrophorèse présente les sous unités constituant les fractions globulines (Glob) et albumines (Alb) en condition dénaturantes (SDS) et réductrice (DTT).....20

Figure.I.8. Principaux types de particules obtenues par microencapsulation.....21

Figure.I.9. Les principaux types d'émulsions : (a) : simple ; (b) : multiple.....23

Figure.I.10. Emulsion multicouches. Adapté de (**McClements et Li. 2010)** 25

Figure.I.11. Système d'encapsulation à base d'émulsions 26

Figure.I.12. Représentation schématique de la démarche scientifique adoptée. 30

Chapitre II : Préparation et caractérisation des matières premières

Figure.II.1. Schéma d'extraction des fractions albumines et globulines.....**43**

Figure.II.2. Effet de la délipidation sur la turbidité d'une solution de globulines à différentes.....46

Figure.II.3. Effet de la délipidation sur la turbidité d'une solution d'albumines à différentes concentrations.....46

Figure.II.4. Profil SDS-PAGE des fractions protéiques Alb et Glob délipidées et non délipidées en conditions dénaturantes (SDS+DTT). 47

Figure.II.5. Thermogramme de la fraction Albumine 5% (m/m) chauffée à 1 °C/min.....51

Figure.II.6. Thermogramme de la fraction Globuline 5% (m/m) chauffée à 1 °C/min.....51

Figure.II.7. Solubilité des fractions albumines et globulines en fonction du pH dans l'eau distillée. .54

Figure.II.8. Solubilité de la fraction Alb en fonction de la force ionique à différents pH. 55

Figure.II.9. Solubilité de la fraction Glob en fonction de la force ionique à différents pH. 56

Figure.II.10. Influence du milieu sur l'activité enzymatique. (a) : la température à pH 6 dans l'eau distillée ; (b) : le pH à 37 °C dans l'eau distillée ; (c) : la force ionique à pH 6 et 37 °C. 57

Figure.II.11. Stabilité de la MTGase en fonction de la température à pH 6. 58

Figure.II.12. Stabilité de la MTGase en fonction du pH à 37°C.....59

Chapitre III : Mise en place des méthodes de suivi de la réticulation enzymatique

Figure.III.1. Profil SDS-PAGE de la globuline (1% m/m) incubée avec 10 unités MTGase/g de protéines à 40 °C et pH 7.....73

Figure.III.2. Evolution de l'absorbance des groupements amines libres analysés par la méthode OPA de la fraction Glob (1% m/m) en cours de traitement enzymatique (10 unités MTGase/g de protéine à 40 °C et pH 7).....74

Figure.III.3. Evolution de l'absorbance des groupements amines libres analysés par la méthode TNBS de la fraction Glob (1% m/m) en cours de traitement enzymatique (10 unités MTGase/g de protéine à 40 °C et pH 7).....75

Figure.III.4. Rendement de réticulation de la fraction Glob (1% m/m) déterminés par les méthodes OPA et TNBS en fonction de la durée d'incubation. 76

Figure.III.5. Corrélation entre les rendements de réticulation déterminés par les méthodes OPA et TNBS.....77

Figure.III.6. Dosage du fragment Gln-lys par HPLC-MS de la fraction Glob (1% m/m) traitée avec 10 unités de MTGase/g de protéine à pH 7 et 40 °C.....78

Figure.III.7. Corrélation entre la quantité du fragment Gln-Lys formé et le degré de réticulation de la Glob (1%),.....79

Figure.III.8. The two steps acyl transfer reaction catalyzed by transglutaminase (TGase). 82

Figure.III.9. 1H NMR spectra of single model substrate with and without MTGase.....84

Figure.III.10. 1H NMR spectra of the model substrate mixture solutions with and without MTGase.86

Figure.III.11. ε-(γ-glutamyl) lysine standard curves drawn from the pic areas of 1.50 and 3.15 ppm 1H NMR resonances as a function of standard concentration. 88

Figure.III.12. (a) Encapsulation of bioactive molecules in microparticles prepared by transglutaminase crosslinking reaction.....94

Figure.III.13. (a) SDS-PAGE (10%) analysis of 0,1% left and 0,01% (w/w) right.....97

Chapitre IV : Comportement des protéines de pois vis-à-vis de la réticulation enzymatique

Figure.IV.1. Least gelling concentration of pea proteins fractions treated with MTGase. 109

Figure.IV.2. Resulting glutamyl-lysine (Gln-Lys) bond contents in pea proteins fractions treated with 10 units MTGase/g protein at 40°C and pH 7 and 20 mM NaCl. 110

Figure.IV.3. Crosslinking degree of pea proteins fractions treated with 10 units of MTGase /g of protein at 40°C, pH7 and 20 mM NaCl as a function of incubation time. 111

Figure.IV.4. SDS-PAGE profiles of pea proteins fractions (1% w/w) treated by 10 units of MTGase/ g of protein at 40 °C, pH 7 for different incubation times.....113

Figure.IV.5. SDS-PAGE profiles of MTGase-treated pea proteins fractions (1% w/w) at different enzyme concentrations. 114

Figure.IV.6. SDS-PAGE profiles of MTGase-treated pea proteins fractions (1% w/w) at different pH. 115

Figure.IV.7. Profils SDS-PAGE de la fraction Glob à 1% (m/m) incubées avec 20 unités MTGase/g de protéines à 40 °C et pH 7 (tampon) à différentes durées d'incubation.....126

Figure.IV.8. Rendement de réticulation des fractions Glob nat, Glob dtt et Glob ther incubées à 40 °C avec 20 unités MTGase/ g de protéine à pH 7 à différentes durées d'incubation. La concentration protéique est de 1% (m/m) dans tous les échantillons.....127

Figure.IV.9. Profils SDS-PAGE de la fraction Alb à 1% (m/m) incubée avec 20 unités MTGase/g de protéine à 40 °C et pH 7 à différents durées d'incubation 128

Figure.IV.10. Rendement de réticulation des fractions Alb nat, Alb dtt et Alb ther incubées avec 20 unités MTGase/g de protéine à pH 7 à différentes durées d'incubation. La concentration protéique est de 1% (m/m) dans tous les échantillons. 129

Figure.IV.11. Concentration minimale de gélification enzymatique de la Glob nat (a), Glob dtt (b) et Glob ther (c) traitées avec 20 unités MTGase/g protéine à 40 °C et pH 7. 130

Figure.IV.12. Concentration minimale de gélification enzymatique de l'Alb nat (a), Alb dtt (b) et Alb ther (c) traitées avec 20 unités MTGase/g protéine à 40 °C et pH 7. 131

Figure.IV.13. Evolution des modules élastique G' et de perte G'' en fonction du temps de la Glob nat, Glob dtt et Glob ther incubées en présence de 20 unités MTGase/g protéine, à pH7 et à 40 °C. 133

Figure.IV.14. Observation des points de gel des fractions Glob nat, Glob dtt et Glob ther dénaturée thermiquement traitées avec avec 20 unités MTGase/g protéine, pH7 à 40 °C. 134

Figure.IV.15. Spectre mécanique (G', G'' en fonction de la fréquence) des gels Glob nat, Glob dtt et Glob ther en fin de cinétique de gélification (à 20 °C).....135

Figure.IV.16. Spectre mécanique (tan δ en fonction de la fréquence) des gels de Glob nat, Glob dtt et Glob ther en fin de cinétique de gélification (à 20 °C).....136

Figure.IV.17. Observations microscopiques par MCBL des fractions Alb nat, Alb dtt et Alb ther traitées et non traitées avec 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à 40 °C 137

Figure.IV.18. Observations microscopiques par MCBL des fractions Glob nat, Glob dtt et Glob ther traitées et non traitées avec 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à 40 °C. 138

Figure.IV.19. Schéma simplifié des mécanismes de réaction enzymatique des fractions Alb native et dénaturées.....144

Figure.IV.20. Schéma simplifié des mécanismes de réaction enzymatique des fractions Glob native et dénaturées.....145

Figure.IV.21. Profils SDS-PAGE des fractions PPM (1% m/m) et Glob nat (1% m/m) incubées avec 20 unités MTGase/g de protéines à 40 °C et pH 7. 148

Figure.IV.22. Profils SDS-PAGE des fractions PPM (1% m/m) et PPT (1% m/m) incubées avec 20 unités MTGase/g de protéines à 40 °C et pH 7. 151

Figure.IV.23. Concentration minimale de gélification enzymatique de (a) : globuline native (Glon nat), (b) : fraction protéique totale native (PPT nat) traitées avec 20 unités MTGase/g protéine à 40°C et pH 7. 152

Figure.IV.24. Evolution du module élastique G' et de tang δ en fonction du temps des fractions Glob nat et PPT nat incubées en présence de 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à 40 °C.....153

Figure.IV.25. Spectre mécanique (G' et G'' en fonction de la fréquence) des gels (10% m/m) des fractions Glob nat et PPT nat en fin de cinétique de gélification (10 h) à 20 °C. 154

Figure.IV.26. Observations microscopiques par MCBL des fractions Golb nat et PPT nat à 10% (m/m) traitées et non traitées avec 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à 40 °C 155

Chapitre V : Application à l'encapsulation de la riboflavine

Figure.V.1. La capacité de rétention d'eau des gels protéiques des fractions Glob et PPT obtenus par voix enzymatique (20 unités MTGase/g protéine, pH 7, 40 °C, incubation 10 h) à différentes concentrations. 166

Figure.V.2. Evolution du module de conservation G' en fonction du temps d'une solution de protéines de pois totales (PPT, 15% m/m) incubée en présence de 20 unités MTGase/g protéine, pH7 à différentes températures 168

Figure.V.3. Images par microscopie optique de PPT gélifiée en présence et en absence d'émulsifiant : (a) PPT sans PGPR; (b) PPT avec 1% PGPR; (c) PPT avec 2% PGPR.....169

Figure.V.4. Distribution de taille des microparticules de PPT préparées avec différentes concentrations d'émulsifiant (PGPR) et d'agitation.....170

Figure.V.5. Dégradation des microparticules de PPT dans les milieux gastrique pH 1.2 ; pH 1.2 + pepsine ; milieux intestinaux pH 7.4 et pH 7.4 + pancréatine à 37 °C.....171

Figure.V.6. Images par microscopie optique de microparticules chargées en riboflavine 173

Figure.V.7. Libération de la riboflavine des microparticules de PPT dans différents milieux digestifs à 37 °C. 174

Table des matières

Chapitre I : Introduction 2
I. Contexte 2
II. Etat de l'art 3
II.1. Transglutaminase : origine, propriétés et mécanisme catalytique 3
II.1.1. Mécanisme catalytique de la transglutaminase 4
II.1.2. Caractéristiques et propriétés enzymatiques de la MTGase 5
II.1.3. Outils et méthodes analytiques permettant le suivi de la réaction enzymatique 6
II.1.4. Susceptibilité des protéines vis-à-vis du traitement enzymatique par la TGase 7
II.1.5. Stratégies d'amélioration de la susceptibilité des protéines vis-à-vis de la TGase 9
II.1.6. Utilisations potentielles de la TGase 12
II.2. Les protéines de pois 16
II.2.1. Les globulines 16
II.2.2. Les albumines 2S 18
II.2.3. Les acides aminés des protéines de pois 19
II.3. Généralités sur l'encapsulation 21
II.3.1. Définition 21
II.3.2. Les systèmes d'encapsulation à partir d'émulsion 22
III. Objectifs et démarche scientifique 28
Chapitre II : Préparation et caractérisation des matières premières 32
I. Introduction 32
II. Matériel et méthodes 33
II.1. Matériel 33
II.1.1. La farine de pois 33
II.1.2. La transglutaminase (MTGase) 33
II.1.3. Les réactifs chimiques 33
II.2. Méthodes 33
II.2.1. Préparation et caractérisation des fractions protéiques 33
II.2.2. Caractérisation de l'enzyme 40
II.2.3. Analyse statistique 41
III. Résultats et discussion 42
III.1. Préparation et caractérisation des fractions protéiques 42
III.1.1. Méthode d'extraction 42
III.1.2. Composition et rendement d'extraction des protéines 44
III.1.3. Effet de la délipidation sur la turbidité 45

III.1.4. Profils SDS-PAGE 46
III.1.5. Composition en acides aminés 48
III.1.6. Composition en S-S et S-H.....49
III.1.7. Propriétés thermiques des fractions Alb et Golb 50
III.1.8. Concentration minimale de gélification thermique 52
III.1.9. Solubilité des fractions Alb et Glob en fonction du pH et de la force ionique 53
III.2. Caractérisation de la MTGase 56
III.2.1. Activité enzymatique.....56
III.2.2. Conditions optimales de l'activité enzymatique.....56
IV. Conclusion du chapitre..... 60
Chapitre III : Mise en place des méthodes de suivi de la réticulation enzymatique 62
I. Introduction..... 62
II. Matériel et méthodes 65
II.1. Matériel.....65
II.1.1. La farine de pois.....65
II.1.2. MTGase 65
II.1.3. Les réactifs chimiques.....65
II.2. Méthodes.....65
II.2.1. Extraction et purification des protéines 65
II.2.2. Mise en place des méthodes de suivi de la réaction enzymatique 66
II.2.3. Suivie de la réticulation enzymatique par la RMN 1H 68
II.2.4. Suivie des liaisons intramoléculaires 70
II.2.5. Analyse statistique 71
III. Résultats et discussion..... 72
III.1. Mise en place des méthodes de suivi de la réaction enzymatique.....72
III.1.1. SDS-PAGE 72
III.1.2. Méthodes spectrophotométriques: OPA et TNBS 73
III.1.3. Dosage du fragment Gln-lys par HPLC-MS 77
III.2. Article 1 : Suivie de la réticulation enzymatique par la RMN 1H 80
III.2.1. Introduction 81
III.2.2. Results and discussion.....82
III.2.3. Conclusion.....89
III.2.4. References 89
III.3. Article 2: Suivi des liaisons intramoléculaires 92
III.3.1. Introduction 93
III.3.2. Results and discussion.....94
III.3.3. Conclusion.....96
III.3.4. References 98
IV. Conclusion du chapitre..... 100

Chapitre IV : Comportement des protéines de pois vis-à-vis de la réticulation enzymatique 102
I. Introduction 102
II. Matériel et méthodes 103
II.1. Matériel 103
II.2. Méthodes 103
II.2.1. Extraction et purification des protéines 103
II.2.2. Pré-dénaturations thermique et chimique des fractions Alb et Glob 103
II.2.3. Incubation et suivi de la réaction enzymatique 104
II.2.4. Concentration minimale de gélification enzymatique 104
II.2.5. Rhéologie des gels 104
II.2.6. Etudes de la microstructure des gels par microscopie confocal à balayage laser (MCBL) 105
II.2.7. Analyse statistique 105
III. Résultats et discussion 106
III.1. Article 3: Comportement des fractions Alb et Glob à l'état natif vis-à-vis la réticulation enzymatique par la MTGase 106
III.1.1. Introduction 107
III.1.2. Results and discussion 107
III.1.3. Conclusion 116
III.1.4. Références 116
III.2. Article 4: Comportement des fractions Alb et Glob à l'état dénaturé vis-à-vis la réticulation enzymatique par la MTGase 124
III.2.1. Introduction 125
III.2.2. Résultats 125
III.2.3. Discussion 139
III.2.4. Conclusion 146
III.3. Comportement des albumines et des globulines en mélange vis-à-vis de la réticulation enzymatique 147
III.3.1. Introduction 147
III.3.2. Résultats et discussion 147
III.3.3. Conclusion 156
IV. Conclusion du chapitre 157
Chapitre V : Application à l'encapsulation de la riboflavine 159
I. Introduction 159
II. Matériel et méthodes 161
II.1. Matériel 161
II.2. Méthodes 161
II.2.1. Propriétés des gels protéiques induits par réaction enzymatique 161

II.2.2. Préparation et caractérisation des microparticules.....162
II.2.3. Encapsulation de la riboflavine.....164
II.2.4. Analyse statistique.....165
III. Résultats et discussion..... 166
III.1. Capacité de rétention d'eau.....166
III.2. Rhéologie des gels.....167
III.3. L'élaboration des microparticules.....168
III.4. La taille des microparticules.....169
III.5. Solubilité des microparticules.....171
III.6. Capacité et rendement d'encapsulation.....172
III.7. Libération de la riboflavine.....173
IV. Conclusion du chapitre..... 176
Conclusion générale et perspectives 178
I. Conclusion générale..... 178
II. Perspectives..... 181
Références bibliographiques 183

Chapitre I : Introduction

I. Contexte

Depuis quelques années, les habitudes des consommateurs ont évolué vers des aliments pouvant influer positivement sur la santé. Les aliments fonctionnels sont en fait des aliments conventionnels dans lesquels des micronutriments ont été ajoutés (vitamines, antioxydants, probiotiques…). Ce comportement alimentaire a pris de nouvelles dimensions puisque le consommateur d'aujourd'hui est soucieux de l'origine de son alimentation et des technologies utilisées pour la produire ainsi que de ses impacts sur la santé et sur l'environnement. Il existe en effet une tendance pour l'utilisation de matières premières naturelles, renouvelables et transformées par des technologies dites « propres » ou « vertes » **(Ding et al., 2015)**.

Dans ce contexte, une des réponses qui semble correspondre totalement aux exigences nécessaires au développement durable et à la préservation de l'écosystème : (i) les protéines végétales et (ii) la biocatalyse enzymatique, respectivement en tant qu'ingrédients et technologie.

En effet, les protéines végétales ont l'avantage d'être disponibles en grande quantité et à moindre coût par rapport aux protéines animales. Cependant, ces protéines étant globulaires et compactes, il est parfois nécessaire d'apporter des modifications structurales, par voies chimique, physique ou enzymatique, pour moduler leurs propriétés et ainsi élargir leur champ d'applications **(Nesterenko et al., 2014).**

Dans cette optique, nous nous somme intéressé à étudier la formation d'hydrogels à base de protéines de pois obtenus par réticulation enzymatique par le biais de la transglutaminase microbienne dans le but de développer un système d'encapsulation de molécules actives.

Dans ce qui suit nous présenterons l'état de l'art englobant les différents aspects nécessaires pour la compréhension du sujet. Dans un premier temps, la transglutaminase sera décrite depuis son origine jusqu'à ces applications. Dans un deuxième temps, les aspects structuraux et physicochimiques des protéines de pois seront exposés. Enfin dans un troisième temps, des généralités sur l'encapsulation notamment les systèmes d'encapsulation à base d'émulsion seront abordés.

II. Etat de l'art

II.1. Transglutaminase : origine, propriétés et mécanisme catalytique

Les transglutaminases (TGase) composent une famille d'enzymes faisant partie de la classe des transférases (EC 2.3.2.13). Elles catalysent la formation d'une liaison covalente entre un groupe gamma-carboxamide de la glutamine et une amine libre **(Griffin 2002)**. Les TGase ont été identifiées chez les mammifères **(Folk et Chung, 1985)**, les poissons **(Yasueda et al., 1994)**, les plantes **(Serafini-Fracassini et Del Duca, 2008; Luciano et Arntfield, 2012)** et les micro-organismes **(Ando et al., 1989)**.

Au début des années 80, beaucoup de travaux ont été conduits dans le but d'étudier la possibilité d'utilisation de la TGase dans le domaine alimentaire **(Motoki et Nio. 1983; Motoki et al., 1984, 1986, 1987a, b; Nio et al., 1985, 1986a, b)**. Ces études ont été réalisées sur des protéines de lait, de muscles (bœuf, poulet, porc et poisson) et de globulines de soja. Suite à l'amélioration des propriétés de ces protéines (solubilité, capacité de rétention d'eau, émulsification, gélification, stabilité thermique…), il a été conclu que la TGase peut être mise en œuvre pour des applications alimentaires. Cependant, la source de cette transglutaminase, le foie de cobaye (cochon d'inde), excessivement chère, ne permettait pas son exploitation à l'échelle industrielle. Le challenge a ensuite été de produire en masse cette enzyme à un prix acceptable.

La production par voie microbienne était l'une des alternatives pour disposer d'un agent technologique exploitable à plus grande échelle. Après le criblage d'environ 5000 espèces **(Yokoyama et al., 2004)**, la transglutaminase sécrétée par la souche *Streptoverticillium mobaraense* présentait les meilleurs propriétés enzymatiques. Elle a été nommée transglutaminase microbienne (MTGase) **(Ando et al., 1989 ; Nonaka et al., 1989 ; Washizu et al., 1994)**. La MTGase présente plusieurs avantages par rapport aux enzymes d'origine animale ou végétale (indépendance au Ca^{++}, bonne stabilité thermique et au pH, facilité d'obtention et de purification) **(De Jong et Koppelman, 2002)**. Actuellement, cette enzyme est principalement produite (à partir de *Streptoverticillium mobaraense* S-8112) et commercialisée par Ajinomoto sous forme de poudre blanche (Activia®) composée de 1% de substance active et 99% de maltodextrine, avec une activité enzymatique de 100 unités/g de préparation enzymatique. L'unité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme qui catalyse la formation de 1 µmol d'hydroxamate par minute à 37 °C et pH 6 **(Folk, 1970).**

II.1.1. Mécanisme catalytique de la transglutaminase

La MTgase catalyse une réaction de transfert d'acyle entre un groupe gamma-carboxamide de la glutamine et un groupe amine libre. La première étape du mécanisme est l'étape d'acylation **(Figure.I.1)**, où une protéine ou un peptide contenant un résidu glutamine (Gln) exposé, agissant comme substrat donneur d'acyle, réagit avec la cystéine (Cys) catalytique, formant un intermédiaire acyl-enzyme covalent et libérant de l'ammoniac. Par la suite (étape 2), cet intermédiaire acyl-enzyme réagit avec le second substrat, l'accepteur d'acyle, et lui transfère le groupement γ-glutamyle, régénérant par le fait même l'enzyme libre : c'est l'étape de désacylation.

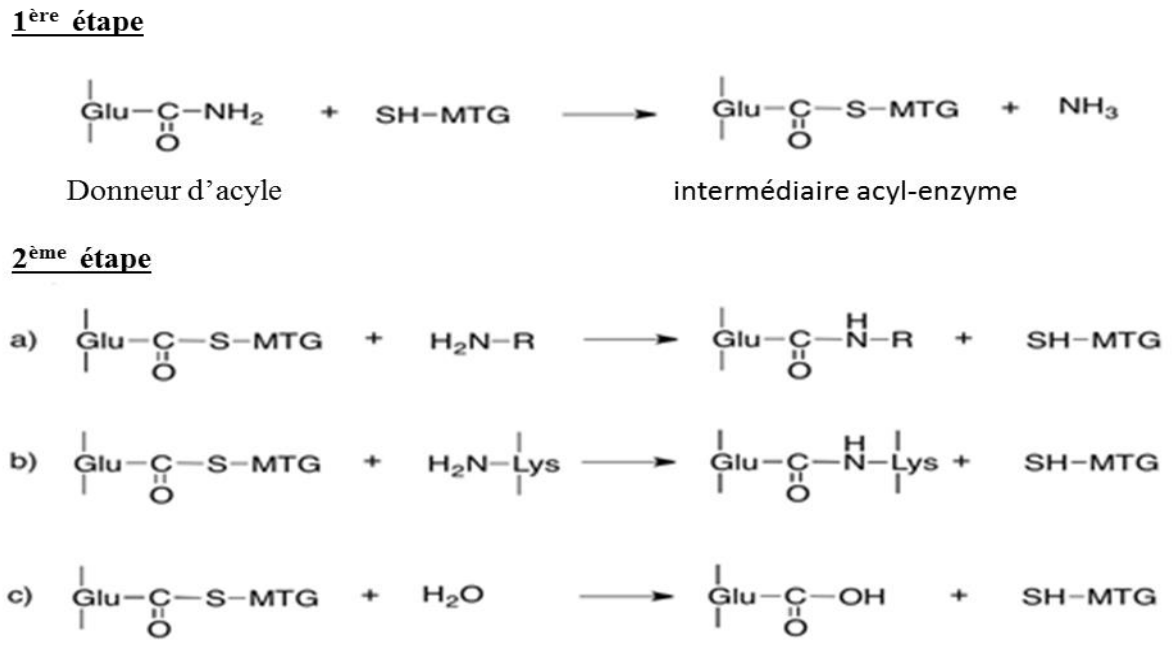


Figure.I.1. Mécanisme catalytique de la transglutaminase **(Djoullah et al., 2015)**

Lorsque le substrat accepteur est une amine, l'étape de désacylation est appelée transamidation **(Figure.I.1a)**. Pour la transamidation, le substrat accepteur peut être presque n'importe quelle amine primaire mais in vivo, il s'agit habituellement d'un résidu lysine (Lys) d'une protéine ou d'un peptide, conduisant à la formation du fragment ε-(γ-glutamine)-lysine (Gln-Lys), on parle alors d'une réticulation **(Figure.I.1b)**. En absence d'amine primaire, l'intermédiaire acyl-enzyme peut aussi être hydrolysé, transformant le résidu Gln du substrat donneur en résidu Glutamate **(Figure.I.1c)**, mais à une vitesse inférieure par rapport à la

transamidation. L'étape de désacylation se nomme alors hydrolyse (**Serafini-Fracassini et Del Duca, 2008)**.

Si les substrats donneurs (Gln) et accepteurs (Lys) font partie de la même molécule, on parle de liaisons intramoléculaires. Par contre, s'ils appartiennent à des molécules distinctes, on parle de liaisons intermoléculaires. Il est à noter que les deux types liaisons se forment simultanément et ce, en fonction de l'accessibilité des résidus Gln et Lys à la MTGase ainsi que de leur rapprochement **(Jaros et al., 2006)**.

II.1.2. Caractéristiques et propriétés enzymatiques de la MTGase

Comme montre le **Tableau.I.1**, les caractéristiques des MTGase obtenues à partir de divers micro-organismes varient entre les souches**. Umezawa et al. (2002)** ont montré des différences entre les propriétés enzymatiques des MTGase isolées à partir des *Streptomyces* sp.. La MTGase de *Streptomyces libani* a révélé une activité enzymatique de 12.5 unités/mg d'enzyme pure contre 25 unités/mg d'enzyme pure pour celle de la *Streptomyces mobaraensis*. La MTGase de *Streptomyces mobaraensis* est relativement la plus stable parmi celles présentées dans le **Tableau.I.1**; elle perd totalement son activité après quelques minutes d'incubation à 80 °C. C'est une protéine monomérique composée de 331 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 38~40 kDa et un pI de 8.9 **(Abd-Rabo et al., 2010; Ando et al., 1989 ; Motoki et Kumazawa, 2000)**. Son site actif est composé de résidus cystéine, histidine et soit asparagine soit aspartate **(Kieliszek et Misiewicz, 2014)**. Contrairement aux TGase appartenant à d'autres sources, animales ou végétales, la MTGase est indépendante des ions Ca^{2+}.

Tableau.I.1. Caractéristiques de la MTGase de différentes origines

Source	MM (kDa)	pI	pH optimum	Stabilité pH (AE 90-100%)	Température Optimale (°C)
Streptomyces mobaraensis S-8112 [(1)]	40.0	8.9	6-7	5-9	50
Streptomyces mobaraensis WSH-Z2 [(2)]	40.0	n.d	6.0	4.5-6.5	52
Streptomyces libani [(3)]	37.9	6.4	5.0	5.7	53
Bacillus circulans [(4)]	45.0	6.3	7.0	6-8.5	47
Bacillus subtilis [(5)]	29.0	n.d	8.2	7.5-8.5	60
Bacillus subtilis [(6)]	23.0	n.d	8.0	7.4-8.2	50
Streptomyces ladakanum [(7)]	39.0	n.d	5.5	4.8-6.2	40
Streptomyces ladakanum [(8)]	37.5	7.9	6.0	4.6-8	50

MM : masse molaire ; pI : point isoélectrique ; AE : activité enzymatique résiduelle après 10 min d'incubation aux pH étudiés.
[(1)]Ando et al., (1989) ; [(2)] Lu et al., (2003) ; [(3)] Umezawa et al., (2002); [(4)] De Barros Soares et al., (2003) ; [(5)]Suzuki et al., (2000) ; [(6)] Kobayashi et al., (1998); [(7)] Ho et al., (2000); [(8)] Tsai et al., (1996).

Afin d'obtenir un bon rendement de réaction enzymatique, il est essentiel de déterminer les conditions (pH, température, force ionique…) où l'activité enzymatique est maximale. Ceci est bien décrit dans la littérature (**Tableau.I.1).** Cependant, la réaction enzymatique est aussi fortement dépendante de la durée de réaction, ce qui rend la stabilité de l'enzyme dans le temps d'une importance capitale. La stabilité de la MTGase en fonction du pH a été étudiée pour 10 min d'incubation dans les milieux étudiés. Or, la réaction enzymatique nécessite généralement plus de 90 min d'incubation **(Shand et al., 2008 ; Rossa et al., 2011).** Cette attention portée à la stabilité de l'enzyme dans le temps en fonction du pH et de la température, nécessite une caractérisation plus longue (5 h) afin de couvrir le plus possible d'applications.

II.1.3. Outils et méthodes analytiques permettant le suivi de la réaction enzymatique

Les méthodes de suivi de la réticulation enzymatique peuvent être classées en méthodes directes ou indirectes.

Les méthodes directes consistent à doser les produits de réaction à savoir l'ammoniaque et le fragment Gln-Lys **(Figure.I.1)**. Le dosage de l'ammoniaque (**Sharma 2001**) n'est pas une méthode fiable du moment où il est produit par d'autres réactions simultanées (hydrolyse) à la réaction recherchée (réticulation).

Le dosage du fragment ε-(γ-glutamine)-lysine est la méthode la plus précise, mais la plus longue dans sa réalisation. L'échantillon est d'abord digéré par une protéolyse extensive (pronase, leucine aminopeptidase, prolidase et carboxypeptidase). Le fragment Gln-Lys ainsi libéré est par la suite séparé des autres acides aminés et dosé par HPLC **(Sakamoto 1996, Schäfer 2005)**.

Les méthodes indirectes sont plus rapides que les méthodes directes. Parmi celles-ci, on distingue l'électrophorèse, la rhéologie, chromatographie d'exclusion stérique (HPLC-SEC) et les méthodes spectrophotométriques.

L'électrophorèse est une technique fréquemment utilisée dans le suivi de la réticulation enzymatique des protéines. Appliquée en conditions réductrices, elle permet de suivre le comportement de chaque sous-unité constituant la protéine vis-à-vis du traitement enzymatique. Une éventuelle diminution de l'intensité des bandes, voir leur disparition, permet d'estimer l'effet du traitement **(Basman 2002)**.

Il est également possible de visualiser les changements induits par la réaction enzymatique, formation de dimères et de polymères, sur des profils d'HPLC-SEC **(Anouradha 2009).**

Le suivi de l'évolution des groupements amines libres (NH_2) consommés par la réaction enzymatique peut faire l'objet d'une méthode rapide de suivi de la réticulation enzymatique. Le dosage des NH_2 libre au cours de la réaction enzymatique peut se réaliser avec les méthodes spectrophotométriques utilisant les réactifs O-phtaldiadehyde (OPA) **(Dinnella et al., 2002)** et trinitrobenzènesulfonique (TNBS) **(Gan et al., 2009)**. Ainsi, le degré de réticulation peut être calculé à partir du rapport de la quantité d'amine libre après et avant réaction enzymatique.

Par ailleurs, la rhéologie dynamique est un outil puissant qui, à l'échelle mésoscopique, permet à la fois de suivre la cinétique de gélification des protéines par réticulation et de caractériser les propriétés des gels formés (**Sun, Arntfield 2011)**.

II.1.4. Susceptibilité des protéines vis-à-vis du traitement enzymatique par la TGase

La principale condition pour qu'une protéine soit un bon substrat pour la TGase est d'avoir suffisamment de résidus Gln et Lys accessibles (**De Jong et Koppelman, 2002**). Ceci dépend, d'une part, de la structure primaire qui définit la composition de la protéine en ces deux acides aminés (quantités), et d'autre part, de la conformation de la protéine (structure ternaire et quaternaire) qui peut éventuellement limiter l'accessibilité de la TGase à ces deux résidus.

Un autre facteur qui semble aussi très important pour cette réaction enzymatique, est la distance (voisinage) entre les deux résidus (**Jaros et al., 2006)**. En effet, si les deux résidus appartiennent à la protéine, la transglutaminase ne pourra jamais former la liaison Gln-Lys (intramoléculaire) si la Gln et la Lys ne sont pas suffisamment proche l'une de l'autre. Dans le cas des liaisons intermoléculaires, i.e. liaison entre deux protéines distinctes, l'encombrement stérique ou l'incompatibilité thermodynamique entre les protéines peut limiter le rapprochement des deux résidus empêchant ainsi la réaction enzymatique.

Ceci a été mis en évidence par la présence de petits peptides comme le CBZ-Gln-Gly (substrat donneur) et/ou N-α-acetyl-lysine (substrat accepteur) au cours du traitement enzymatique de la caséine **(Dinnella et al., 2002)**. En effet, il a été montré que les résidus Gln

et Lys de la caséine non impliqués dans la réaction enzymatique en absence de CBZ-Gln-Gly et N-α-acetyl-lysine, participent dans la réaction en présence de ces deux derniers. En effet, la petite taille de ces substrats synthétiques a permis leur pénétration à l'intérieur de la protéine et, en étant suffisamment proches de ces résidus Gln et Lys non impliquées dans la réaction enzymatique, de former ainsi la liaison Gln-Lys.

Sur cette base et dans le but d'éviter les problèmes liés à l'accessibilité, l'encombrement stérique et le rapprochement des substrats donneur et accepteur, le CBZ-Gln-Gly et l'hydroxyle amine (NH_2OH) ou le N-α-acétyl-lysine constituent les substrats modèles les plus utilisés pour caractériser l'activité enzymatique des TGases **(Folk, 1970; Ohtsuka et al., 2002a, 2002b**).

Tableau.I.2. Comportement de quelques protéines vis-à-vis du traitement enzymatique en présence (+) et en absence (-) du dithiothreitol (DTT).

Substrat	MTGase		PTGase		ETGase	
	- DTT	+ DTT	- DTT	+ DTT	- DTT	+ DTT
Caséine	++	++	++	++	-	++
β-lactoglobuline	-	++	-	±	-	-
α-lactalbumine	+	++	-	±	-	±
BSA	-	++	-	+	-	+
Hemoglobine	±	±	±	±	-	-
Myosine	++	++	++	++	-	-
Glycinine	++	++	-	-	-	++

MTGase : TGase microbienne (*S. mobaraense)* ; PTGase : TGase du plasma bovine ; ETGase : TGase d'érythrocyte de porc. Le comportement de chaque protéine vis-à-vis du traitement enzymatique a été évalué à partir des profils électrophorétiques. - : pas de réaction ; ± : faible réaction ; + : bonne réaction ; ++ : très bonne réaction. **(De Jong et al., 2001 ; De Jong et Koppelman, 2002 ; Jaros et al., 2006).**

Le **Tableau.I.2** regroupe les comportements de 7 protéines vis-à-vis du traitement enzymatique avec trois types de TGase. A l'état natif, en absence de DTT, les substrats protéiques sont plus susceptibles à la MTGase qu'avec les autres TGases mammifères (de plasma et d'érythrocytes de sang), à l'exception de la β-lactoglobuline et la BSA qui ne sont affectées par aucune des TGases présentées. La caséine, la myosine et la glycinine sont d'excellents substrats pour la MTGase. Leurs résidus Gln et Lys, contrairement à ceux de la β-lactoglobuline et la BSA, semblent être facilement accessibles pour la MTGase et suffisamment proches l'une de l'autre pour la catalyse enzymatique. La caséine et la myosine gardent le même comportement avec la TGase de plasma (PTGase) que celui observé avec la MTGase. Tandis que, la glycinine, protéine globulaire de soja, est insensible à la PTGase. Par

ailleurs, l'ensemble des substrats étudiés ne sont pas affectés par la TGase d'érythrocyte (ETGase). Le comportement vis-à-vis du traitement enzymatique dépend à la fois de la nature de la protéine et de la source de la TGase. Ceci est probablement lié à la masse moléculaire de la MTGase (~ 40 kDa) qui est deux fois plus petite que celle des TGase des mammifères (~ 80 kDa) (**Motoki et Kumazawa, 2000),** permettant ainsi un meilleur accès aux sites réactifs de la protéine.

II.1.5. Stratégies d'amélioration de la susceptibilité des protéines vis-à-vis de la TGase

Il est possible d'améliorer la susceptibilité des protéines vis-à-vis du traitement enzymatique. Le principe repose sur la déstabilisation de la protéine afin de déplier la structure permettant ainsi une meilleure exposition des résidus Gln et Lys à la TGase pour catalyser la réaction.

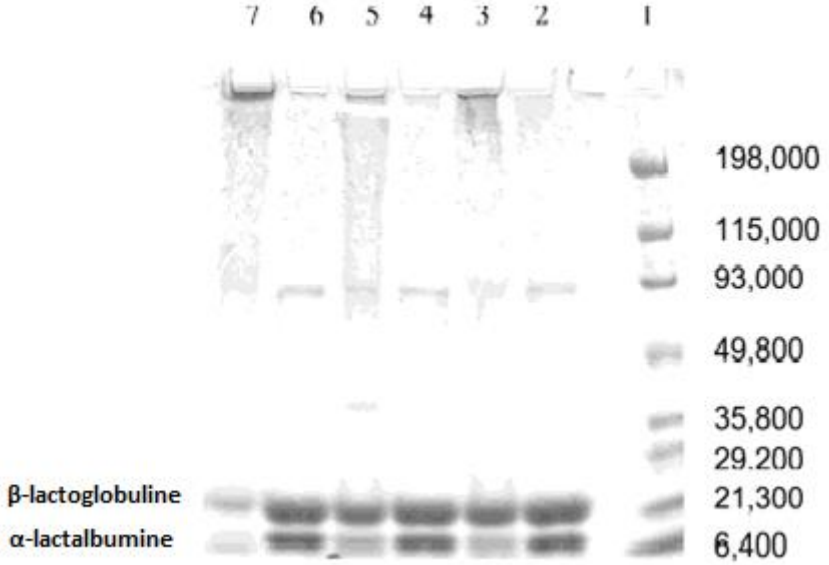


Figure.I.2. Profils électrophorétiques des protéines de lactosérum traités avec 100 unités de MTGase / g de protéine à 50 °C pendant 5 h à différents pH. piste 1 : marqueurs de poids moléculaires (Da) ; pistes 2, 4 et 6 : protéines de lactosérum respectivement à pH 6, 7 et 8 non traitées avec la MTGase (témoins) ; pistes 3, 5 et 7 : protéines de lactosérum respectivement à pH 6, 7 et 8 traitées avec la MTGase **(Eissa et al., 2004).**

La variation du pH peut affecter la structure de la protéine et la rendre partiellement dépliée et ainsi plus flexible au traitement enzymatique. Dans la **Figure.I.2** est montré l'effet

de la variation du pH sur la réticulation enzymatique des protéines de lactosérum **(Eissa et al., 2004)**. Le profil électrophorétique des protéines de lactosérum à pH 8 traité avec la MTGase montre que les bandes sont moins intenses que celles traitées à pH 6 et pH 7, notamment pour la β-lactoglobuline, rendant compte d'un meilleur rendement de réticulation.

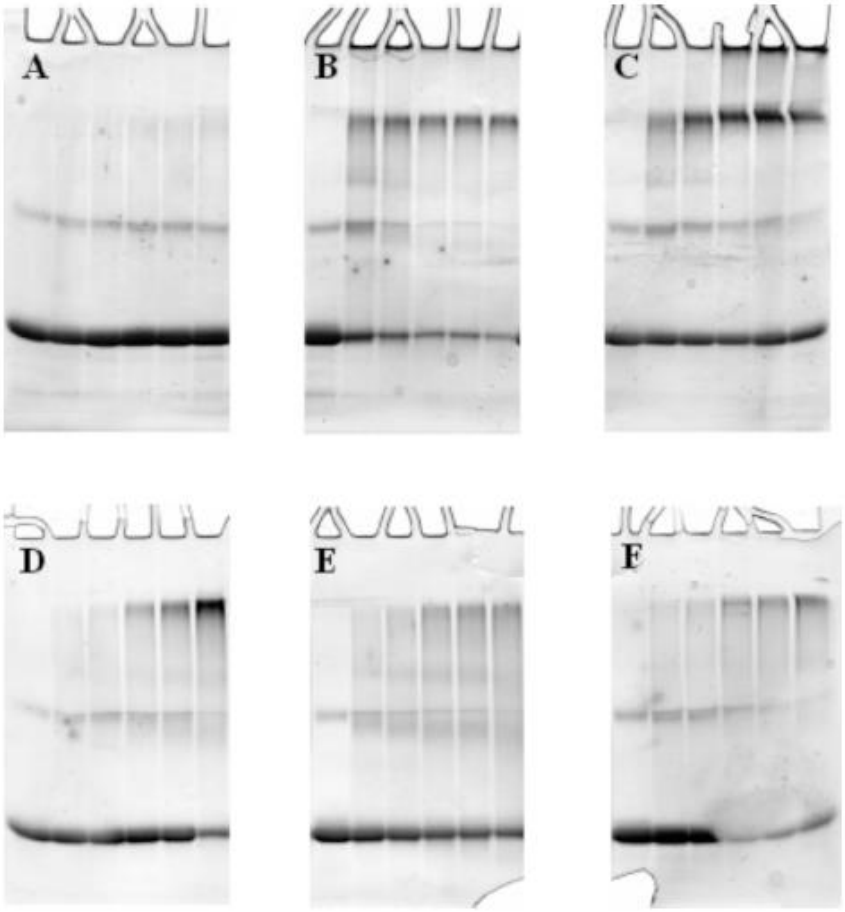


Figure. I.3. Profils électrophorétiques de la β-lactoglobuline (BLG, 1% m/m) traités avec 10 unités de MTGase / g de protéine à pH 6 et 40 °C dans différentes conditions. Les pistes de chaque gel représentent la durée d'incubation respectivement de gauche à droite : 0, 1, 3, 6 et 24 h. (A) : BLG native ; (B) : BLG prédénaturée thermiquement 30 min à 90 °C ; (C) : BLG pré-incubée dans 50% éthanol ; (D) : BLG pré-incubée dans 10 mM DTT ; (E) : BLG pré-incubée dans 10 mM sulfite de sodium ; (F) : BLG pré-incubée dans 10 mM cystéine **(**D'après **De Jong et Koppelman, 2002).**

L'une des stratégies la plus décrite dans la littérature est l'utilisation d'agent réducteur chimique comme le dithiothréitol (DTT) dont le rôle est de rompre les ponts disulfures

stabilisant les protéines **(Eissa et Khan, 2006)**. Comme il est montré dans le **Tableau.I.2**, la β-lactoglobuline et la BSA, mauvais substrats à l'état natif, deviennent très sensibles au traitement enzymatique par la MTGase suite à leur pré-dénaturation par le DTT.

La **Figure.I.3** montre l'effet de différentes méthodes de dénaturation des protéines sur la réticulation enzymatique **(De Jong et Koppelman. 2002)**. Il est clair qu'à l'état natif la β-lactoglobuline est un mauvais substrat de la MTGase (**Figure.I.3A**). En présence de 10 mM de DTT (**Figure.I.3D**), une trainée en haut du gel est formée qui s'intensifie avec la durée de traitement. Ceci est dû à la formation de molécules de haut poids moléculaire (réticulation) rendant compte sur l'amélioration de la réaction enzymatique par rapport à l'échantillon natif (**Figure.I.3A**).

Cependant, puisque le DTT n'est pas autorisé en industrie alimentaire, d'autres agents réducteurs ont été testés. Le sulfite de sodium (**Figure.I.3E**) ainsi que la cystéine (**Figure.I.3F**) améliorent la réticulation de la β-lactoglobuline mais à un moindre degré que le DTT.

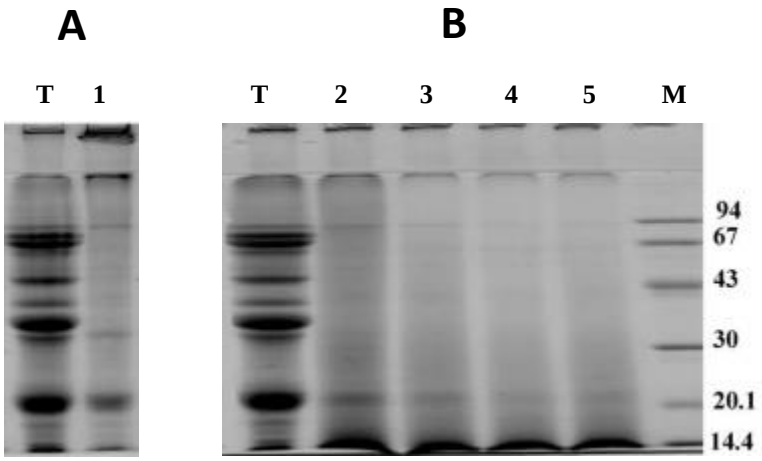


Figure. I.4. Profils électrophorétiques de l'isolat protéique de soja (SPI, 5% m/m) traités avec 13 unités de MTGase / g de protéine à pH 7 et 40 °C pendant 2.5 h. (A) : SPI natif ; (B) : SPI pré-hydrolysé (0.003 g d'Alcalase 2.4 L/ g de SPI, pH 8, 50 °C). Pistes T : SPI témoins ; piste 1 : SPI traité avec MTGase ; Pistes 2, 3, 4 et 5 : SPI préalablement hydrolysé avec l'Alcalase puis traités avec MTGase à des degrés d'hydrolyse respectivement de 0.5, 1.0, 1.5 et 2 % ; piste M : marqueurs de poids moléculaires **(**D'après **Walsh et al., 2003).**

Une autre alternative au DTT est le traitement thermique. En effet, la chaleur déstabilise la structure de la protéine et rend ainsi les résidus Gln et Lys plus accessibles à la TGase. L'effet de la pré-dénaturation thermique de la β-lactoglobuline est illustré dans la **Figure.I.3B**. Il est également possible de déstabiliser la protéine par l'utilisation des solvants organiques tels que l'éthanol (**Figure.I.3C).**

Un autre moyen pouvant être utilisé pour améliorer la disposition des protéines au traitement enzymatique est l'utilisation d'agents chélateurs tel que l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA). Ce dernier a été utilisé pour améliorer la réticulation de l'α-lactalbumine, en éliminant le calcium (pont calcique) stabilisant la structure de cette protéine **(Jaros et al., 2006)**.

L'hydrolyse partielle des protéines peut faire l'objet d'une amélioration du degré de réticulation comme le montre la **Figure.I.4 (Walsh et al., 2003).** Le clivage partiel des acides aminés suite à la protéolyse permet de détruire la structure compact des protéines et de mieux exposer ainsi les résidus Gln et Lys à la TGase.

II.1.6. Utilisations potentielles de la TGase

La TGase est souvent utilisée en agroalimentaire dans le but de modifier la texture des aliments mais aussi pour améliorer les propriétés techno-fonctionnelles et nutritionnelles des protéines.

La première application industrielle de la TGase était la restructuration des viandes et des poissons par l'assemblage de morceaux, généralement des chutes, dans la forme souhaitée **(Kuraishi et al., 1997),** d'où le surnom de colle biologique naturelle **(Griffin et al., 2002)**. Ce phénomène est obtenu par la liaison des protéines entre elles, principalement géré par des liaisons intermoléculaires.

La TGase a été également utilisée pour améliorer la valeur nutritionnelle par l'incorporation de la lysine dans les protéines déficientes en cet acide aminé essentiel **(Nonaka et al., 1996)**.

Babin et Dickinson (2001) ont montré la possibilité de contrôler la thermo-réversibilité d'un gel de gélatine par le renforcement du réseau protéique par des liaisons

covalentes (Gln-Lys) induites par la TGase (propriété souhaitable dans les industries de pâtisserie et de confiserie).

La TGase a été utilisé pour produire des films comestibles d'un mélange de gélatine et de caséinates **(Chambi et Grosso, 2006).**

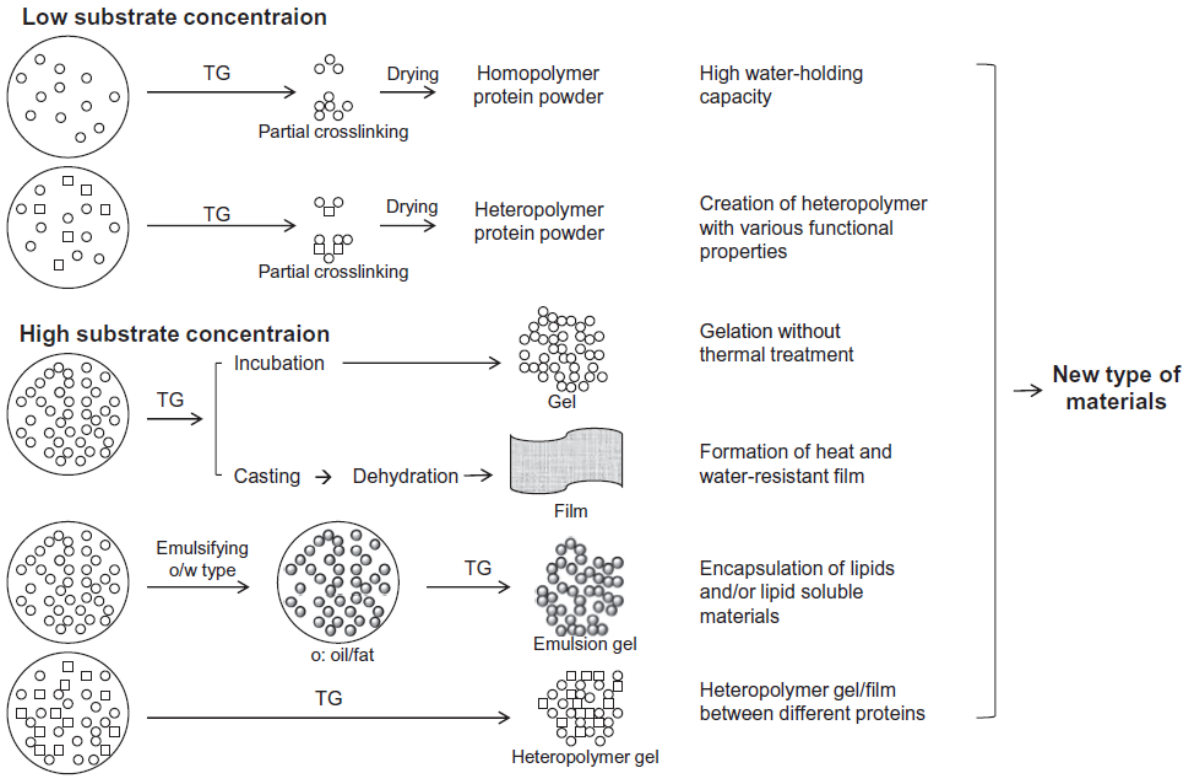


Figure.I.5. Possibilités d'exploitations potentielles de la TGase. D'après **(Gaspar et Goes-Favoni, 2015 ; Yokoyama et al., 2004).**

Bronts et al., (2002) ont décrit la formation d'ingrédients protéiques (hétéropolymères) regroupant des protéines végétales (blé) et animales (lactosérum).

Il est également possible d'encapsuler des composés bioactifs dans des microparticules, à base de protéines, obtenue par une émulsification suivie d'une gélification par la TGase, surmontant ainsi les limites des procédés de gélification thermiques et chimiques **(Heidebach et al., 2009; Yokoyama et al., 2004)**. Ce réseau stabilisé par les liaisons intra et intermoléculaire constitue un bon support afin de contrôler la rétention et la

libération des molécules sensibles au cours du stockage, du passage en bouche ou dans le tractus gastro-intestinal. La **Figure.I.5** illustre les principales applications possibles de la TGase.

Depuis la commercialisation de la MTGase, une centaine de brevets ont été déposés couvrant plusieurs domaines d'applications, dont la majorité concerne des aliments de source animale (muscle, lait). La MTGase est rarement utilisée pour traiter des végétaux, à l'exception du tofu de soja, la panification et les nouilles de blé **(Dube et al., 2007)**.

II.1.6.1. Protéines animales comme substrats de la TGase

Protéines de lait : l'utilisation des protéines laitières comme un substrat pour la TGase a été largement étudié dans la littérature (Jaros et al., 2006). Ceci est principalement dû à la place qu'occupe ces protéines dans l'industrie alimentaire et de la bonne compatibilité des caséines, protéines majoritaire du lait, avec le traitement enzymatique. Les protéines de lactosérum sont beaucoup plus difficiles à réticuler comme cela a été montré précédemment (cf. **Tableau.I.2)**. L'un des principaux domaines d'utilisation de la TGase sont les industries des yaourts et des fromages. L'objectif est d'améliorer la force des gels et de diminuer la synérèse (**Aaltonen et al., 2014; Bönisch et al. 2007).**

Protéines de muscle : les protéines des muscles tels que la myosine et l'actine sont de bons substrats pour la TGase. Au-delà de la restructuration de morceaux de viandes et de poissons, la TGase a été utilisée pour créer de nouvelles textures pour les produits de charcuterie et les plats cuisinés sans avoir recours à l'utilisation excessive de sel et de phosphate **(Stangierski et al., 2014 ; Kieliszek et Misiewicz, 2014).**

II.1.6.2. Protéines végétales comme substrats de la TGase

Protéines de soja : Les protéines de soja sont de bons substrats pour la réaction enzymatique. Le tofu, un produit de type caillé de soja, est préparé par l'agrégation des protéines de soja avec addition des sels de calcium ou de magnésium. Ainsi, le produit obtenu ne peut se conserver longtemps par défaut de stérilisation. En effet, la texture fragile du tofu est rapidement détruite dans l'autoclave. Le renforcement du réseau protéique du tofu par des liaisons Gln-Lys par le biais de la TGase permet une bonne résistance à la stérilisation et de prolonger ainsi la durée de conservation **(Chang et al., 2011)**.

Protéines de blé : Le gluten est la protéine majoritaire dans la farine de blé. Le réseau protéique du gluten, stabilisé par des ponts disulfures, détermine les propriétés de la pâte et joue un rôle important dans la qualité du pain. Le traitement enzymatique du gluten conduit à des produits plus volumineux et de meilleures qualités. La hauteur de la pâte feuilletée et le volume du croissant sont plus importants dans le cas d'un traitement avec la TGase **(Gerrard et al., 2001).**

Autres protéines végétales : Au cours des dernières années, plusieurs sources végétales ont été proposées comme matières premières possibles pour la production d'ingrédients protéiques, telles que le pois, le lupin, le riz et le tournesol (Boye et al., 2010b). Particulièrement, les protéines de pois constituent une bonne alternative aux protéines de soja. Peu de travaux concernant le traitement des protéines de pois avec la transglutaminase ont été réalisés **(Larre et al. 1992, 1993 ; Shand et al., 2008 ; Sun et Arntfield, 2011)** et leur comportement vis-à-vis du traitement enzymatique est très mal connu. Dans ce qui suit, nous détaillerons la composition et la structure des protéines de pois dans le but d'évaluer la possibilité d'utilisation de ces protéines en tant que substrat de la TGase.

II.2. Les protéines de pois

La graine de pois est composée d'environ 25 % de protéines. Selon **Osborne (1924)**, les protéines végétales peuvent être classées en fonction de leur solubilité : les albumines (solubles dans l'eau), les globulines (solubles dans les tampons salins), les prolamines (solubles dans l'alcool) et les glutélines (partiellement solubles dans les solutions acides et alcalines). Les protéines majoritaires de pois sont essentiellement composées de globulines (60 à 70 %) et d'albumines (20 à 30 %). Il est à noter que la composition est sensiblement affectée par le génotype et les conditions environnementales de production **(Guéguen et Barbot., 1988)**.

En général, l'extraction des protéines est réalisée dans des conditions optimales de solubilité (pH, salinité, température…), suivie d'une purification (dialyse, précipitation, ultrafiltration…) et enfin d'un séchage (lyophilisation, atomisation…). Toutes ces étapes affectent sensiblement la qualité de la protéine et déterminent ces propriétés fonctionnelles **(Boye et al., 2010 ; Tian et al., 1999)**.

II.2.1. Les globulines

Les globulines (Glob) sont généralement classées 7S et 11S conformément à leur coefficient de sédimentation qui sont appelées, pour les pois, viciline/conviciline et légumine respectivement **(Barac et al., 2010)**. La composition en ces deux fractions et leur proportion relative est affectée principalement par des facteurs génétiques et modérément par des modifications de l'environnement. A partir de l'étude de plusieurs génotypes de pois distincts, **Casey (1982)** a évalué un rapport viciline/légumine fluctuant entre 0,67 et 5, rapport qui a été resserré entre 2 et 4 par **Tzitzikas et al. (2006)**

II.2.1.1. La légumine 11S

Les légumines ont une masse molaire de 360-400 kDa **(Owusu-Ansah et Mc Curdy, 1991)**. Elles sont constituées de monomères de 60 kDa, qui s'assemblent en hexamère à des pH entre 7 et 9. Chaque monomère de légumine est formé de deux polypeptides acide α et basique β de 40 kDa et 20 kDa, respectivement et liés par paires de manière covalente via un pont disulfure **(Croy et al., 1980a ; Tzitzikas et al., 2006)**. Celles-ci présentent des points isoélectriques (pI) variables selon les auteurs ; α : 4,5-5,8 et β : 6,2-8,8. Les légumines se

singularisent des vicilines/convicilines par leur contenu en acides aminés soufrés ; il a été recensé pour chaque monomère α-β de 60 kDa de légumine jusqu'à quatre méthionines et sept résidus cystéine **(Croy et al., 1980a-c)**, tandis que **Casey et Short (1981)** ont recensé respectivement deux et trois résidus, alors que les vicilines/convicilines seraient dépourvues d'acides aminés soufrés. En comparaison, la glycinine du soja contiendrait jusqu'à huit résidus cystéine **(O'Kane et al., 2004)**.

La structure très condensée des légumines serait liée à sa faible hydratation dans la graine. **Plietz et al., (1983)** avaient suggéré que l'ensemble des globulines 11S ont des structures quaternaires très similaires ; celles-ci adopteraient un modèle de structure trigonale bipyramidale. Un tel arrangement justifierait l'orientation des polypeptides α, plutôt hydrophiles vers l'extérieur et β, plutôt hydrophobes vers l'intérieur de la protéine oligomérique **(Figure.I.6)**. Ce modèle semblerait plus adapté que celui de deux hexagones empilés (Marcone et al., 1998a).

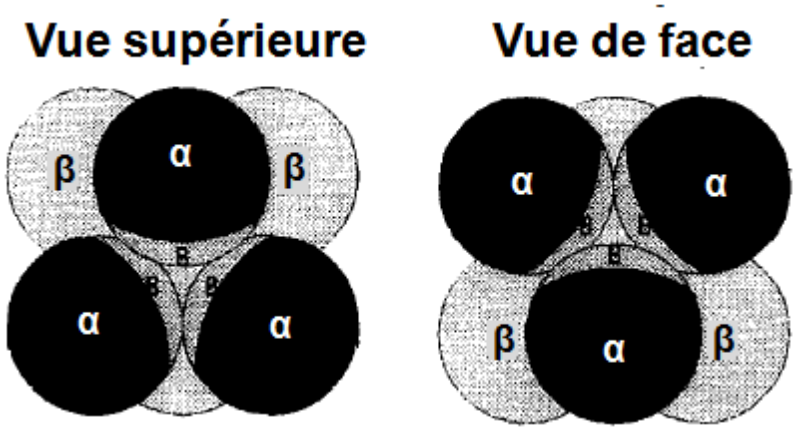


Figure.I.6. Modèle de structure quaternaire trigonale bipyramidale envisageable pour les globulines 11S de dicotylédones. Chaque sphère représente un polypeptide acide α ou basique β, constitutifs des sous-unités des légumines. (d'après **Marcone et al., 1998a**).

II.2.1.2. Les vicilines 7S

Malgré des masses molaires plus faibles, le groupe des vicilines 7S apparaît plus hétérogène et leur structure n'est pas clairement définie. Les vicilines sont des trimères avec une masse molaire fluctuant de 150-200 kDa ; les différentes sous-unités proviennent d'un

même précurseur de 50 kDa et leur liaison ne fait pas intervenir de ponts disulfures **(Croy et al., 1980b ; Gatehouse et al., 1982)** (**Figure 1.10)**. Les vicilines sont donc principalement constituées de trois sous-unités de ≈50 kDa. D'autres polypeptides, plus petits et non-séparables, ont été recensés, possédant des masses molaires de 35,33, 30, 19, 14, 12 kDa **(Tzitzikas et al., 2006)**. Ces sous-unités résulteraient de protéolyses *in vivo* du précurseur de ≈50 kDa, ne modifiant pas fondamentalement la masse molaire ou l'hétérogénéité de charge ; les polypeptides clivés restent ainsi associés. Les sites possibles de clivage du précurseur de ≈50 kDa sont au nombre de deux, dénommés α :β et β :γ **(Matta et al., 1981 ; Tzitzikas et al., 2006)**.

Lorsque les clivages se produisent sur les deux sites, des fragments de 20 kDa (α), 13 kDa (β), 12-16 kDa (γ) sont obtenus **(Figure.I.7)**. Lorsque le clivage se produit entre α et β, les fragments résultants sont de 20 kDa (α) et 25-30 kDa (β+γ), alors qu'un clivage entre β et γ donne des fragments de 30-36 kDa (α+β) et 12-16 kDa (γ) **(Gatehouse et al., 1982)**.

II.2.1.3. La conviciline 7S

La conviciline 7S seraient une troisième famille de globulines de pois. Elle est constituée de sous-unités d'environ ≈71 kDa très probablement associés en tétramère, de masse molaire de ≈290 kDa **(Barac et al., 2010)**. Des résidus cystéine et méthionine ont été identifiés par sous-unités de conviciline. Ces dernières ont une composition globale en acides aminés homologue à celle des vicilines. Contrairement aux vicilines, il n'a pas été reporté de clivage post-synthèse **(Tzitzikas et al., 2006).**

II.2.2. Les albumines 2S

L'albumine (Alb) est composée principalement d'une fraction abondante PA2, qui est un homodimère de polypeptides de 26 kDa ou 25 kDa, et d'une petite fraction PA1 de 11 kDa composée de deux polypeptides de 6 kDa **(Gatehouse, 1985).** Contrairement aux autres albumines (2S), les dimères PA1 et PA2 ne sont pas liées par des liaisons disulfures **(Le Gall et al., 2005).** La fraction albumine contient aussi la lectine, inhibiteur de protéase et la lipoxygénase **(Le Gall et al., 2007).**

II.2.3. Les acides aminés des protéines de pois

Le **Tableau.I.3** présente les compositions moyennes en acides aminés, tirées de la littérature, pour la fraction albumine de pois ainsi que pour les deux fractions séparées de globulines de pois comparées à celles du soja : légumines 11S/vicilines 7S et glycinine 11S/conglycinine 7S, respectivement **(Bhatty, 1982 ; Derbshyre et al., 1976 ; Emmert et Baker, 1995 ; Jackson et al., 1969 ; Karr-Lilienthal, et al., 2005 ; Savage et Deo, 1989 ; O'Kane et al., 2004 ; Rangel et al., 2003 ; Riblett et al., 2001)**. Il apparaît que les protéines de légumineuses ont une composition très proche en acides aminés **(Bhatty, 1982 ; Boye et al., 2010b ; Savage et al., 1989)**.

Tableau.I.3. Composition moyenne en acides aminés des fractions protéiques du pois et du soja.

Acides aminés	Protéines de pois			Protéines de soja	
	Albumines	Légumine 11S	Vicilines 7S	Glycinine 11S	Conglycinine 7S
Essentiel					
Thréonine	5.4	3.4±0.1	3.4±0.6	1.3±0.0	1.3±0.0
Valine	4.8	4.7±0.3	5.1±0.8	4.3±0.9	3.4±0.2
Méthionine	1.2	0.6±0.1	0.5±0.2	1.1±0.1	0.9±0.2
Cystéine	n.d	0.7±0.1	0.1±0.1	1.8±0.5	1.1±0.1
Isoleucine	3.8	4.8±2.2	5.1±0.1	4.3±0.9	3.8±0.1
leucine	4.7	7.8±0.3	9.1±0.1	11.7±5.5	5.3±0.6
Tyrosine	4.2	2.5±0.7	2.7±0.6	3.1±0.4	3.1±0.4
Phénylalanine	4.6	4.1±.7	6.1±0.1	7.7±3.2	6.2±0.7
Lysine	**8.8**	**4.8±0.3**	**7.3±1.1**	**6.6±2.9**	**7.7±1.0**
Histidine	2.3	2.6±0.2	2.4±0.5	1.7±0.4	1.9±0.4
Arginine	4.8	1.25±0.2	6.9±0.8	6.1±1.4	9.1±0.5
Tryptophane	1.6	0.8±0.4	0.1±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0
Non essentiel					
Proline	4.5	5.0±0.6	4.0±0.9	7.6±1.4	7.3±0.2
Acide aspartique	12.0	12.1±0.6	12.0±0.0	9.0±4.4	8.8±1.5
Serine	5.1	5.9±1.0	6.2±0.7	5.8±1.7	7.9±0.1
Acide glutamique	**14.0**	**19.6±2.1**	**18.5±1.3**	**16.2±0.5**	**22.1±2.3**
Glycine	5.6	6.2±2.0	3.7±1.1	5.3±1.4	5.8±0.4
alanine	6.1	5.5±1.2	3.7±1.2	5.7±0.3	5.5±0.1

En comparant la composition des protéines de pois en résidus glutamine et lysine avec celle des protéines de soja **(Karr-Lilienthal, et al., 2005)**, connues comme étant de bons substrats pour la MTGase, les fractions Alb et Glob de pois constituent donc d'excellents candidats pour la réticulation enzymatique.

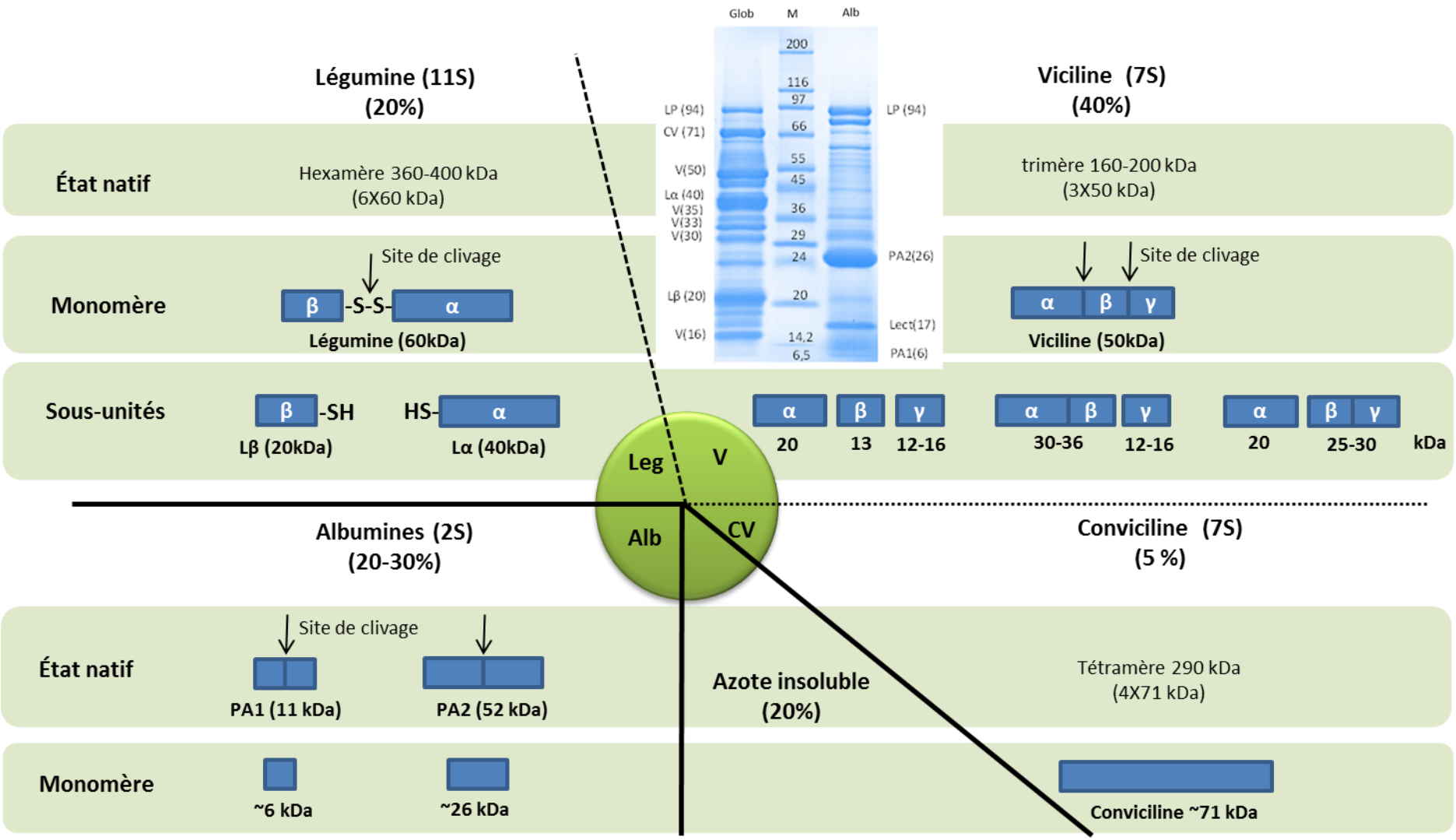


Figure.I.7. Composition et structure des principales fractions de protéines de pois. Le gel d'électrophorèse présente les sous unités constituant les fractions globulines (Glob) et albumines (Alb) en condition dénaturantes (SDS) et réductrice (DTT).

II.3. Généralités sur l'encapsulation

II.3.1. Définition

Sous le terme de « microencapsulation » sont regroupées toutes les techniques qui permettent d'obtenir des particules individualisées dont le rôle est d'isoler des substances actives liquide, solide ou gazeuse à l'aide d'une barrière **(Champagne and Fustier, 2007; Gouin, 2004 ; Fang et Bhandari, 2010 ; Lam et Gambari, 2014; Nedovic et al., 2011)**. Cette barrière peut protéger la molécule de l'oxygène, de la lumière ou de l'eau, éviter le contact avec d'autres ingrédients, masquer un goût ou permettre une libération contrôlée. Ces particules peuvent être classées en deux principaux groupes de structure différente (**Figure. I.8**).

Les microcapsules : il s'agit de particules creuses constituées d'une membrane solide qui enveloppe la substance encapsulée au cœur de cette entité (système réservoir).

Les microsphères (billes, microparticules) : il s'agit de particules pleines constituées d'un réseau continu de matériau support dans lequel est dispersée la substance à encapsuler (système matriciel).

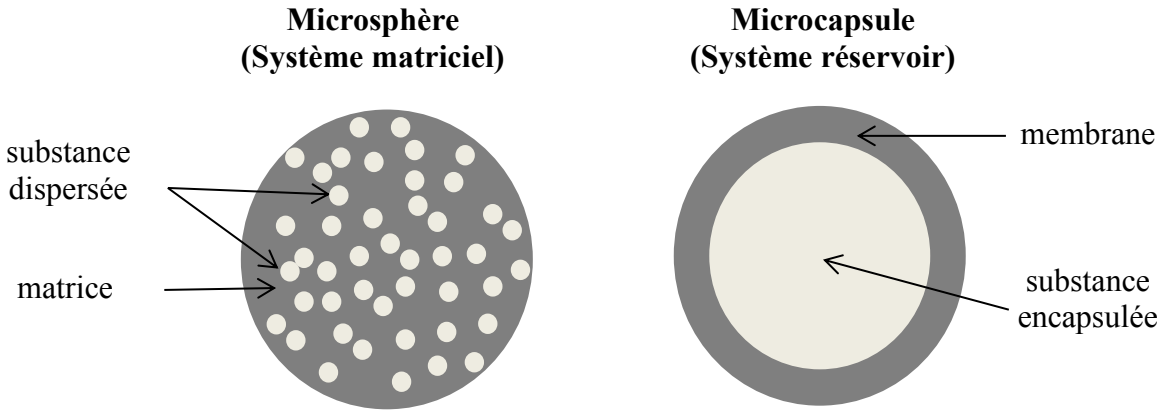


Figure.I.8. Principaux types de particules obtenues par microencapsulation

L'efficacité de la protection et de la libération contrôlée dépendent principalement de la composition et de la structure de la barrière constituée, mais aussi des conditions (température, pH, humidité..) de traitement et d'utilisation de cette matrice **(Champagne et Fustier, 2007)**.

De par leurs propriétés fonctionnelles (émulsification, gélification), les protéines constituent un excellent support d'encapsulation. L'une des stratégies d'encapsulation est la dispersion de la substance active dans un hydrogel de protéine à l'état de microparticules **(Grigoriev and Miller, 2009 ; McClements and Li, 2010)**. Les microparticules peuvent être formées suite à une dispersion de la protéine sous forme d'une émulsion primaire **(Chen et al., 2006)** ou multiples **(Lee and Rosenberg, 2000)** de type double émulsion suivi d'une gélification. Dans ce qui suit, nous détaillerons les systèmes d'encapsulation à base d'émulsion ainsi que leurs modes de gélification.

II.3.2. Les systèmes d'encapsulation à partir d'émulsion

II.3.2.1. Les émulsions

Une émulsion est une dispersion d'un liquide (phase dispersée ou discontinue) en fine gouttelettes dans un autre liquide (phase dispersante ou continue). Les deux liquides étant non miscibles, l'un hydrophile (phase aqueuse) et l'autre hydrophobe (phase huileuse). Thermodynamiquement instable, les émulsions nécessitent des agents émulsifiants comprenant un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe (amphiphile) dont les protéines font partie. Les émulsions sont classées en deux grands groupes ; émulsions simples et multiples **(Figure.I.9)**.

Les émulsions simples : sont composées d'une phase lipophile, d'une phase hydrophile et d'un émulsifiant **(Figure. I.9a)**. Suivant la phase dispersée (interne) huileuse ou aqueuse, on distingue respectivement deux types d'émulsion : huile dans eau (H/E) ou eau dans huile (E/H). Les émulsions E/H étant les moins courantes, elles sont parfois appelées émulsions inverses. Le type d'émulsion formé dépend largement de l'agent émulsifiant mis en œuvre. De manière évidente, il est possible d'encapsuler des substances actives hydrophiles dans la phase aqueuse, des substances actives hydrophobes dans la phase huileuse. Les émulsions simples ont été largement utilisées pour encapsuler des substances bioactives hydrophobes tels que le lycopène, la lutéine, le β-carotène mais rarement les substances hydrophiles **(McClements et al. 2007)**.

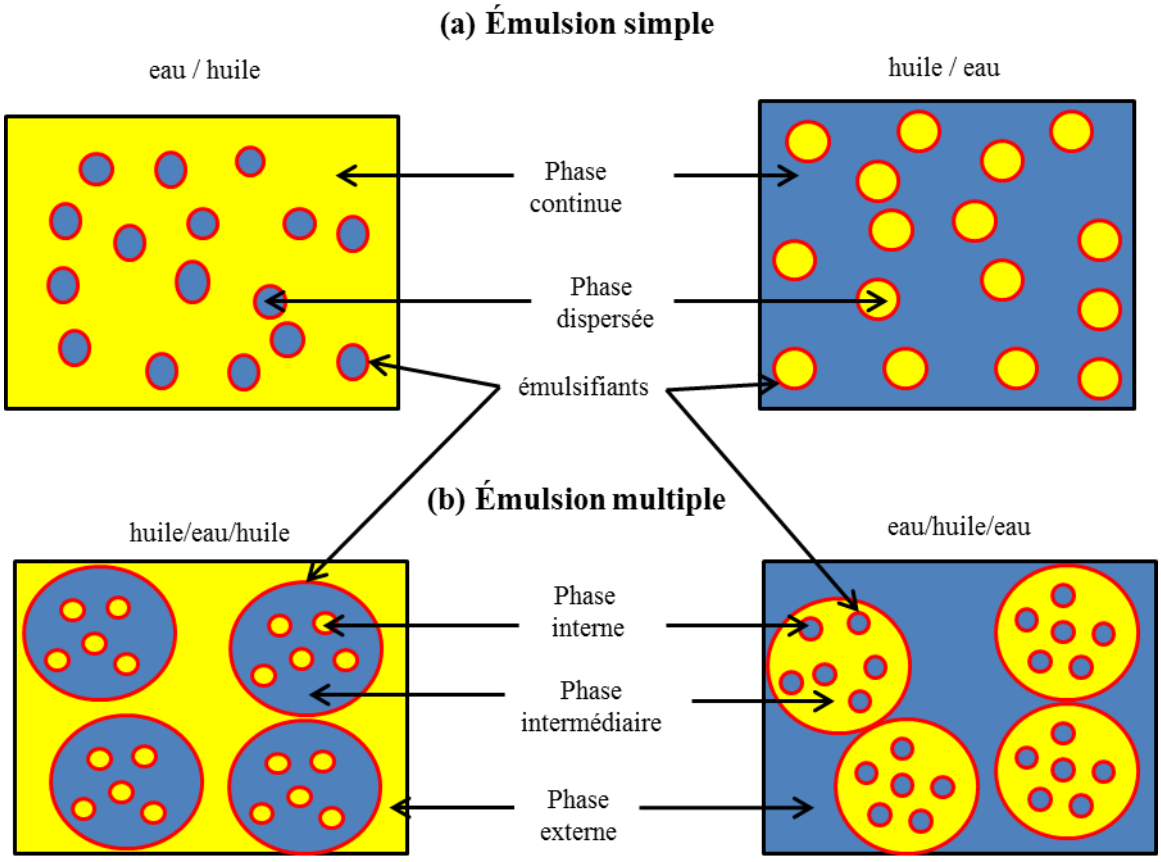


Figure.I.9. Les principaux types d'émulsions : (a) : simple ; (b) : multiple.

Les émulsions multiples : sont des dispersions d'une émulsion simple dans une phase dispersante **(Figure. I.9b)**. La dispersion d'une émulsion H/E dans une phase huileuse (H) donne une émulsion H/E/H. à l'inverse, la dispersion d'une émulsion E/H dans une phase aqueuse (E) donne une émulsion E/H/E. On y distingue trois phases : interne / intermédiaire / externe. Chaque phase peut contenir des substances actives différentes, ce qui permet la présence de substances incompatibles dans le même système. Dans ce type d'émulsion, il y a deux couches interfaciales différentes : l'interface entourant la phase interne et l'interface entourant la phase intermédiaire. En conséquence, deux types d'émulsifiants sont généralement nécessaires pour stabiliser les émulsions multiples. Il existe peu d'exemples d'émulsions multiples effectivement utilisées dans l'industrie alimentaire pour encapsuler des composés fonctionnels **(McClements et al. 2007)**. Certaines émulsions E/H/E ont été utilisées pour encapsuler des molécules hydrophobes telles que la β-carotène et les acides gras ω-3. Mais principalement, les émulsions multiples ont été utilisées pour encapsuler des

composés hydrophiles tels que la vitamine B, des immunoglobulines, de l'insuline, des protéines, des acides aminés ou encore des probiotiques **(McClements et Li., 2010)**.

En raison de leur facilité de préparation et de faible coût par rapport aux émulsions multiples, les émulsions classiques (simples) sont plus utilisées dans l'industrie agroalimentaire. Néanmoins, les émulsions multiples offrent plus d'opportunités et de performances (protection, libération), il est même possible d'encapsuler des substances hydrophobes et hydrophiles dans la même capsule **(Cournarie et al., 2004)**.

II.3.2.2. Stabilité des émulsions

Dans tous les cas, simple ou multiple, les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables qui tendent à se séparer en deux phases distinctes, aqueuse et huileuse. Cette séparation peut avoir lieu par l'intermédiaire des phénomènes connus de floculation, coalescence et crémage **(McClements et al., 2007)**. Par conséquent, des techniques de stabilisation ont été développées. Deux approches sont possibles, renforcement des couches interfaciales ou limitation des rencontres entre globules dispersées.

Le renforcement de la couche interfaciale consiste à mettre en place une stratégie permettant de conférer aux gouttelettes une charge électrique et les faire interagir avec un biopolymère (protéines ou polysaccarides) de charge opposé. En se basant sur cette stratégie d'interaction électrostatique, plusieurs couches peuvent être déposées **(McClements and Li, 2010)**. Dans ce cas, d'une part, l'émulsion est stabilisée par la mise en œuvre de grandes répulsions électrostatique et/ou stérique et d'autre part, une grande rigidité est conférée à la couche interfaciale. Ainsi, la gouttelette est mieux protégée contre les agressions extérieures. Ce système est appelé émulsion multicouche **(Figure.I.10)**.

La deuxième stratégie de stabilisation des émulsions consiste à agir sur la viscosité de la phase dispersante dans le but de limiter la collision des gouttelettes et ralentir le crémage. Elle peut être réalisée par l'ajout d'agent épaississant ou gélifiant. On parle de stabilisation rhéologique.

Les stratégies de stabilisation citées constituent toute les deux des techniques intéressantes pour la formulation de microcapsules ou microsphère individualisées. En effet, les gouttelettes de l'émulsion multicouche, récupérées par simple filtration, constituent des microcapsules très stables et performantes. Elles sont composées d'une enveloppe solide et un

cœur liquide contenant les substances à encapsuler (système réservoir). Les microparticules à base d'émulsion multicouches semblent particulièrement prometteurs et adaptés à la problématique de la libération contrôlée **(Gharsallaoui et al., 2012a; Gharsallaoui et al., 2012b ; McClements et al., 2007; McClements et Li. 2010).**

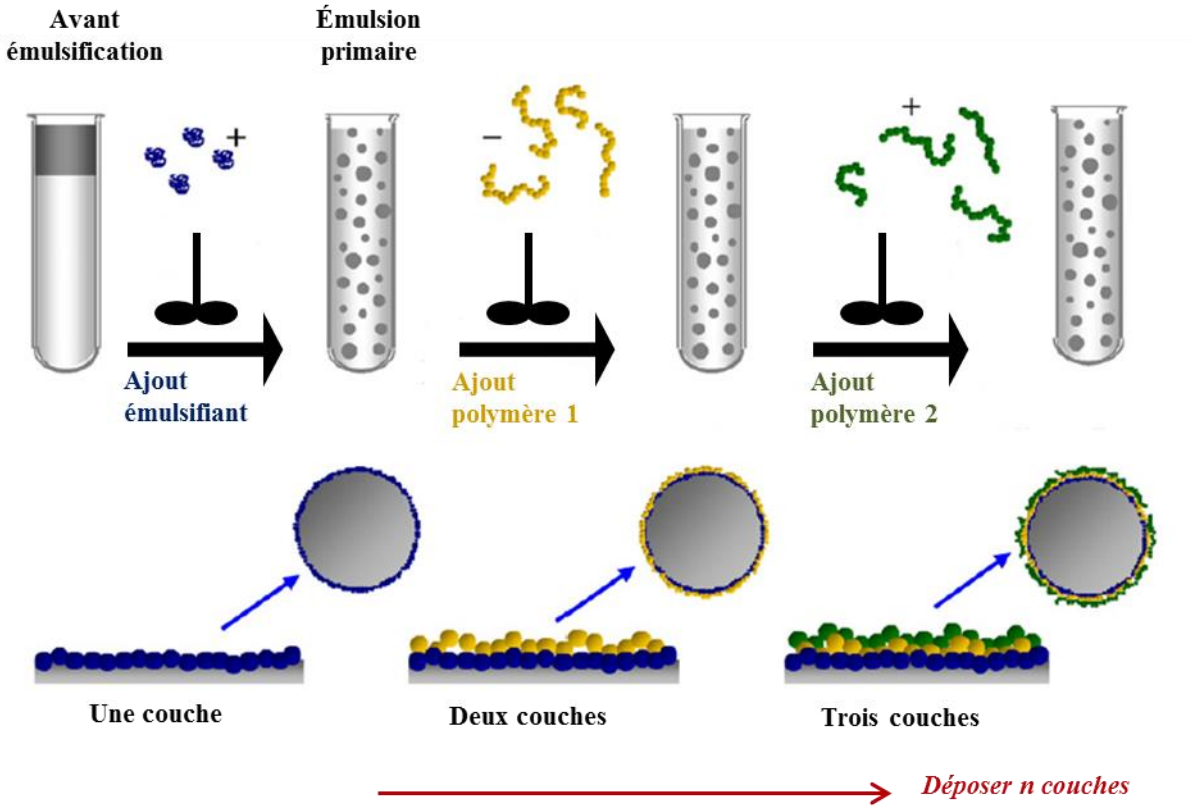


Figure.I.10. Emulsion multicouches. Adapté de (**McClements et Li. 2010)**

La stabilisation rhéologique quant à elle, conduit à la transformation de la phase aqueuse en hydrogel de biopolymères. Si la phase aqueuse est la phase dispersante (extérieure), l'ensemble du système sera gélifié en un seul bloc contenant les gouttelettes d'huile. Dans ce cas, il n'est pas possible de former des microparticules individualisées. Par contre, si la phase aqueuse est la phase dispersée, la gélification conduit à la formation de microparticules constituant un bon support d'encapsulation (système matriciel). Dans cette étude, on s'intéresse plutôt au système d'encapsulation matriciel (microparticules) à base d'hydrogel de protéine **(Figure. I.11)**. Il s'agit de maîtriser la formation de microparticules par une dispersion de la protéine contenant les molécules actives sous forme d'émulsion suivie d'une gélification.

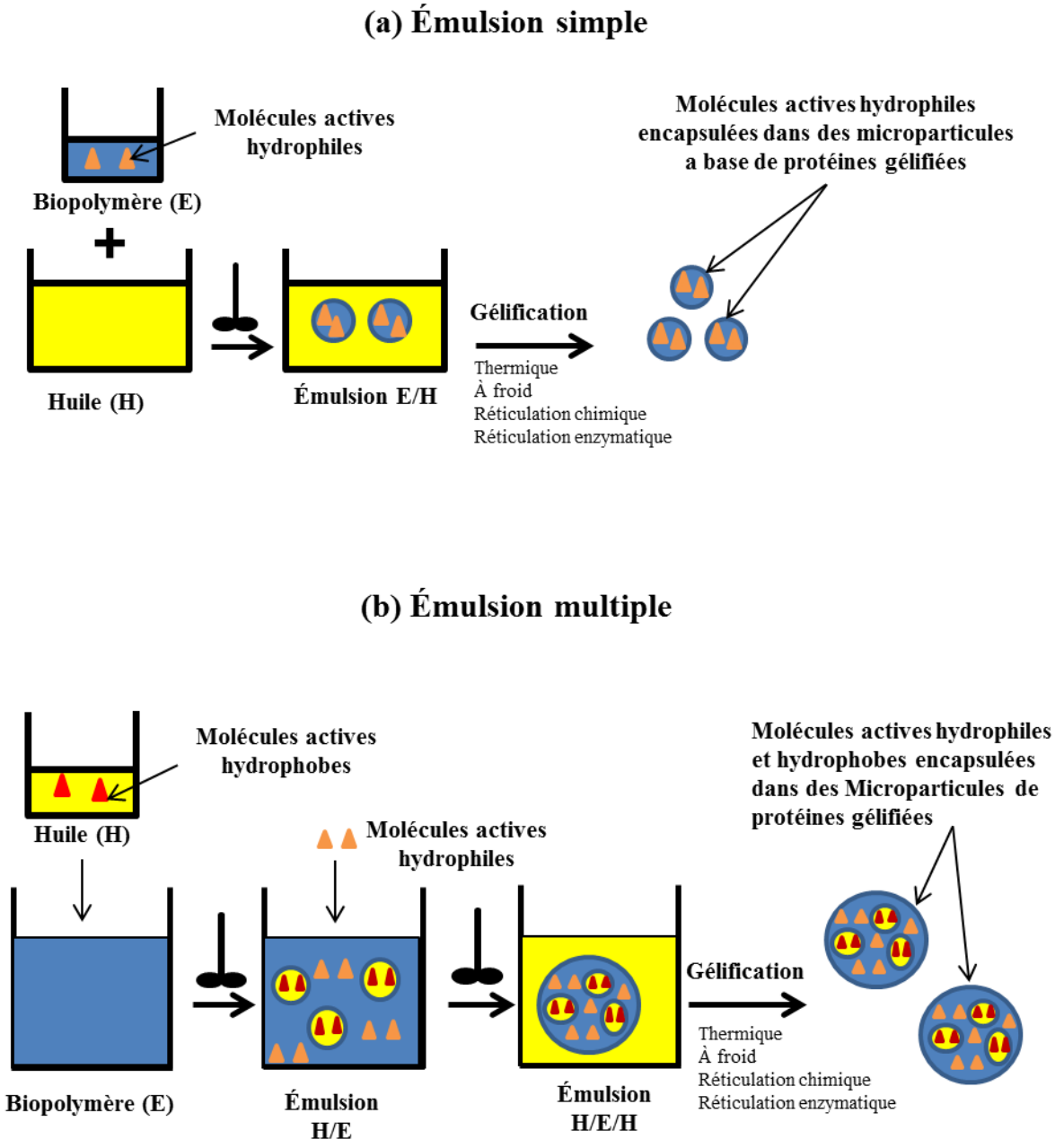


Figure.I.11. Système d'encapsulation à base d'émulsions : (a) simple et (b) multiple (double) suivies d'une gélification de la protéine.

II.3.2.3. Stratégies de gélification des protéines

Habituellement, les hydrogels de protéines sont formés par voie thermique. Il s'agit de dénaturer la protéine par chauffage dans le but de la déplier et d'exposer ces groupements hydrophobes et thiols libres. Ainsi, les protéines sont agrégées sous forme d'un réseau tridimensionnel emprisonnant l'eau contenant les molécules actives (hydrophiles). Les forces impliquées dans la stabilisation du réseau sont des liaisons non covalentes (hydrophobe,

liaison hydrogène, force de Van der Waals) et/ou covalentes (ponts disulfures). Cependant, l'application de cette méthode est limitée par la sensibilité thermique des substances actives **(Chen et al., 2006)**.

L'utilisation d'agent réticulant tel que le glutaraldéhyde **(Caillard et al., 2009 ; Lee et Rosenberg. 1999)** peut conduire à une gélification, mais pour des raisons de toxicité, la méthode ne peut pas faire l'objet d'application alimentaire.

Compte tenu de ces limites, d'autres méthodes de gélification ont été développées : il s'agit de méthodes dites de gélification à froid. La gélification est réalisée par la maitrise de la force ionique (ajout de sel) et/ou du pH (acidification) d'une solution protéique prédénaturée thermiquement (en absence de sel) sous forme d'agrégats solubles **(Maltais et al., 2005; Chen et Subirade. 2009)**. C'est une bonne alternative aux hydrogels à base de polysaccharide tel que l'alginate (**Chen et al., 2006)**.

Une autre méthode peut faire l'objet d'une gélification des protéines est la réticulation par voie enzymatique par le biais de la transglutaminase **(Shand, Ya et al. 2008)**. La réticulation enzymatique est largement utilisée pour améliorer la texture des aliments **(Yokoyama al., 2004)** mais rarement pour encapsuler des substances actives **(Cho et al., 2003; Heidebach et al., 2009)**.

III. Objectifs et démarche scientifique

L'objectif général de la thèse est de développer des hydrogels à base de protéines de pois réticulés par voie enzymatique. Ces gels pourront être générés à l'état de microparticules à partir d'un procédé d'émulsification suivi d'une gélification par la transglutaminase et appliquées à l'encapsulation de molécules actives. Il s'agit également d'étendre les applications d'un mode de gélification non conventionnel aux protéines végétales et de valoriser les protéines de pois comme alternative aux protéines de soja.

L'objectif spécifique est d'étudier le comportement des fractions protéiques de pois, seules et en mélange, à l'état natif et dénaturé, dans le but de comprendre les mécanismes de réticulation enzymatique et de sélectionner ainsi le système le plus adéquat afin d'élaborer des microparticules les plus performantes pour encapsuler des molécules actives.

Sur la base de l'analyse bibliographique et afin d'atteindre ces objectifs, le projet a été organisé en quatre chapitres :

- Préparation et caractérisations des matières premières (Chapitre II)

L'objectif de cette partie est de produire, en quantités suffisantes, des fractions d'albumines (Alb) et de globulines (Glob) les plus « natives » possibles. Le travail a consisté d'abord à optimiser les paramètres d'extraction et de purification des fractions Alb et Glob en combinant précipitation isoélectrique et ultrafiltration, et par la suite à réaliser leur caractérisation afin d'évaluer leur affinité vis-à-vis de la transglutaminase microbienne (MTGase).

Dans un deuxième temps, l'activité et la stabilité de l'enzyme dans différentes conditions de pH et de température ont été étudiées dans le but de sélectionner les paramètres optimaux de réaction enzymatique.

- Mise en place des méthodes de suivi de la réticulation enzymatique (Chapitre III)

La réaction enzymatique est un processus très complexe dont le rendement diffère selon le substrat. Afin de permettre une bonne compréhension du comportement des fractions Alb et Glob vis-à-vis de la réaction enzymatique, il est nécessaire de combiner plusieurs techniques analytiques et de les adapter à la matrice étudiée.

Le travail a consisté dans un premier temps à examiner les méthodes fréquemment utilisées dans la littérature pour caractériser la cinétique de la réticulation enzymatique, à savoir : l'électrophorèse, les méthodes spectrophotométriques et l'HPLC, dans l'objectif de faire ressortir les points forts et les limites de chaque méthode.

A cette occasion, deux nouvelles méthodes ont été développées afin de combler les limites constatées avec les méthodes classiques. La première est l'utilisation de la RMN pour quantifier le fragment Gln-Lys et le degré de réticulation, et ce sur des substrats modèles. La deuxième, basée sur les techniques de mesure de taille SDS-PAGE et DLS, est une méthode qui permet de visualiser les liaisons intramoléculaires.

- Etude du comportement des fractions Alb et Glob vis-à-vis de la MTGase (Chapitre IV)

Dans cette partie, le comportement des fractions Alb et Glob à l'état natif et dénaturé, ainsi qu'en mélange à l'état natif, vis-à-vis du traitement enzymatique a été étudié dans le but d'évaluer leur aptitude à constituer un réseau gélifié pouvant servir de support d'encapsulation.

Le cœur du travail a été centré sur la compréhension de l'effet de la pré-dénaturation thermique et chimique (DTT) des fractions Alb et Glob sur la cinétique enzymatique ainsi que sur les propriétés de structure des systèmes étudiés.

- Application à l'encapsulation de la riboflavine (chapitre V)

Le travail a consisté dans un premier temps à préparer des microparticules par la dispersion de la protéine sous forme d'émulsion E/H suivie d'une gélification par voie enzymatique. Il s'agissait d'abord d'optimiser le procédé d'émulsification (émulsifiant, type d'agitation…), et par la suite de caractériser les microparticules formées (morphologie, taille, dégradation…).

La seconde étape a été l'étude des performances d'encapsulation de ces microparticules appliquée à la riboflavine. L'étude in vitro de la cinétique et des mécanismes de libération de la riboflavine dans des milieux gastrique et intestinal simulés en présence et en absence d'enzymes digestives a été menée.

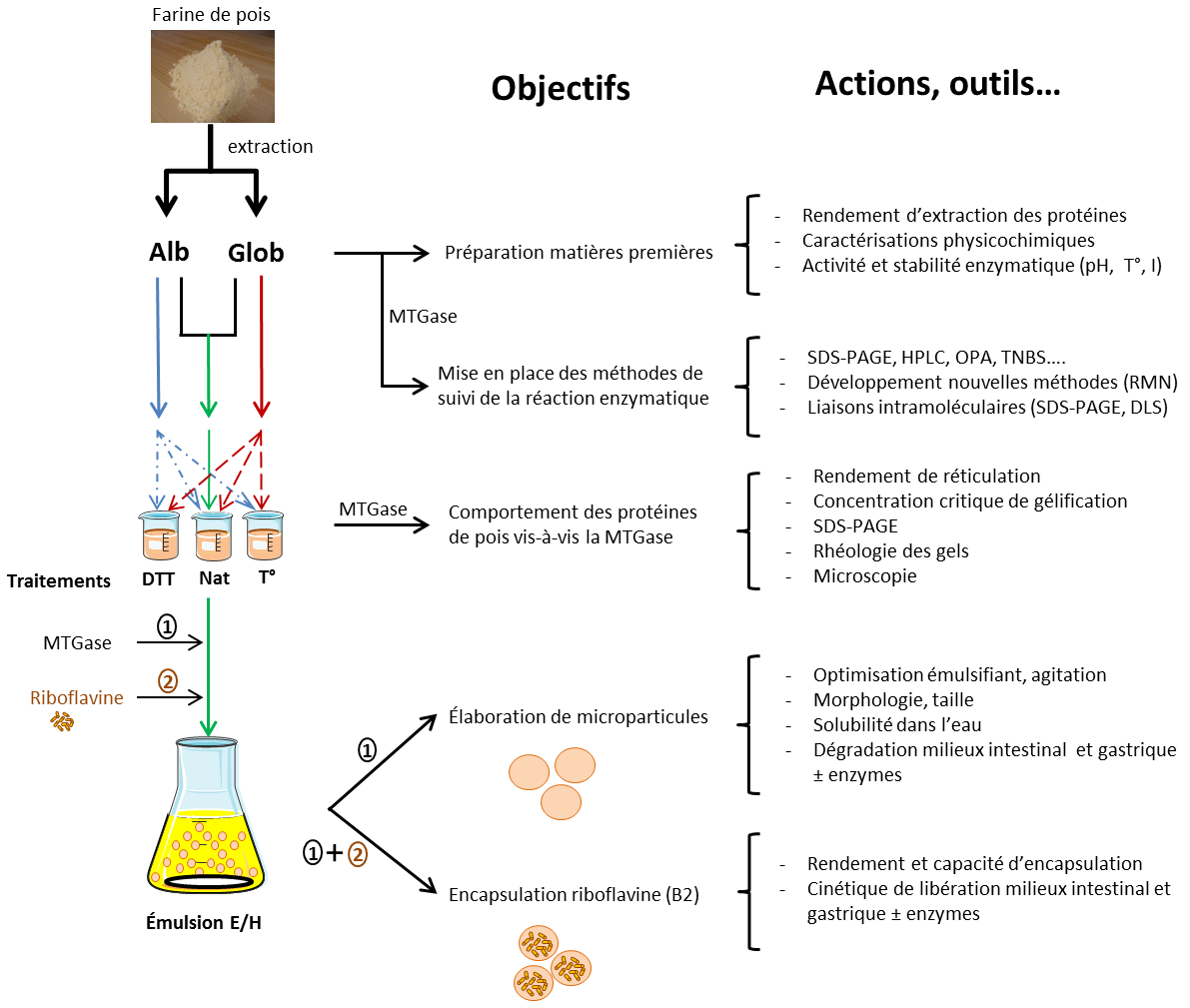


Figure.I.12. Représentation schématique de la démarche scientifique adoptée.

La partie expérimentale du manuscrit est organisée en quatre chapitres (II, III, IV et V) qui comporte chacun une introduction, une section matériel et méthodes, une section résultats et discussion, et une conclusion. Les sections résultats et discussion sont présentées principalement sous forme d'articles scientifiques (publié, soumis ou en préparation) sans la partie matériel et méthodes qui est déjà présentée au début de chaque chapitre. Et enfin, une dernière section donne les conclusions et les perspectives de ce travail.

Chapitre II : Préparation et caractérisation des matières premières

I. Introduction

La graine de pois est composée d'environ 25 % de protéines. Selon **Osborne (1924)**, les protéines végétales peuvent être classées en fonction de leur solubilité : les albumines (solubles dans l'eau), les globulines (solubles dans les tampons salins), les prolamines (solubles dans l'alcool) et les glutélines (solubles dans les solutions acides et alcalines). Les protéines majoritaires de pois sont essentiellement composées de globulines (60 à 70 %) et d'albumines (20 à 30 %). Il est à noter que la composition est sensiblement affectée par le génotype et les conditions environnementales de production **(Guéguen et Barbot., 1988)**.

En général, l'extraction des protéines est réalisée dans des conditions optimales de solubilité (pH, salinité, température…), suivie d'une purification (dialyse, précipitation, ultrafiltration…) et enfin d'un séchage (lyophilisation, atomisation…). Toutes ces étapes affectent sensiblement la qualité de la protéine et déterminent ces propriétés fonctionnelles **(Boye et al., 2010 ; Tian et al., 1999)**.

L'objectif de cette partie est de produire, en quantités suffisantes, des fractions d'albumines (Alb) et de globulines (Glob) les plus « natives » possibles. Le travail consistera d'abord à optimiser les paramètres d'extraction et de purification des fractions Alb et Glob, et par la suite de caractériser ces fractions afin d'évaluer leur affinité vis-à-vis de la transglutaminase microbienne (MTGase).

Dans un deuxième temps, l'activité et la stabilité de l'enzyme dans différentes conditions de pH et de température seront étudiées dans le but de sélectionner les paramètres optimaux de réaction enzymatique.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. La farine de pois

La farine de pois utilisée a été fournie par la société Roquette Frères (Lesterm France). Elle est issue d'un mélange de plusieurs variétés.

II.1.2. La transglutaminase (MTGase)

La poudre commerciale (Activia® WM) fournie par Ajinomoto est une transglutaminase microbienne (MTGase) indépendante du Ca2+. Elle est dérivée de l'espèce *Streptoverticillium mobaraense*. La préparation enzymatique est composée de 99% de maltodextrine et de 1 % d'enzyme active. Son activité enzymatique a été estimée, par la méthode à l'hydroxamate, à 100 unités d'enzyme/g de poudre. L'unité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme (poudre) nécessaire pour catalyser la formation de 1 µmol d'hydroxamate par minute à 37 °C et pH 6 **(Folk, 1970)**. Sa masse moléculaire et son pI sont respectivement 40 kDa et 8,9 **(Ando et al., 1989)**.

II.1.3. Les réactifs chimiques

Les réactifs chimiques utilisés pour les différentes analyses sont de grade analytique et commercialisés par la société Sigma Aldrich® (France) et VWR (France).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation et caractérisation des fractions protéiques

II.2.1.1. Extraction et purification des protéines

L'extraction sélective et successive des albumines et des globulines a été réalisée en fonction de leurs solubilités (les albumines dans l'eau et les globulines dans les tampons salins) selon **Crévieu et al., (1996)**. Les tampons d'extraction des albumines et des globulines sont respectivement l'acétate d'ammonium (0.1 M, pH 4.9) et le phosphate de sodium (0.1 M, pH 8 en présence de 5 % de sulfate de potassium). Après 1 h d'agitation à 4 °C, les fractions protéiques ont été récupérées successivement dans le surnageant par centrifugation (10 000 x

g, 15 min, 4 °C). Le ratio farine de pois (m):tampon d'extraction (v) a été 1:10. Le culot a été lavé 2 fois avec 20 volumes d'eau distillée entre les deux opérations.

Les deux fractions protéiques ont été concentrées 5 fois par ultrafiltration et purifiées par diafiltration (5 volumes d'eau distillée pour les albumines et 10 volumes de carbonate d'ammonium 5 mM pour les globulines). Le dispositif de filtration utilisé (Millipore Pellicon 2®) est équipé d'une cassette « Kvick » d'une surface de 0.11 m^2 et un seuil de coupure de 10 kDa. La pression à l'intérieur du dispositif a été réglée à 2,2 bars. Les solutions d'albumines (Alb) et de globulines (Glob) ont été ensuite congelées et lyophilisées.

Trois protocoles ont été étudiés afin d'évaluer l'effet de la délipidation sur la qualité des fractions protéiques. Le premier protocole consiste à délipider la farine de pois à l'éther de pétrole (EP) avant extraction des protéines. Le second protocole consiste à délipider successivement la farine de pois par l'éther de pétrole puis par l'éthanol (Eth). Le troisième protocole consiste à extraire les protéines de pois sans aucun traitement préalable de la farine (sans délipidation).

La farine de pois a été délipidée par l'ajout de 10 volumes de solvant pour un volume de farine. Après une heure de contact sous agitation, la poudre délipidée a été récupérée dans un filtre de porosité 3 (17 à 40 µm) et séchée dans un dessiccateur.

II.2.1.2. Caractérisations des fractions protéiques

Mesures de la teneur en matière sèche

Le taux de matière sèche a été déterminé selon la norme Afnor NF V03-706. Un échantillon de 1 à 2,5 g est pesé dans un creuset en porcelaine préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à 105 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante puis, il est refroidi dans un dessiccateur, pendant 2 heures. Le pourcentage en matière sèche (MS) est déterminé par l'équation (II.1):

$$\%\boldsymbol{MS} = \frac{\mathbf{msec}}{\mathbf{mi}} * \mathbf{100} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \textbf{(II.1)}$$

m_i : masse de l'échantillon initial (g) ;
m_{sec} : masse de l'échantillon sec (g) après passage dans l'étuve à 105°C.

Mesures de la teneur en matière minérale

La teneur en matière minérale est déterminée par la perte de masse d'un échantillon d'après la norme NF V 03-922. Des échantillons déshydratés sont placés dans un four pendant 5 heures à 550 °C. Le pourcentage de matière minérale est calculé par l'équation (II.2):

$$\%\boldsymbol{MM} = \frac{\mathbf{mcendres}}{\mathbf{msec}} * \mathbf{100} \text{ ..... (II.2)}$$

m_{sec} : masse de l'échantillon en (g) après passage à l'étuve à 105 °C ;
$m_{cendres}$: masse des cendres en (g) issues de l'échantillon après calcination à 550 °C.

Mesure de la teneur en protéine par dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total a été réalisé selon la méthode de Kjeldahl dans une unité de digestion et de distillation Büchi. La teneur en protéine a été ensuite calculée à partir de la quantité d'azote présente dans l'échantillon, en utilisant le facteur de conversion azote-protéine pour les protéines de pois de 5.44 **(Mosse, 1990).** Dans un premier temps, l'échantillon à analyser (0.5 g pour les poudres, 2 g pour les solutions) est minéralisé à haute température (400 °C) pendant 1 heure en présence de 15 ml d'acide sulfurique concentré et d'un catalyseur (Kjeltab). La totalité de l'azote de l'échantillon est transformée en ion ammonium. Après refroidissement, 50 ml de soude à 40 % sont ajoutés à l'échantillon minéralisé pour permettre la formation de l'ammoniaque. L'ammoniaque formé est entraîné à la vapeur d'eau puis piégé dans une solution d'acide borique (2 %). L'ammoniaque est dosé directement par une solution d'acide chlorhydrique de normalité connue. A partir du volume d'acide utilisé, la quantité d'azote total de l'échantillon est calculée par l'équation (II.3):

$$\%\,\boldsymbol{prot\acute{e}ine} = \frac{\mathbf{V} * \mathbf{N} * \mathbf{14} * \mathbf{100}}{\mathbf{m} * \frac{\%\mathbf{MS}}{\mathbf{100}}} * \mathbf{F} \text{ ..... (II.3)}$$

V: Volume d'HCl utilisé pour la titration de l'échantillon (ml) ;
N : normalité de l'acide chlorhydrique ;
m : la masse de l'échantillon ;
% MS : pourcentage en matière sèche de l'échantillon ;
F : facteur de conversion des protéines de pois (5.44).

Teneur en lipides extractibles à l'éther de pétrole

Les lipides résiduels de l'isolat de protéine de pois ont été extraits à l'éther de pétrole dans un appareil de Soxhlet. Cette extraction a été faite suivant la norme NF ISO 734-1. Les ballons (250 ml) et les cartouches de cellulose (125 ml) sont préalablement séchés à l'étuve à 103 °C et conservés dans un dessiccateur avant utilisation. 10 g d'isolat protéique sont introduits dans la cartouche en cellulose et 150 ml d'éther de pétrole sont déposés dans le ballon. L'éther de pétrole est chauffé à reflux pendant 5 heures. La quantité de lipides est déterminée après évaporation à l'évaporateur rotatif et séchage de l'échantillon à l'étuve à 50 °C pendant 24 heures. La teneur en lipide de l'isolat protéique est ensuite calculée selon l'équation II.4 :

$$\%\boldsymbol{Lip} = \frac{\mathbf{mb1-mb0}}{\mathbf{me}*\frac{\mathbf{\%\,MS}}{\mathbf{100}}} * \mathbf{100} \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\mathbf{(II.4)}$$

Lip : la teneur en lipides par rapport à la matière sèche de l'échantillon (%) ;
m_{b0} : la masse du ballon vide contenant quelques pierres ponce (g) ;
m_{b1} : la masse du ballon contenant quelques pierres ponce et l'extrait lipidique sec (g) ;
m_e : la masse de l'échantillon introduit dans la cartouche ;
% MS : le pourcentage de matière sèche de l'échantillon de départ.

Dosage des acides aminés

Les acides aminés ont été dosés par chromatographie en phase liquide (HPLC) après une hydrolyse **(Sathe et al., 1997)** suivie d'une dérivatisation **(Goamez-Alonso et al., 1997).** L'identification des temps de rétention de chaque acide aminé a été séparément réalisée à partir de solutions étalons pures dérivatisées de la même manière. La quantification a été réalisée à partir d'une gamme d'étalonnage d'une mixture de ces acides aminés (élimination de l'effet de matrice).

Hydrolyse des échantillons : 1 mg d'échantillon a été hydrolysé dans 1 ml d'une solution d'HCL (6 M, 110 °C, 24 heures). Les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) ont été dosés séparément; 1 mg d'échantillon a été oxydé dans 1 ml de solution (acide formique / eau oxygénée 9 :1, 20 h à 4 °C) avant l'hydrolyse acide (HCl 6 M, 110 °C, 24 h). Le tryptophane, a été dosé après une digestion alcaline (NaOH 4M, 110 °C, 24 h).

Dérivatisation : Une fois les échantillons hydrolysés, une dérivatisation au diethylethoxymethylene-malonate (DEEMM) a été réalisée. 1 ml de l'échantillon a été mélangé avec 1,75 ml de tampon de borate 1M pH 9, 750 µl de méthanol, 40 µl de standard interne (2.4.6 triméthylphénylamine hydrochloride à 2 mg/ml) et 30 µl de DEEMM. Le mélange a été agité rigoureusement puis mis 30 min dans un bain ultrason. Finalement le mélange a été incubé 2 h à 70 °C pour éliminer l'excès de DEEMM.

L'analyse des acides aminés a été réalisée dans un appareil de chromatographie liquide haute performance (HPLC, Varian ProStar) équipé d'un passeur automatique (ProStar 410), d'une colonne ACE C18-HL d'une granulométrie de 5µm (250 mm x 4,6 mm), d'un four pour colonne (thermostatée à 16 °C) et d'un détecteur à barrette d'iode (ProStar 330) réglé à 280, 269 et 300 nm. L'élution a été réalisée sous un gradient binaire, composé de phase A (25 mM d'acétate d'ammonium, pH 5.8 + 0,02 % d'azide de sodium) et de phase B (mélange acetonitrile : méthanol, 80 :20) avec un débit de 0,9 ml /min.

Tableau.II.1. Gradient d'élution pour la détermination des dérivés d'acides aminés par HPLC.

Temps (min)	0.0	20.0	30.5	33.5	65.0	73.0	78.0	82.0	85.0
Eluant A (%)	90	90	83	83	60	28	18	0	0
Eluant B (%)	10	10	17	17	40	72	82	100	100

Détermination de la quantité des thiols libres (S-H) et ponts disulfures (S-S)

La quantité de ponts disulfures (S-S) et celle des groupements thiols libres (S-H) a été mesurée suivant la méthode décrite par **Deng et al. (2011).**

Deux cent mg de protéines (Alb, Glob) ont été dissoutes dans 20 ml d'un tampon (Tris-Gly pH 8) composé de 8 M d'urée, 0.086 M Tris, 0.09 M glycine, 0.004 M EDTA. Après centrifugation (10 000 x g, 10 min) le surnageant a été récupéré.

La quantité de SH libre (SH_L) a été déterminée comme suit : 80 µl du réactif d'Ellman DTNB (Acide 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoique) à 4 mg / ml ont été ajoutés à 2 ml de surnageant et agités pendant 5 min puis l'absorbance des échantillons a été mesurée à 412 nm (le calcul est décrit dans l'équation 5). La quantité de SH totaux (SH_T) a été déterminée quant à elle comme suit : 2 ml du surnageant ont été solubilisés dans 0.024% de β-mercaptoéthanol, après 2 h d'incubation à température ambiante, 3 ml de TCA 12 % ont été ajouté. Après

centrifugation (10 000 x g, 10 min), le culot a été resuspendu trois fois de suite dans du TCA 12% puis dissout dans du Tris-glycine-EDTA (volume final de 2 ml). 80 µl de DTNB ont été ajouté et l'absorbance des échantillons a été mesurée à 412 nm après 5 min d'agitation. Les quantités des SH_L et SH_T ont été calculées à partir de l'équation II.5.

$$\mu mol\ SH/10^6\ \text{g de protéine} = \frac{73.53\ A}{C} * D \quad \text{..... (II.5)}$$

A : Absorbance à 412 nm ;

C : Concentration de l'échantillon en protéines (mg/ml) ;

D : Facteur de dilution ;

73.53 est le résultat du calcul de 10^6 / 1.36 * 10^4 ; où 10^6 est la conversion du mol au µmol/ml et 1.36 * 10^4 est le coefficient d'extinction molaire.

La quantité de S-S correspondante est à la moitié de la différence entre SH_T et SH_L (équation II.6).

$$\mu mol\ SS/10^6\ g\ de\ protéines = \frac{SHT - SHL}{2} \quad \text{..... (II.6)}$$

Electrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse a été réalisée selon **Laemmli 1970**. Les échantillons protéiques ont été préparés à raison de 10 µg/µl dans un tampon dans des conditions dénaturantes et réductrices (Tris-HCl 0.02 M, pH 8, 20 % (m/v) glycérol, 2 % sodium dodécyl sulfate (SDS) m/v, 0.002 % (m/v) bleu de bromophénol et 2% (m/v) dithiothreitol (DTT). Après chauffage pendant 10 min à 100 °C, les protéines ont été analysées dans un gel de polyacrylamide (16*18 cm) discontinu d'une concentration de 4 % (gel de concentration) et de 12 % (gel de séparation). Vingt microlitres d'échantillons ont été déposés dans chaque puit. La migration a été effectuée sous un courant constant de 20 mA par gel et à une tension de 40 V pendant 1 heure puis de 110 V le reste de la séparation. Les gels ont été ensuite introduits dans des solutions de fixation (TCA 15%) pendant 1 heure, coloration (0.25% bleu de Coomassie, 25% éthanol) pendant 6 heures, et décoloration (10% Acide acétique, 20% éthanol) 3 bains de 4 heures chacun et enfin conservés dans l'eau distillée jusqu'à l'analyse densitométrique. Les gels d'électrophorèses ont été scannés par Molecular Imager Gel Doc TM XR+ de BIORAD. L'analyse des bandes a été effectuée par le logiciel Image LabTM Software.

Analyse enthalpique différentielle (DSC : dynamic scanning calorimetry)

L'étude des propriétés thermiques des fractions Glob et Alb a été réalisée par MICRO DSC III SETARAM sur 0,5g de solutions protéiques préparées dans l'eau distillée à une concentration de 5% (m/m). Les échantillons ont été chauffés de 25 à 100 °C à raison de 1 °C/min.

Solubilité des protéines en fonction du pH et de la force ionique

Pour étudier l'effet du pH sur la solubilité des protéines en milieu aqueux, nous avons utilisé la méthode d'**Adebiyi et Aluko (2011).** Des dispersions à 1 % (m/m) de protéines ont été préparées en mélangeant 0.2 g d'isolat protéique avec 16 g d'eau distillée et agitées pendant 1 heure à température ambiante. Le pH a été ensuite ajusté à l'aide d'une solution de NaOH (0.1 M) ou de HCl (0.1 M) pour avoir une gamme de pH allant de 2 à 10. L'eau distillée a ensuite été ajoutée jusqu'à atteindre une masse de 20 g. Les mélanges ont été mis sous agitation d'une heure. La dispersion protéique a été centrifugée à 10 000 x g pendant 10 min à 4 °C. La teneur en protéine de la dispersion (surnageant) a été déterminée par la méthode de Kjeldahl. La solubilité est exprimée en gramme de protéines solubles pour 100 grammes de protéines totales.

Pour étudier l'effet de la force ionique sur la solubilité des protéines en milieux aqueux, des dispersions protéiques à 1 % (m/m) dans l'eau distillée et à différentes concentrations en NaCl ont été préparées et étudiée dans trois pH (2, 4.5, 8) comme décrit précédemment.

Concentration minimale de gélification thermique

La concentration minimale de gélification thermique (CMG_{ther}) des fractions protéiques Alb et Glob a été déterminée selon **Boye et al** (**2010).** Différentes quantités de protéines ont été mises dans des tubes contenant 5 ml d'eau distillée pour obtenir des concentrations allant de 2 à 20 % (m/m). Le mélange a été vortexé pendant 5 min et chauffé à 100 °C pendant 1 heure. Les tubes ont été refroidis durant la nuit à 4 °C. Pour évaluer la formation de gel, les tubes ont été retournés. La concentration minimale de gélification thermique est la concentration critique à partir de laquelle le gel formé ne coule pas.

Mesure de la turbidité

Ce paramètre consiste à suivre l'évolution de l'absorbance des différentes solutions protéiques (délipidées et non délipidées) à différentes concentrations (1, 2, 3, 4 et 5 %) par spectrophotométrie UV- visible à une longueur d'onde de 660 nm. Cette méthode permet d'évaluer l'influence des lipides sur la turbidité des solutions protéiques.

II.2.2. Caractérisation de l'enzyme

II.2.2.1. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la transglutaminase microbienne (MTGase) a été étudiée selon la méthode à l'hydroxamate de **Folk (1970)** reprise par **Gan et al., (2009).** Cette enzyme a été utilisée sous sa forme originale sans purification : 2 ml d'un mélange réactionnel contenant : 200 µl de solution de MTGase dans l'eau distillée (1% m/v), 1400 µl de tris-acétate à 100 mM (pH=6), 100 µl d'hydroxylamine à 2 M, 300 µl de CBZ-L-glutaminyl-glycine à 100 mM, a été préparé juste avant la réaction. Après incubation à 37 °C/10 min, la réaction a été arrêtée par l'ajout d'une solution stop (15 % TCA, 5 % $FeCl_3$ dans HCl 2,5 N). Le précipité a été éliminé par centrifugation (4000 x g, 15min) et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 525 nm. La courbe standard a été obtenue avec l'acide L-glutaminique-gamma–monohydroxamique. L'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la formation de 1µmol d'hydroxamate par minute à 37°C et pH 6.

II.2.2.2. Détermination du pH, température et force ionique optimums de la réaction enzymatique

La détermination du pH optimum a été réalisée par la mesure de l'activité enzymatique à 37 °C pendant 10 min dans différents tampons à pH allant de 3 à 10 par la méthode à l'hydroxamate décrite précédemment. La mesure de l'activité a été réalisée dans un mélange réactionnel (pH 6) pré-incubé 10 min à différentes températures (20 à 90 °C) avant l'ajout de la MTGase afin de déterminer la température optimale. L'influence de la force ionique sur l'activité enzymatique a été réalisée dans un mélange réactionnel à différentes concentrations de NaCl et ce pendant 10 min à pH 6 et 37 °C.

II.2.2.3. Influence du milieu (pH et température) sur la stabilité de l'enzyme

L'étude de la stabilité de l'enzyme pour chaque pH et températures en fonction du temps a été réalisée par la mesure de l'activité enzymatique résiduelle de solutions d'enzyme (1 mg/ml) pré-incubées respectivement dans différents pH à 37 °C et différentes température à pH 6.

II.2.3. Analyse statistique

Tous les essais ont été répétés au minimum trois fois. L'analyse de variance (ANOVA) des résultats a été réalisée par le logiciel XLSTAT Pro version 2013. Le test Fisher's a été appliqué avec un intervalle de confiance de 95%.

III. Résultats et discussion

III.1. Préparation et caractérisation des fractions protéiques

III.1.1. Méthode d'extraction

Rappelons que l'objectif de la thèse est à terme l'élaboration des microparticules à base de protéines de pois réticulées par voie enzymatique (MTGase) afin d'encapsuler des molécules actives. Avant d'arriver à l'application visée, le processus de gélification des protéines doit être bien maitrisé. Pour se faire, une importante quantité de protéines natives est nécessaire. En effet les hydrogels à base de protéines végétales sont généralement formés à partir d'une concentration protéique supérieure à 15% **(Shand et al., 2007 ; Heidebach et al., 2009)** et leur caractérisation met en jeu d'énorme quantité de protéines. Les isolats de protéines de pois disponibles sur le marché sont des globulines généralement dénaturées et ne peuvent pas être utilisées comme substrat pour cette étude. En outre, la fraction albumine de pois est manquante dans le processus de purification industrielle. Le recours à l'échelle préparative au laboratoire est donc nécessaire.

Au début de la thèse (mars 2012), le laboratoire disposait d'un système qui permettait l'extraction uniquement de la fraction Glob, mis en place dans le cadre de la thèse de J-L Mession (2012), avec une capacité de production de ~5 g de Glob par semaine et ce en partant de 60 g de farine de pois. Le procédé était basé sur la récupération de la fraction Glob par précipitation isoélectrique, où l'azote soluble à ce pH, dont la fraction Alb, est éliminé avec le surnageant. Le culot était remis en suspension à pH neutre puis la purification comprenait une ultrafiltration, une diafiltration et une lyophilisation. Deux problèmes majeur ont été constatés : (i) la perte de la fraction Alb et (ii) la faible capacité de production. Par conséquent, l'obtention de la matière première était devenue un facteur limitant et une nouvelle stratégie d'extraction s'est imposée.

Afin de pouvoir récupérer la fraction Alb, le procédé par précipitation isoélectrique a été remplacé par une extraction sélective et successive en fonction de la nature de solubilité de chaque fraction protéique (Crévieu et al., 1996). Dans un premier temps la fraction Alb a été extraite dans un tampon acétate à pH 4,9. Par la suite, la fraction Glob précipitée dans le culot, a été extraite dans un tampon phosphate pH 8 en présence de 5% de sulfate de potassium (Figure II.1).

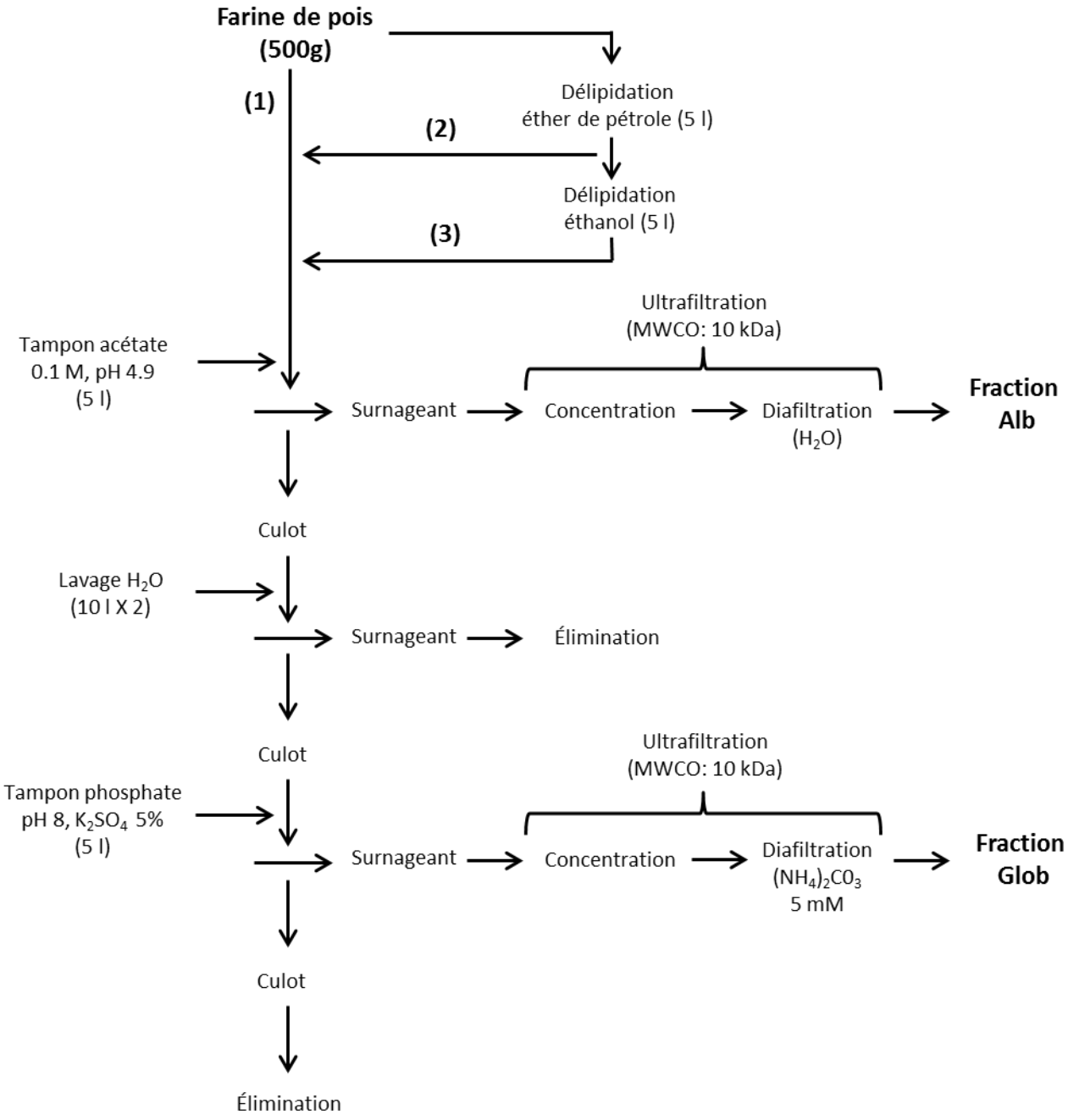


Figure.II.1. Schéma d'extraction des fractions albumines et globulines. (1) : sans délipidation ; (2) : délipidation avec éther de pétrole ; (3) : délipidation éther de pétrole + éthanol.

Dans le but d'améliorer la capacité de production, la surface de filtration a été augmentée de 0.01 m^2 à 0.11 m^2, taille maximale pour le support disponible, et le seuil de

coupure du poids moléculaire a été réduit de 100 kDa à 10 kDa pour mieux retenir les protéines notamment la fraction Alb.

En conformité avec les études précédentes menées au laboratoire sur les protéines de pois, une délipidation par solvants (éther de pétrole puis éthanol) a été opérée sur la farine de pois dans le but d'améliorer la qualité des isolats **(Mession et al., 2012)**.

III.1.2. Composition et rendement d'extraction des protéines

La farine de pois se compose de 91.4% de matière sèche dont 21.3 % sont des protéines. La composition en azote de chaque fraction est présentée dans le **Tableau II.2.** L'azote non protéique est calculé à partir de l'azote présent dans le surnageant des fractions albumine et globuline après précipitation au TCA. L'azote non soluble est déterminé par différence à partir de la teneur totale en protéines dans la farine et de la somme des fractions (albumine + globuline + azote non protéique). Les proportions calculées sont en accord avec la littérature **(Gueguen et barbot, 1988).**

Tableau.II.2. Composition de la farine de pois en fractions azotées.

	% dans l'azote total	
	Valeurs mesurées	**Gueguen et barbot (1988)**
Azote non protéique	14,85±0,32	20,2 (14,9-30,4)
Albumine	21,37±0,17	21,3 (12,3-28,9)
Globuline	46,64±0,74	58,9 (33,6-65,4)
Azote insoluble	17,14±0,48	20,5 (12,0-38,1)

Les rendements d'extraction des fractions Alb et Glob délipidées et non délipidées sont présentés dans le **Tableau II.3**. Les rendements calculés à partir de la poudre de pois non délipidée sont proches de ceux décrits dans la littérature (**Crévieu et al., 1996)**, à savoir : 63% pour la fraction Alb et 70% pour la fraction Glob.

Tableau.II.3. Rendement d'extraction des fractions d'albumines et de globulines.

		Non délipidée	**Délipidée à l'EP**	**Délipidée à l'EP + Eth**
Rendement d'extraction (%)	Albumines	60,4 ± 2,4	58,9 ± 3,6	47,9 ± 1,9
	Globulines	69,4 ± 1,4	80,9 ± 5,1	81,1 ± 4.8

EP : éther de pétrole ; Eth : éthanol.

La délipidation de la farine de pois diminue le rendement d'extraction de l'Alb. Cette diminution est plus marquée quand l'éthanol (Eth) est utilisé. Il se pourrait que ces pertes soient dues à une solubilité partielle de l'albumine dans l'alcool **(Jouvensal et al., 2003 ;**

Bérot et al., 2007). Par contre, la délipidation de la farine augmente le rendement d'extraction de la fraction Glob sans aucun effet notable de l'éthanol.

Tableau.II.4. Composition physico-chimique de la farine et des fractions albumines et globulines.

		H_2O %	Protéine* %	Lipide* %	Cendres* %	Carbohydrate* %
Farine de pois		8,6±0,2	21,3±1,1	2,5±0,1	2,9±0,1	73,4±2.1
Alb	Non délipidée	3,0±0,1	88,4±0,8	0,8±0,1	0,4±0,1	10,4±0,5
	Délipidée EP + Eth	3,5±0,1	89,7±0,7	0,3±0,1	0,4±0,1	9,6±0,2
Glob	Non délipidée	3,3±0,1	87,2±1,2	6,8±0,1	4,5±0,1	1,5±0,1
	Délipidée EP + Eth	3,5±0,2	93,4±1,0	0,8±0,1	4,7±0,1	1,1±0,1

* % calculé sur une base de matière sèche.

La composition des fractions purifiées d'albumine et de globuline est présentée dans le **Tableau II.4**. Les taux de protéines dans chaque fraction sont satisfaisants et augmentent avec la délipidation. Cette augmentation de teneur en protéines est plus marquée pour la globuline que pour l'albumine. Il est à noter qu'une extraction de la fraction Glob à partir d'une farine de pois non délipidée entraîne avec celles-ci des lipides qui s'enrichissent dans l'isolat obtenu et le contaminent **(Fuhrmeister et Meuser, 2003 ; Shand et al., 2007)**.

III.1.3. Effet de la délipidation sur la turbidité

La mesure de la turbidité à 660 nm des solutions protéiques d'albumine et de globuline, délipidées et non délipidées, à différentes concentrations est présentée sur les **Figures II.2 et II.3.**

Ces résultats montrent que la turbidité est proportionnelle à la concentration en protéine. A concentration égale, la turbidité est plus importante pour la fraction Glob que pour la fraction Alb. Ceci est dû à la teneur en lipides dans chaque fraction. En effet, dans tous les cas, avant ou après délipidation, la fraction Glob est plus riche en lipides que la fraction Alb (**Tableau II.4**); et la présence des lipides dans une solution protéique conduit à la formation d'une microémulsion augmentant ainsi la turbidité.

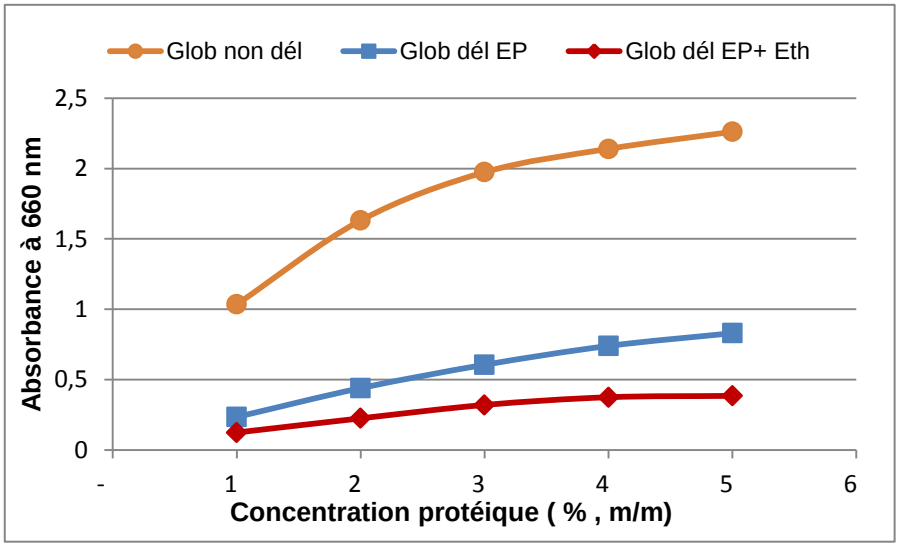


Figure.II.2. Effet de la délipidation sur la turbidité d'une solution de globulines à différentes concentrations. non dél : non délipidée ; EP : éther de pétrole ; Eth : éthanol.

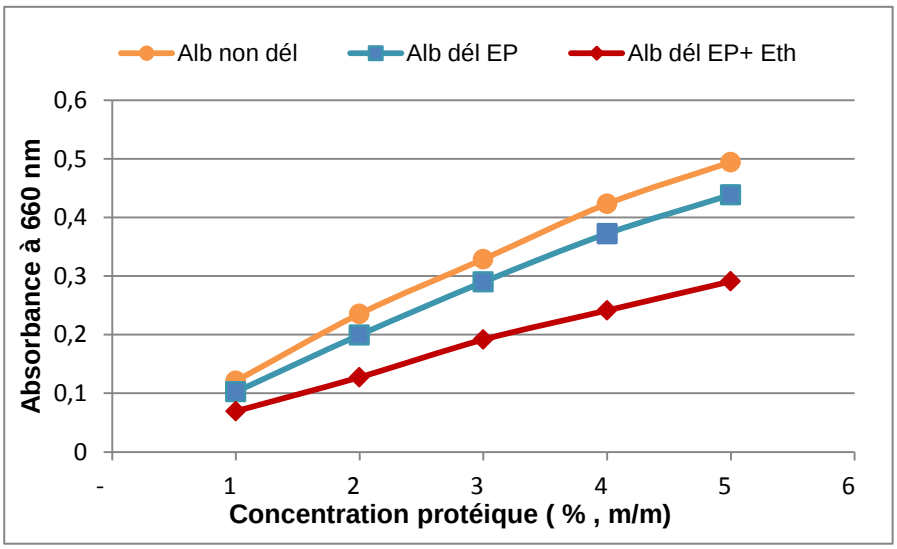


Figure II.3. Effet de la délipidation sur la turbidité d'une solution d'albumines à différentes concentrations. non dél : non délipidé ; EP : éther de pétrole ; Eth : éthanol.

III.1.4. Profils SDS-PAGE

Les différentes fractions de l'isolat protéique ont été séparées à l'aide d'un gel SDS-PAGE en condition dénaturante (SDS) et réductrice (DTT). La **Figure II.4** montre la composition des fractions d'Alb et Glob délipidées et non délipidées. Les pistes 1, 2 et 3 montrent des bandes allant de 70 à 15 kDa qui correspondent aux peptides caractéristiques des globulines de pois. Les globulines sont généralement classées 7S et 11S conformément à leur coefficient de sédimentation qui sont appelées, pour les pois, viciline et légumine

respectivement. Une troisième protéine présente en petite quantité est la conviciline (7S) avec une masse moléculaire de 290 kDa. La conviciline est un tétramère de 71 kDa **(Barac et al., 2010).**

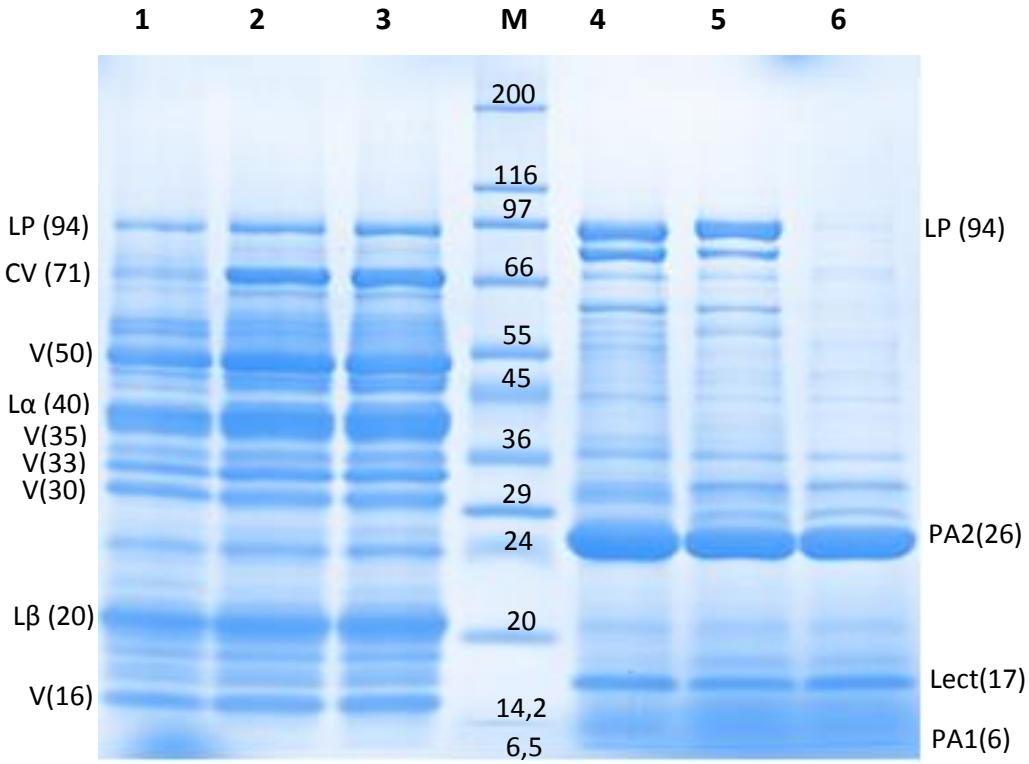


Figure II.4. Profil SDS-PAGE des fractions protéiques Alb et Glob délipidées et non délipidées en conditions dénaturantes (SDS+DTT). M : Marqueurs de masse molaire (kDa) ; 1 : Glob non délipidée ; 2 : Glob délipidée (EP) ; 3 : Glob délipidée (EP+ Eth) ; 4 : Alb non délipidée. 5 : Alb délipidée (EP) ; 6 : Alb délipidée (EP + Eth) ; LP : lipoxygénase ; CV : conviciline ; V : polypeptides de la viciline ; Lα : polypeptide acide de la légumine ; Lβ : polypeptide basique de la légumine ; PA2 : polypeptide albumine majoritaire ; Lect : lectine ; PA1 : polypeptide albumine minoritaire.

La légumine est une molécule plus grosse que la viciline avec une masse comprise entre 360 et 400 kDa contre 150 à 200 kDa pour la viciline **(Owusu-Ansah et Mc Curdy, 1991).** Elle est composée de 6 paires de sous unités hétérogènes, chaque sous unité comporte un polypeptide basique Lβ (~ 20 kDa) et un polypeptide acide Lα (~ 40 kDa) reliés entre eux par une liaison disulfure **(Croy et al., 1980a).** La viciline est une protéine plus hétérogène, elle comporte plus de 12 sous unités, les fragments les plus abondants sont 50 kDa suivi de 35, 33 et 30 kDa. Par contre 14 et 12 kDa sont les moins abondants. Il est admis que c'est un trimère de trois polypeptides de 50 kDa **(Croy et al., 1980b)**.

La fraction non délipidée contenant l'albumine (piste 4) montre aussi des bandes caractéristiques à cette fraction à savoir : la lipoxygénase (94 kDa), la fraction majoritaire PA2 (26 kDa), la lectine (17 kDa) ainsi que la fraction PA1 (6 kDa). En effet, L'albumine (2S) est composée principalement d'une fraction abondante PA2, qui est un homodimère de polypeptides de 26 kDa ou 25 kDa, et d'une petite fraction PA1 de 11 kDa composée de deux polypeptides de 6 kDa **(Gatehouse 1985).** Contrairement aux autres albumines (2S), les dimères PA1 et PA2 ne sont pas liées par des liaisons disulfures **(Le Gall et al., 2005).** La fraction albumine contient aussi la lectine, inhibiteur de protéase et la lipoxygénase **(Le Gall et al., 2007).**

La délipidation de la fraction globuline ne semble pas avoir un effet sur le profil protéique. Néanmoins, l'intensité des bandes est plus prononcée pour les globulines délipidées résultant d'une augmentation de la concentration en protéine. En effet, la composition des globulines en lipides et protéines passe respectivement de 7 % et 87 % à 1 % et 93 % après délipidation (**Tableau II.4**). Par contre, le profil protéique de l'albumine délipidée successivement avec de l'éther de pétrole et de l'éthanol (Piste 6) subit un changement remarquable non constaté après délipidation uniquement avec de l'éther de pétrole (piste 5). En effet, la bande caractéristique de la lipoxygénase (94 kDa) disparait complétement du profil électrophorétique rendant compte sur une meilleure purification, contrairement à la lectine (17 kDa) qui n'a pas été influencée par cette délipidation.

L'analyse densitométrique des profils SDS-PAGE de la fraction Alb délipidée a révélé une composition de 70% PA2, 10% lectine, 5% PA1 et 15% de vicilines soluble dans l'eau. Tandis que la fraction Glob délipidée estcomposée de 65% de viciline, 25% de légumine et 10% de conviciline. La composition de la Glob est en accord avec la littérature **(Gueguen et barbot, 1988).**

III.1.5. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés des fractions albumines et globulines est donnée dans le **Tableau II.5**. La fraction Alb contient des quantités d'acides aminés essentiels (lysine, tryptophane, thréonine, cystéine et la méthionine) plus importantes que dans la fraction Glob.

Par contre la globuline est plus riche en arginine, phénylalanine, leucine et isoleucine. Ces résultats sont très proches à ceux obtenus par **Bhatty (1982)**. Cette composition notamment en acides aminés soufrés, procure à l'albumine une meilleure qualité nutritionnelle. La composition en acides aminés impliqués dans la réaction enzymatique catalysée par de la MTGase, lysine et glutamine, sont respectivement 8.4 % et 14.3 % pour la fraction Alb et 7.1% et 17.5% pour la fraction Glob.

Tableau.II.5. Composition en acides aminés (%, g/100g protéines) des fractions albumines et globulines.

Acides aminés	**Graine ***	**Albumines**	**Globulines**
Essentiel			
Thréonine	3.4 - 6.8	5.2	3.4
Valine	4.1 - 7.0	4.7	4.2
Méthionine	0.6 - 2.8	1.3	0.9
Cystéine	0.2 - 3.5	3.2	0.9
Isoleucine	3.2 - 6.2	3.9	4.1
leucine	6.6 - 10.9	4.6	9.1
Tyrosine	2.6 - 5.5	4.0	3.5
Phénylalanine	4.2 - 6.9	4.4	5.9
Lysine	6.2 - 12.3	8.4	7.1
Histidine	2.2 - 4.6	2.1	2.4
Arginine	6.2 - 14.9	4.9	10.2
Tryptophane	0.7 - 1.9	1.7	0.7
Non essentiel			
Proline	3.5 - 6.0		
Acide aspartique	10.6 - 18.9	12.4	14.2
Serine	4.5 - 7.8	5.4	6.3
Acide glutamique	15.0 - 27.9	14.3	17.5
Glycine	3.6 - 7.3	5.1	4.5
alanine	3.9 - 7.4	6.4	4.1

* **Savage et Deo (1976)**

En comparant ces compositions avec celle des protéines de soja, 6.25% de lysine et 18.83% de glutamine **(Karr-Lilienthal, et al., 2005)**, qui sont jugées comme de bons substrats pour la MTGase, les fractions Alb et Glob de pois constituent donc d'excellents candidats pour la réticulation enzymatique.

III.1.6. Composition en S-S et S-H

La composition des fractions Alb et Glob en thiols libres (SH) ainsi qu'en ponts disulfures (S-S) sont présenté dans le **Tableau II.6**. Les résultats montrent des concentrations en soufre plus élevées dans la fraction Alb que dans la fraction Glob. Ceci est dû à la composition de ces fractions en cystéine (acide aminés soufrés).

Tableau.II.6. Teneurs en ponts disulfures (SS) et en groupements (SH) dans les fractions purifiées d'albumines et de globulines.

	Albumines	**Globulines**
S-H libre µmol/g protéine	5,8±0,2	1,3±0,1
S-H totaux µmol/g protéine	99,1±2,4	13,9±1,0
S-S µmol/g protéine	46,7±1,9	6,3±0,7

III.1.7. Propriétés thermiques des fractions Alb et Golb

Les thermogrammes des fractions Glob et Alb obtenues par analyse enthalpique différentielle (micro-DSC) sont présentés dans les **Figures II.5 et II.6**. Les propriétés thermiques sont regroupées dans le **Tableau II.7**.

Pour la fraction Alb, deux pics endothermiques ont été observés. Le premier pic (T_d = 58.05 °C) correspond à la température de dénaturation des polypeptides de l'albumine composés principalement de PA2 (70%). Tandis que le deuxième pic (T_d = 76.77 °C) correspond à la température de dénaturation des contaminations de vicilines solubles dans cette fraction qui sont mis en évidence dans le profil SDS-PAGE (**Figure II.3**). **Cserhalmi et al., (1998)** ont observés, pour la fraction Alb de cinq variétés de pois, un seul pic exothermique dans le même ordre de grandeur que notre premier pic (60 °C). Ceci est peut être dû à leur méthode d'extraction qui limite les contaminations croisées.

Tableau.II.7 : Propriétés thermiques des fractions protéiques préparées.

Echantillons		**T_{onset} (°C)**	**T_d (°C)**	**ΔH_d (J/g prot)**
Albumines	Pic 1	50,6±0,6	58,1±0,2	8,2±0,3
	Pic 2	71,5±1,2	76,8±0,7	1,4±0,1
Globulines	Pic 1	62,6±0,7	75,8±0,4	17,1±0,2

T_{onset}(°C) : température de début de dénaturation ; T_d : température de dénaturation ; ΔH_d (J/g de protéine) : enthalpie de dénaturation

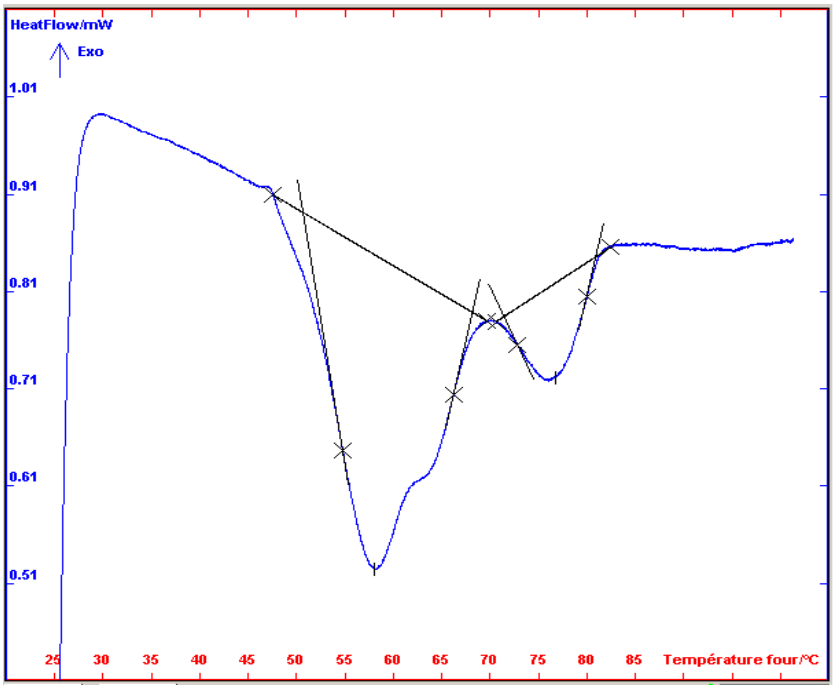


Figure.II.5. Thermogramme de la fraction Albumine 5% (m/m) chauffée à 1 °C/min.

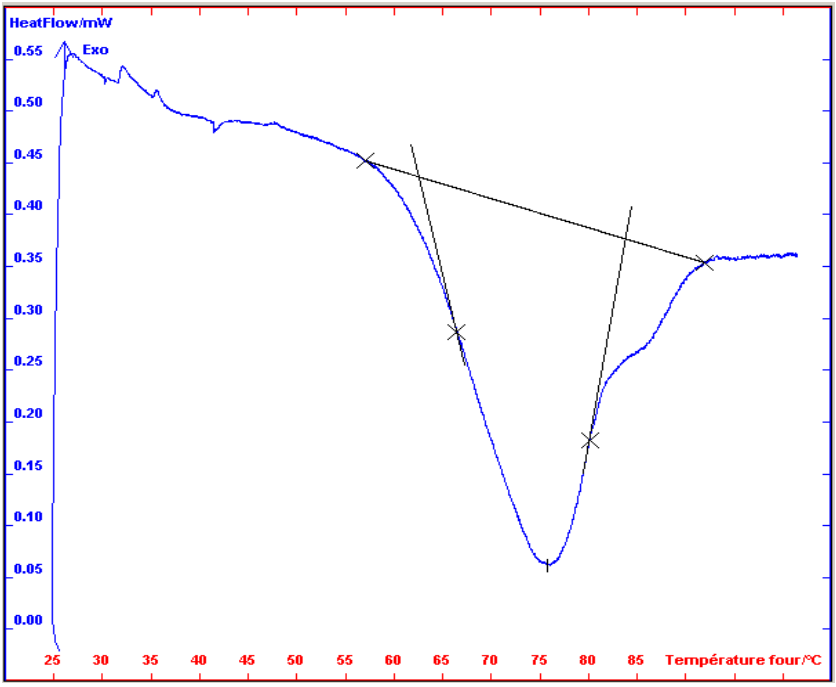


Figure.II.6. Thermogramme de la fraction Globuline 5% (m/m) chauffée à 1 °C/min.

Dans le cas de la Glob, une seule transition endothermique relativement large, avec un chevauchement de deux pics, a été notée pour une valeur de T_d de ≈75.81 °C. Ce chevauchement correspondant à la dénaturation simultanée dans le même domaine de températures des fractions viciline et légumine **(Mession et al., 2012)**. Un pic endothermique

majeur reflète une dénaturation coopérative, du fait que les différents niveaux de structure et les domaines conformationnels sont maintenus par des forces interdépendantes, en particulier chez les légumines. La dénaturation est irréversible, du fait de l'absence d'une transition lors d'un nouveau chauffage de l'échantillon (résultats non montrés).

Une température de dénaturation élevée supérieure à 80 °C a été rapportée pour la plupart des globulines de légumineuses, du fait de leur structure particulièrement compacte difficile à déplier **(Marcone et al., 1998)**. Dans notre cas, la température de dénaturation de la fraction Glob (75.81 °C) est inférieure à celle reportée par **Shand et al., 2007** (85.1 °C), **Sun et al., 2010** (86.21 °C) et **Mession et al., 2012** (87.6 °C). Ceci est probablement dû aux conditions opératoires de la mesure, avec un chauffage de 1 °C/min dans notre étude contre 10 °C/min dans les études précédentes.

La valeur d'enthalpie de dénaturation du premier pic de la fraction Alb (8.15 J/g prot) est dans le même ordre de grandeur que celle obtenue (~7 J/g prot) par **Cserhalmi et al., (1998).** La valeur d'enthalpie du deuxième pic de la fraction Alb (1.39 J/g prot) est relativement faible indiquant une faible concentration de ces contaminants de vicilines.

La valeur d'enthalpie de dénaturation de la fraction Glob est dans le même ordre de grandeur que celles obtenues par **Sun et al. (2010)** et **Mession et al. (2012)**, mais plus élevée que celle obtenue par **Shand et al. (2007)**. L'isolat protéique utilisé dans le dernier cas a été préparé avec une précipitation acide utilisant des fortes concentrations (1M) d'HCl et NaOH affectant ainsi le degré de dénaturation de la Glob.

III.1.8. Concentration minimale de gélification thermique

La gélification thermique des protéines est un processus complexe impliquant plusieurs étapes allant de la dénaturation, puis de l'agrégation jusqu'à la formation d'un réseau tridimensionnel si les conditions sont réunies. Une valeur faible de la concentration minimale de gélification (CMG_{ther}) reflète de bonnes propriétés gélifiantes. Dans notre étude, les CMG_{ther} de la fraction Alb et de la fraction Glob sont respectivement 4.5 et 12%. L'albumine de par sa richesse en cystéine (**Tableau II.5 et II.6**) a la capacité de former un gel stabilisé par des liaisons covalentes de type S-S. **O'Kane et al. (2005)** ont reporté une CMG_{ther} de 16 % (m/m) pour des Glob de pois préparées par précipitation isoélectrique et composées de 20‑28% de légumine et de 61‑67% de viciline. Cette différence de CMG_{ther}

avec nos résultats (12%, w/w), dans les mêmes conditions de pH et force ionique, peut être due au mode d'extraction appliqué par ces auteurs qui dénature partiellement les protéines réduisant ainsi leurs propriétés fonctionnelles.

III.1.9. Solubilité des fractions Alb et Glob en fonction du pH et de la force ionique

Une bonne solubilité des protéines est une propriété physicochimique très recherchée en industrie agroalimentaire. Elle peut offrir un avantage d'une distribution homogène des protéines dans la matrice alimentaire affectant ainsi la texture et les propriétés organoleptiques du produit fini. Dans le cas des gels protéiques formés par réticulation enzymatique, le niveau d'hydratation et de solubilité des protéines, surtout pour les conformations globulaires avec une structure compacte comme celle des protéines de pois, peut limiter l'accessibilité de la MTGase aux résidus glutamine et lysine pour catalyser la réaction enzymatique **(De Jong et Koppelman., 2002)**.

La solubilité des protéines est gouvernée par les interactions protéine-protéine et protéine-solvant conduisant respectivement soit à une précipitation, soit à une solubilité des protéines **(Damodaran, 1996)**. Les deux types d'interaction sont influencées par l'environnement comme le pH et la force ionique **(Deng et al., 2011)**, par la méthode d'extraction **(Boye et al., 2010; Papalamprou et al., 2009)**, par le procédé de séchage **(Gueguen, 1983)**, par la composition en acides aminés (résidus hydrophiles et hydrophobes) ainsi que leur distribution dans la surface de la protéine **(Kimura et al., 2008)**. Dans cette étude, la solubilité des fractions Alb et Glob a été étudiée en fonction du pH (en absence de sel) et de la force ionique (à pH 7).

La **Figure II.7** montre l'évolution de la solubilité des fractions protéiques Alb et Glob en fonction du pH. La solubilité de la globuline passe par un minimum entre 4 et 5 ce qui correspond au passage du point isoélectrique pI~4.8 **(Gueguen et al., 1988).** En dehors de cet intervalle, la solubilité augmente et atteint respectivement des valeurs de l'ordre de 75 % et de 85% pour les pH inférieurs à 3 et supérieurs à 7. Par contre, la fraction Alb présente un meilleur profil de solubilité par rapport à la fraction Glob. En effet l'albumine reste pratiquement totalement soluble sur toute la gamme de pH étudiée même pour le pI- 5.

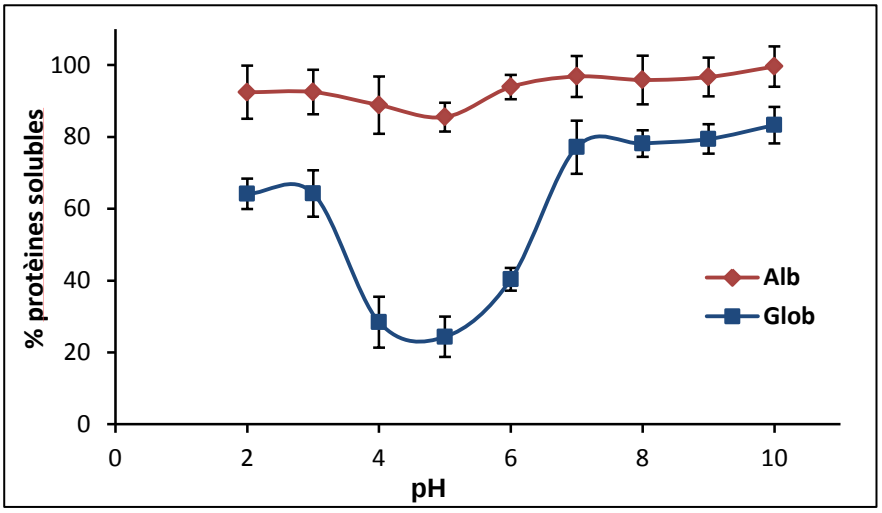


Figure.II.7. Solubilité des fractions albumines et globulines en fonction du pH dans l'eau distillée.

Cette solubilité élevée est liée à la nature hydrophile des albumines de pois comme montré par sa séquence d'acides aminés **(Croy et al., 1984)** et sa faible hydrophobicité de surface **(Cserhalmi et al., 1998)**, conformément au classement « soluble dans l'eau » selon **Osborne (1924)**. Ce profil de solubilité est similaire à celui observé pour la fraction albumine de pois jaune **(Adebiyi et Aluko., 2011)** et de tournesol **(Pérez et al., 2005)**. Cependant, les albumines de Parkia biglobosa **(Lawal et al., 2005)** et l'albumine de Ginkgo biloba **(Deng et al., 2011)** présentent une solubilité minimale à pH 5.

Par contre, la fraction Glob présente un profil en forme de « U » caractérisé par une solubilité élevée aux pH acide (65%) et alcalin (80%), et une solubilité minimale (25%) près du point isoélectrique (pH 4-6). Ce profil de globulines de pois est similaire à celui constaté par **Message et al., (2012)** ainsi que d'autres profils de protéines de légumineuses comme les pois chiches et les lentilles **(Boye et al., 2010)** avec un minimum de solubilité au voisinage du pI. Cette dépendance peut être liée à sa nature de solubilité dans des tampons salins. Ce comportement de solubilité des globulines est attribué à la charge nette de la protéine. Au pI la protéine possède autant de charges positives que négatives, qui favorisent l'affinité et l'interaction entre protéine-protéine au détriment de protéine-solvant minimisant ainsi la solubilité. Pour les pH acide et basique, la protéine est respectivement chargée positivement et négativement. Cette grande charge nette augmente les forces de répulsions favorisant ainsi l'interaction protéine-solvant qui se traduit par une meilleure solubilité. La solubilité de la fraction Glob aux pH acides ≤ 3 (65%) est inférieure à celle aux pH alcalins ≥8 (80%). Cela

peut être dû à la dénaturation partielle des protéines aux pH acides suite à la protonation des groupes carboxyles **(Lakemond et al., 2000)**.

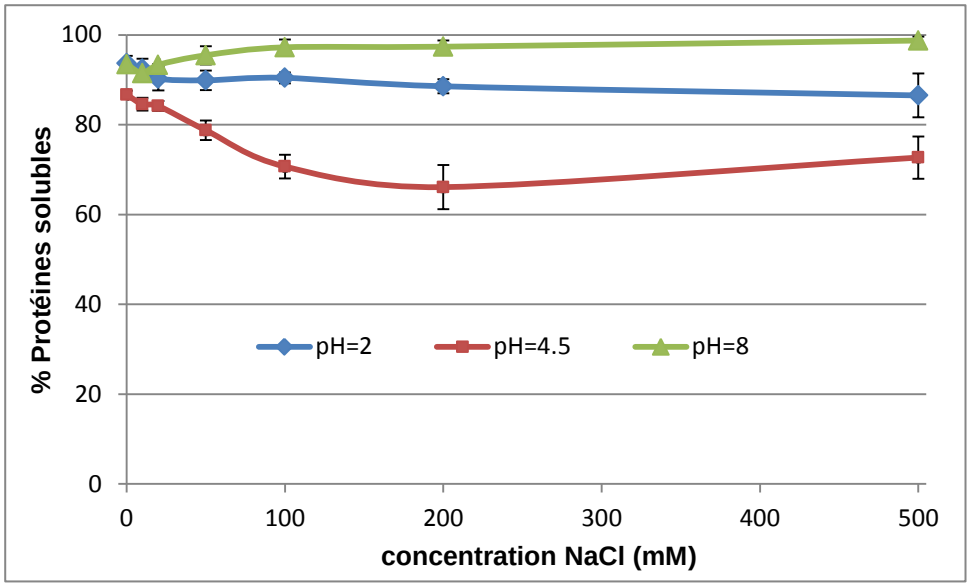


Figure.II.8. Solubilité de la fraction Alb en fonction de la force ionique à différents pH.

La Figure II.8 montre le profil de solubilité de la fraction Alb en fonction de la force ionique à différents pH. Pour les pH 2 et 8, l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu n'a pas d'effet remarquable, puisque cette protéine est naturellement soluble dans l'eau. À pH 4.5, voisin du pI de la protéine, une légère diminution de la solubilité est constatée en fonction de la force ionique. Ce comportement est peut être dû à un effet synergique entre le pI et l'effet salting-out.

La **Figure II.9** montre l'effet de la force ionique sur la solubilité de la fraction Glob à différents pH. Dans la gamme de pH étudiée (2, 4.5, 8), un effet de salting-in a lieu aux faibles forces ioniques qui se traduit par une légère augmentation de la solubilité due à la dissociation des protéines agrégées. Au-delà de 50 mM, une légère baisse de solubilité est constatée. Ce comportement pourrait être dû au masquage des charges positives par les ions Cl- (pH 2) et des charges négatives par les ions Na+ (pH 8), ce qui entrainerait la diminution des forces répulsives réduisant ainsi la solubilité **(Deng et al., 2011 ; Kinsella, 1979)**. Il pourrait aussi provenir d'un effet de déshydratation (Salting out) conduisant à l'agrégation partielle des protéines, réduisant ainsi la solubilité **(Damodaran, 1996)**.

La solubilité des protéines relativement élevée, notamment pour la fraction Glob (80% aux pH alcalins), pourrait être liée aux procédés d'extraction (ultrafiltration) et de séchage

(lyophilisation) des protéines utilisés dans ce travail réduisant ainsi leur dénaturation **(Boye et al., 2010 ; Tian et al., 1999).**

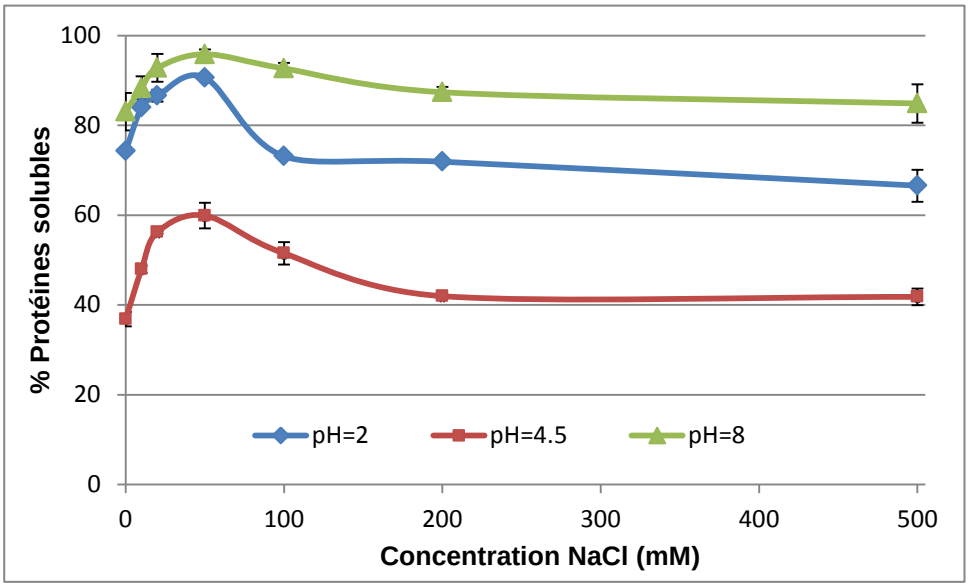


Figure II.9. Solubilité de la fraction Glob en fonction de la force ionique à différents pH.

III.2. Caractérisation de la MTGase

III.2.1. Activité enzymatique

Afin étudier le comportement des protéines de pois vis-à-vis du traitement enzymatique à la MTGase, il est essentiel de déterminer les conditions où l'activité enzymatique est maximale. Dans cette optique, nous avons d'abord exploré l'effet de la température, du pH et la force ionique sur l'activité enzymatique pendant 10 minutes de réaction selon la procédure à l'hydroxamate **(Folk, 1970)**, puis nous avons étudié la stabilité de l'enzyme à différents pH et températures en fonction du temps (5h).

III.2.2. Conditions optimales de l'activité enzymatique

La **Figure II.10a** présente l'influence de la température sur l'activité enzymatique de la MTGase. Une faible activité (20%) est exprimée pour les basses températures (≤ 30 °C). Au-delà de cette température, l'activité augmente très rapidement ; elle dépasse les 60% à 40 °C et atteint son maximum (100 %) à 55 °C. A 60 °C, elle reste très active (80 %) mais elle diminue brutalement (< 20 %) à 70 °C et perd complètement son activité à 80 °C.

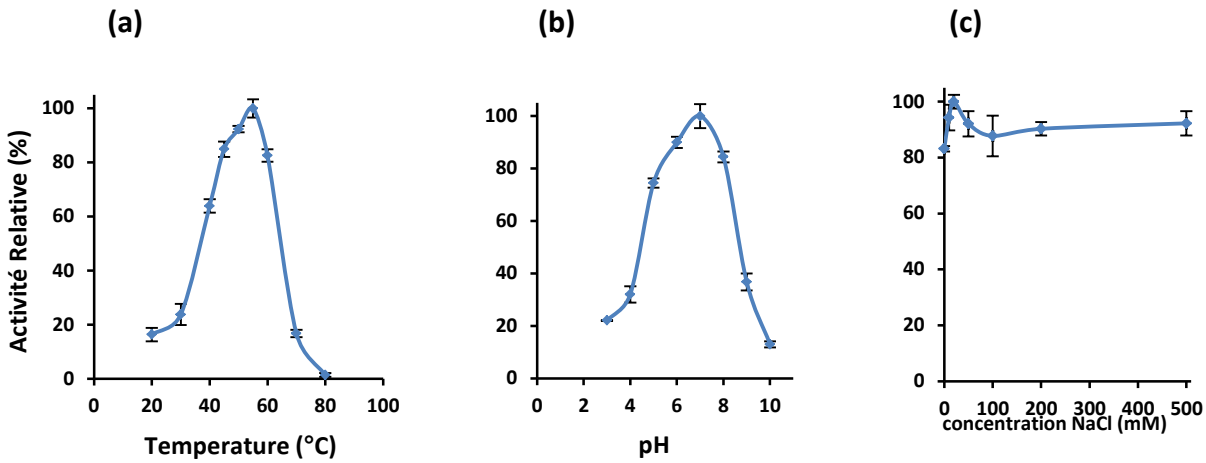


Figure.II.10. Influence du milieu sur l'activité enzymatique. (a) : la température à pH 6 dans l'eau distillée ; (b) : le pH à 37 °C dans l'eau distillée ; (c) : la force ionique à pH 6 et 37 °C.

L'influence du pH sur l'activité enzymatique est présentée dans la **Figure II.10b**. Le même profil que la température est observé (courbe en forme de cloche, **Figure II.10a**) avec des valeurs de pH optimales comprises entre 5 et 8. Ces profils sont similaires à ceux observés par **Umezawa et al., (2002).**

L'influence de la force ionique est montrée dans la **Figure II.10c**. Une légère augmentation de l'activité est observée pour les faibles teneurs en NaCl pour atteindre son maximum (100%) à 20 mM. Au-delà, l'activité diminue et se stabilise aux alentours de 90%. Il semble que la présence de sel n'a pas d'effet significatif sur l'activité enzymatique. De ce fait, l'optimum de la concentration en NaCl dépendra uniquement de la solubilité de la protéine.

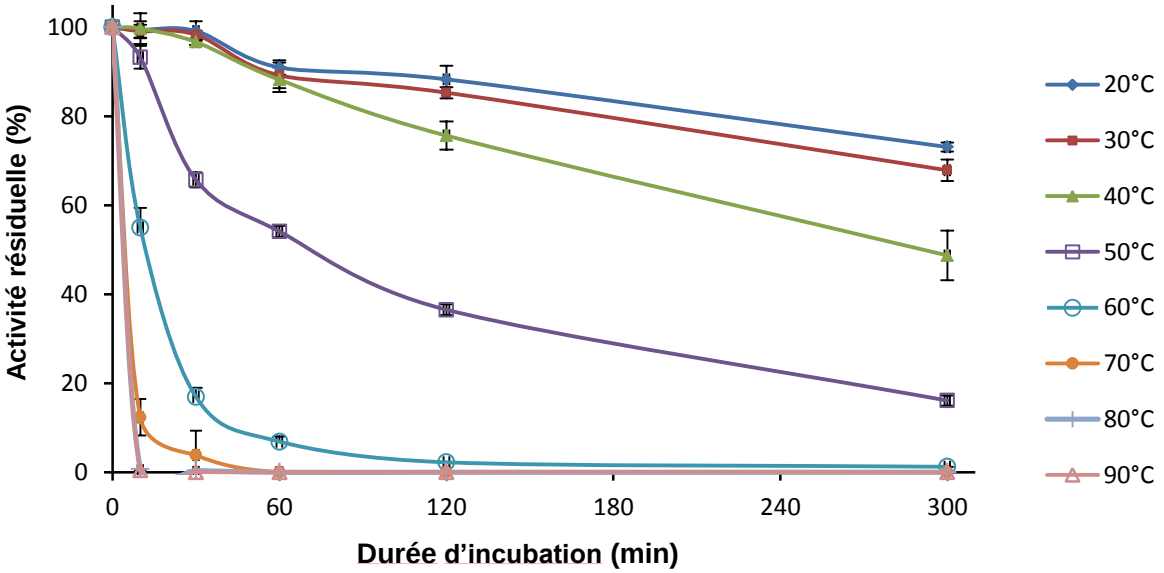


Figure.II.11. Stabilité de la MTGase en fonction de la température à pH 6.

En raison de la forte dépendance vis-à-vis du temps de la réaction enzymatique, nécessitant généralement plus de 90 min d'incubation **(Shand et al., 2008 ; Rossa et al., 2011)**, la stabilité de l'enzyme à différentes températures et à différents pH a été étudiée sur un intervalle de temps de 5h.

La **Figure II.11** montre la stabilité de l'enzyme à pH6 dans une gamme de température de 20 à 90 °C. Il est clair que pour les températures 20, 30 et 40 °C, la MTGase garde son activité complète après 30 min d'incubation, elle diminue légèrement à 88, 85 et 75% respectivement après 2 heures et reste au-dessus de 50% après 5 heures d'incubation. A 50 °C l'activité diminue sensiblement pour atteindre 35% et 15% respectivement après 2 heures et 5 heures. Pour les températures 60 et 70 °C, l'activité chute brutalement et pratiquement s'annule après une heure d'incubation. Tandis qu'à 80 °C et plus, l'enzyme est totalement désactivée dès 10 min d'incubation. En combinant ces résultats, il semble que la température 40 °C est un bon compromis entre la stabilité et une activité élevée.

De même, la **Figure II.12** montre que la MTGase dans l'intervalle de pH optimaux, $5 \leq pH \leq 8$, est relativement stable dans le temps. Elle garde une activité supérieure à 70% et 50% respectivement après 2h et 5h d'incubation. Cependant, le pH 5 est exclu de notre étude étant donné que la globuline est partiellement insoluble à ce pH (pI). Les pH 6, 7 et 8 sont maintenus pour le reste de notre étude.

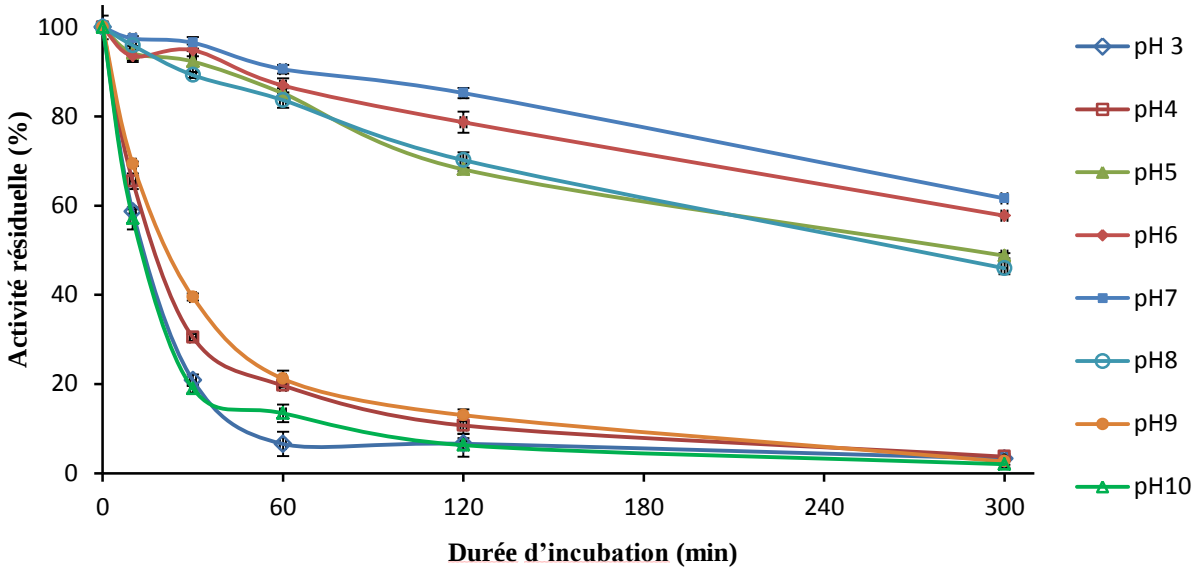


Figure II.12. Stabilité de la MTGase en fonction du pH à 37°C.

Aux pH les plus acides (pH ≤ 4) et les plus alcalins (pH ≥ 9) l'activité diminue brutalement. Ce comportement peut être expliqué en termes de protonation et déprotonation du site actif de l'enzyme (cystéine) à pH faible et élevé, respectivement, ou en raison de la perturbation de la conformation du site actif résultant de la dénaturation de l'enzyme par le pH ou l'effet thermique (**Eissa et al., 2004**).

IV. Conclusion du chapitre

L'extraction des fractions protéiques, à partir de 500 g de farine délipidée et non délipidée, a permis d'obtenir respectivement 10.9 g et 13.75 g de fraction albumine et 40 g et 34.45 g de fraction globuline. La délipidation a permis d'avoir des fractions protéiques plus riches en protéines et plus pures (élimination de la lipoxygénase) avec un rendement élevé mais aussi des solutions protéiques limpides.

Contrairement à la globuline, l'albumine présente une excellente solubilité dans l'eau et n'est influencée ni par le pH ni par la force ionique. La globuline présente un profil de solubilité en U avec un minimum entre pH 4 et 6.

La composition des fractions protéiques de pois notamment en acides aminés soufrés, procure à l'albumine de meilleures propriétés gélifiantes thermiquement ainsi que des meilleures qualités nutritionnelles par rapport à la globuline.

Les caractéristiques des fractions Alb et Glob de pois, notamment leur composition en résidus glutamine et lysine, conforte leur utilisation en tant que substrats pour la MTGase.

Sur la base des résultats de la solubilité des protéines et de l'activité enzymatique, les paramètres sélectionnés pour les protéines de pois et l'activité de la MTGase sont : 40 °C, NaCl 20 mM et un pH compris entre 6 et 8. Les températures supérieures à 40 °C et le pH en dehors de la plage sélectionnée n'ont pas été retenus en raison de la dégradation rapide de l'activité enzymatique dans ces conditions. Le pH 5 a également été exclu en raison de la mauvaise solubilité des globulines, alors que, 20 mM de NaCl a été l'optimum tant pour la solubilité des protéines que pour l'activité enzymatique.

Chapitre III : Mise en place des méthodes de suivi de la réticulation enzymatique

I. Introduction

La transglutaminase microbienne (MTGase) est une enzyme souvent utilisée en agroalimentaire dans le but de modifier la texture des aliments mais aussi pour améliorer les propriétés techno-fonctionnelles des protéines. Il s'agit de catalyser la formation d'une liaison covalente entre un groupe gamma-carboxamide de la glutamine (donneur) et un groupe amine libre (accepteur) **(Griffin et al., 2002).** Dans le cas des protéines, la lysine réagit comme accepteur et produit le fragment ε-(γ-glutamine)-lysine et l'ammoniaque conduisant à la formation d'un réseau tridimensionnel pouvant notamment jouer le rôle d'un support encapsulant pour molécules actives **(Cho et al., 2003 ; Elzoghby et al., 2011).** La quantité formée de ce fragment rend compte du rendement total de réticulation des protéines (**Sakamoto et al., 1995 ; Schäfer et al., 2005**).

Cette liaison peut être de type inter et/ou intramoléculaire. Les liaisons intermoléculaires se forment entre deux protéines ou plus et conduisent à la formation de polymères de hauts poids moléculaires, ce qui se traduit par une agrégation ou une gélification. Les liaisons intramoléculaires se forment au sein de la même protéine réduisant ainsi la taille hydrodynamique de celle-ci. Les deux types de liaisons ont fait l'objet d'études notamment par électrophorèse **(Basman et al., 2002)** et/ou HPLC **(Anouradha et Prakash, 2009)** qui sont des outils performants pour visualiser les interactions intermoléculaires. Cependant, les liaisons intramoléculaires semblent plus difficiles à caractériser et n'ont pas été beaucoup étudiées **(De Jong et Koppelman, 2002)**. En effet, les deux types de liaisons se forment simultanément et le changement dans la taille hydrodynamique d'une même protéine est négligeable par rapport à la taille de l'agrégat formé.

Les méthodes de suivi de la réticulation peuvent être classées en méthodes directes ou indirectes. Les méthodes directes consistent à doser directement les produits de réaction à savoir l'ammoniaque ou le fragment ε-(γ-glutamine)-lysine (Gln-Lys). Le dosage de l'ammoniaque **(Sharma et al., 2001)** n'est pas une méthode fiable car il peut être produit par d'autres réactions simultanées (hydrolyse et/ou transamidation) à la réaction recherchée (réticulation des protéines). Le dosage du fragment ε-(γ-glutamine)-lysine est la méthode la plus précise rendant compte de la réaction catalysée par la transglutaminase. Cependant, la technique utilisée est très lourde : une digestion enzymatique pendant 6 jours suivie d'une dérivatisation, et enfin une analyse par HPLC **(Sakamoto et al., 1995 ; Schäfer et al., 2005)**.

Les méthodes de dosage indirectes sont plus rapides que les méthodes directes. Parmi celles-ci, on distingue l'électrophorèse **(Basman et al., 2002)**, la rhéologie **(Sun et Arntfield, 2011)**, l'HPLC d'exclusion de taille **(Anouradha et al., 2009)** et les méthodes spectroscopiques à l'OPA **(Dinnella et al., 2002)** et au TNBS **(Gan et al., 2009)**. En effet, la réticulation enzymatique via les interactions intra- et intermoléculaires conduit à la formation de molécules de haut poids moléculaire, ce qui induit des changements dans les propriétés rhéologiques (viscosité, élasticité, dureté…) ainsi que dans les profils électrophorétiques (disparition et/ou apparition de bandes) et chromatographiques (monomères, dimères jusqu'à polymères), rendant compte d'un effet global de réticulation. Les méthodes spectroscopiques à l'OPA et TNBS permettent de contrôler l'évolution des groupements amines libres au cours de la réticulation et de calculer ainsi le degré de réticulation.

Toutes ces méthodes de suivi de réaction enzymatique qu'elles soient directes ou indirectes semblent complémentaires et leur combinaison permet une bonne compréhension du processus de réticulation. Cependant, ces méthodes se limitent à visualiser uniquement l'effet global (apparent) engendré par la réticulation enzymatique via les liaisons intra- et intermoléculaire. Ces méthodes sont incapables de distinguer l'effet de chacun des types de liaisons sur les propriétés du réseau formé, notamment les liaisons intramoléculaires. Dans le cas de l'encapsulation, analyser finement la contribution des liaisons intra- et intermoléculaire apparait capital vis-à-vis la rétention et la libération des molécules encapsulées au cours du stockage, du passage en bouche ou dans le tractus gastro-intestinal.

L'objectif de ce chapitre est de mettre en place des méthodes analytiques qui permettent une bonne compréhension du comportement des fractions Glob et Alb, vis-à-vis de la réaction enzymatique.

Le travail consistera dans un premier temps à examiner les méthodes fréquemment utilisées pour caractériser la cinétique de la réticulation enzymatique, à savoir : l'électrophorèse, les méthodes spectrophotométriques et l'HPLC, dans l'objectif de faire ressortir les points forts et les limites de chaque méthode.

Dans un second temps, nous développerons deux nouvelles méthodes afin de combler les limites constatées avec les méthodes classiques. Il s'agira d'abord d'utiliser la RMN du proton comme une alternative à l'HPLC-MS et ce sur un système modèle composé de N-carbobenzoxy-l-glutamyl-glycine (CBZ-Gln-Gly) et N-α-acétyle-lysine respectivement

comme substrat donneur et accepteur (ce travail a fait l'objet d'un article (**Djoullah et al., 2015)** publié dans le journal *« Colloids and surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*»).

D'autre part, la formation des liaisons intramoléculaires sera suivie par des techniques de mesure de taille (électrophorèse et diffusion dynamique de la lumière) en faisant varier la concentration des échantillons traités avec la transglutaminase. Ce dernier travail a fait l'objet d'un article soumis dans le journal «*Food Chemistry*».

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. La farine de pois

La farine de pois utilisée a été fournie par la société Roquette Frères (Lesterm France). C'est une farine issue d'un mélange de plusieurs variétés.

II.1.2. MTGase

La transglutaminase microbienne (MTGase) a été fournie par la société Ajinomoto Foods Europe SAS, France (Activia® WM). Elle est dérivée de l'espèce *Streptoverticillium mobaraense*. La préparation enzymatique est composée de 99% de maltodextrine et de 1 % d'enzyme active. Son activité enzymatique a été estimée, par la méthode à l'hydroxamate, à 100 unités d'enzyme/g de poudre. L'unité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme (poudre) nécessaire pour catalyser la formation de 1 µmol d'hydroxamate par minute à 37 °C et pH 6 **(Folk, 1970)**. Sa masse moléculaire et son pI sont respectivement 40 kDa et 8,9 **(Ando et al., 1989)**.

II.1.3. Les réactifs chimiques

Les réactifs chimiques ainsi que les enzymes utilisés pour les différentes analyses sont de grade analytique et commercialisés par la société Sigma Aldrich® (France) et VWR (France).

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction et purification des protéines

L'extraction sélective et successive des fractions albumines (Alb) et globulines (Glob) a été réalisée en fonction de leurs solubilités (l'albumine dans l'eau et la globuline dans les tampons salins) selon **Crévieu et al., (1996).** Le protocole d'extraction et de purification a été décrit dans le chapitre II (§ II.2.1.1).

II.2.2. Mise en place des méthodes de suivi de la réaction enzymatique

II.2.2.1. Incubation enzymatique

Les solutions protéiques de la fraction Glob (1% m/m) ont été incubées avec 10 unités MTGase/g protéine à 40 °C et pH 7. A des intervalles de temps (10, 30, 60, 120, 300 min), une quantité de solution protéique a été prélevée et chauffée à 90 °C pendant 10 min afin de désactiver l'enzyme. Une partie de ces solutions a été conservée pour les méthodes OPA et TNBS, l'autre partie a été congelée puis lyophilisée pour l'analyse par HPLC-MS et pour la caractérisation par SDS-PAGE.

En parallèle, et pour chaque expérience, des échantillons témoins ont subi les mêmes traitements en absence de MTGase.

II.2.2.2. SDS-PAGE

Les échantillons protéiques lyophilisés (traité avec la MTGase) ont été préparés à raison de 10 µg/µl dans un tampon dans des conditions dénaturantes et réductrices (Tris-HCl 0.02 M ; pH 8 ; 20 % (m/v) glycérol ; 2 % SDS m/v, 0.002 % (m/v) bleu de bromophénol et 2% (m/v) DTT. L'électrophorèse a été réalisée selon **Laemmli (1970)** comme décrit précédemment (chapitre II, § II.2.2.).

II.2.2.3. Dosage du fragment glutamyl-lysine par HPLC- MS

Le fragment glutamyl-lysine (Gln-Lys) a été dosé par HPLC-MS après une digestion enzymatique des échantillons traités **(Schafer et al., 2005)**.

Digestion enzymatique : 20 mg de lyophilisat, fraction Glob traitée avec MTGase, ont été dissout dans 3 ml de tampon borate (0.1 M, pH 8). Après l'ajout d'un crystal de thymol, une digestion enzymatique séquentielle a été réalisée. D'abord 0,4 unité / mg de pronase ont été ajoutée et mise à incuber pendant 24 heures. Cette étape a été répétée 2 fois. Après la désactivation de la pronase (100°C, 10 min), la leucine aminopeptidase (0.4 unité / mg de protéine et la prolidase (0.4 unité / mg de protéine) ont été ajoutées, puis le mélange a été incubé durant 24 heures. La leucine aminopeptidase (0.4 unité / mg) a été ajoutée seule pour 24 heures. Finalement, le mélange a été traité avec de la

carboxypeptidase A (0.2 unité / mg) pendant 24 heures et désactivé à 100 °C pendant 10 min puis lyophilisé. Tous les traitements enzymatiques ont été réalisés à 37 °C.

La quantité totale de chaque lyophilisat après digestion a été dissoute dans 7,0 ml d'eau déminéralisée. 20 µl ont été injectés directement après filtration sur membrane (0,45 µm) dans un HPLC-MS. La séparation par HPLC des peptides a été réalisée par élution isocratique avec de l'eau contenant 0,1 % de TFA (Acide trifluoroacétique) à 15 °C et à un débit de 0,6 ml / min. La colonne utilisée est une colonne ODS Hypersil C18 (250 * 4,6 mm de diamètre, 5 µm); CS Chromatographie service, Langerwehe, (Allemagne). La détection MS du dipeptides était basée sur l'ionisation par électrospray (ESI) en mode SIM, (m/z) 147 et (m/z) 130.

La quantification du fragment a été déterminée sur la base d'une courbe d'étalonnage du fragment Gln-Lys étalon.

II.2.2.4. Dosage des amines libres par les méthodes spectrophotométriques

Suivi de la réticulation par la méthode TNBS

Le dosage des NH_2 libres a été réalisé selon **Gan et al., (2009).** Deux ml d'une solution de trinitrobenzènesulfonique (TNBS) à une concentration de 0.5 g/l ont été ajoutés à 250 µl de la solution protéique traitée et 1.75 ml d'un tampon phosphate (200 mM, pH 8).

Après homogénéisation, le milieu réactionnel est incubé à l'obscurité pendant 60 min à 50 °C. L'arrêt de la réaction se fait par l'ajout de 4 ml de solution d'HCL 0.1 M et l'absorbance est mesurée à 340 nm **(A_{tot}).**

Suivi de la réticulation par la méthode OPA

Le réactif O-phtaldiadehyde (OPA) a été préparé comme décrit par **Dinnella et al., (2002)** : 80 mg d'OPA ont été dissous dans 2 ml d'éthanol (95 %). 50 ml de solution de tetraborate de sodium (100 mM et pH 9.5), 5 ml d'une solution SDS (20 %) et 0.2 ml de 2-mercaptoéthanol ont été ajoutés. La solution a été préparée juste avant la réaction puis ajustée à 100 ml avec de l'eau distillée. 50 µl d'échantillon ont été mélangés avec 2 ml de réactif

OPA. L'absorbance à 340 nm a été mesurée exactement après une période d'incubation de 2 min, elle est notée **(A_{tot})**.

Correction des méthodes OPA et TNBS

L'ammoniaque libérée suite à la réaction enzymatique forme un complexe avec les réactifs OPA et TNBS qui absorbe à 340 nm interférant ainsi sur l'absorbance mesurée. A cet effet, une correction est nécessaire afin d'évaluer le degré de réticulation.

Pour cela et en même temps que les opérations précédentes, 450 µl des solutions protéiques ont été précipitées avec 0.05 ml de acide trichloroacétique (TCA) à 15% et centrifugées à 12000 x g pendant 5 min. Le surnageant contenant uniquement l'ammoniaque formée est analysé par la méthode OPA et TNBS décrites précédemment. L'absorbance mesurée est notée (**A_{sn}**).

L'absorbance corrigée (A_{corr}) est donnée par l'équation (III.1):

$$\mathbf{A_{corr} = A_{sn} - A_{tot}} \quad \text{..... (III.1)}$$

Degré de réticulation

Le degré de réticulation en fonction du temps R (t) est calculé à partir de l'équation (III.2).

$$\boldsymbol{R\,(t) = \left(1 - \frac{Acorr(t)}{Acorr(o)}\right) * 100} \quad \text{..... (III.2)}$$

Acorr(t) : Absorbance corrigée des échantillons traités à l'instant t.
Acorr(0) : Absorbance corrigée de l'échantillon non traité (t = 0).

II.2.3. Suivie de la réticulation enzymatique par la RMN ^{1}H

II.2.3.1. préparation des échantillons et traitement enzymatique

Des solutions mères de CBZ-Gln-Gly (10 mM), N-α-acetyl-lysine (10 mM), MTGase (2% m/m) et Gln-Lys étalon (10 mM) ont été préparées dans un tampon phosphate deutéré (D_2O, 0.1 M, pH 7). A partir de ces solutions mères, plusieurs combinaisons de mélanges ont été introduites dans des vials hermétiques (**Tableau III.1**) puis incubées à 40 °C. Après 2 h

d'incubation, les mélanges ont été chauffés à 95 °C pendant 5 min afin de désactiver l'enzyme puis placés dans des tubes de RMN (5 mm) pour analyse. Des échantillons témoins ont été traités dans les mêmes conditions sans MTGase pour imiter le traitement thermique. Dans certains cas, l'enzyme a été désactivée par le chauffage avant l'ajout aux échantillons (Tableau.III.1. échantillons g et k).

II.2.3.2. Analyse des échantillons par RMN ^{1}H

Les échantillons modèles traités et non traités par la MTGase ont été analysés par RMN ^{1}H à 25 °C dans un appareil Bruker Avance II 600 MHz. L'acquisition des spectres a été enregistrée dans une séquence d'impulsion simple. Les mesures ont été réalisées avec des temps d'acquisition et de d'attente entre les impulsions respectivement de 2.66 s et 1 s avec un nombre d'accumulation de 64. Les données enregistrées ont été traitées par la transformées de Fourier. Les déplacements chimiques sont indiqués en parties par million (δ) et relativement calibrés au tétraméthylsilane (TMS, δ 0,00 ppm). L'eau résiduelle du tampon deutéré (D2O) a été utilisée comme référence interne pour calibrer les spectres. Les logiciels TOPSPIN (BRUKER) et NMRnotebook (NMRtec) ont été utilisés respectivement pour l'acquisition et le traitement de données.

Tableau.III.1. Compositions des mélanges de substrats modèles analysés par RMN ^{1}H.

Echantillons		Solutions méres (0.01M)			MTGase (2%m/m) (µl)	Tampon Phosphate (D_2O, 0.1M, pD7) (µl)
		Nα-Acetyl-L-lysine (µl)	CBZ-Gln-Gly (µl)	Gln-Lys (µl)		
Un seul substrat	a				100	500
	b	500				
	c	500			100	
	d		500			
	e		500		100	
Deux substrats	f	500	500			
	g	500	500		200 *	
	h	500	500		200	
	i			500		
	j	500	500	100 **		
	k	500	500	100 **	200 *	
	l	500	500	100 **	200	
Étalon	m			50		450
	n			100		400
	o			250		250
	p			500		

*MTGase a été désactivée (90 °C pendant 5 min) avant ajout au mélange
**Gln-Lys a été ajoutée après traitement thermique

II.2.4. Suivie des liaisons intramoléculaires

II.2.4.1. Purification de l'albumine sur colonne

La fraction Albumine total (Alb) a été purifiée dans une colonne préparative DEAE Sepharose Fast Flow (GE HelthCare) selon **Higgin et al. (1987) et Bérot et al (2007)**. La fraction Alb a été dissoute à raison de 5% (m/m) dans un tampon tris-HCl 50 mM pH 7 puis chargée dans la colonne préalablement équilibrée dans le même tampon. L'élution a été réalisée sous un gradient de NaCl (de 0 à 0.25 M) dans 50 mM Tris-HCl à pH 7. Des fractions de 150 ml ont été collectées et leur densité optique a été mesurée à 280 nm. La variation de la concentration en NaCl (gradient) a été réalisée en fonction des densités optiques mesurées. Lorsque l'absorbance d'une fraction atteint la valeur 0.1 on augmente la concentration du tampon en NaCl par palier de 0.05 M, et on maintien l'élution jusqu'à ce que la fraction collectée donne une absorbance inférieure à 0,1. Les fractions ayant des densités optiques élevées ont été sélectionnées et analysées par électrophorèse. Les fractions contenant uniquement les bandes caractéristiques de l'albumine ont été rassemblées, concentrées et dessalées (comme cité pour la fraction Alb précédemment) puis congelées et lyophilisées. Cette fraction d'albumine pure est notée PPA.

II.2.4.2. Traitement enzymatique

Des solutions d'albumines totales (Alb) et purifiées (PPA) ont été préparées à différentes concentrations dans un tampon phosphate de sodium 50 mM en présence de 20 mM de NaCl et 20 mM de DTT à pH 7. Les solutions ont été chauffées (80 °C pendant 1h) puis refroidies et incubées 5 h à 40°C en présence et en absence de 250 unités MTGase/ g protéines. Après lyophilisation, les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE (comme cité précédemment) et diffusion dynamique de la lumière (DLS).

II.2.4.3. Mesure de la distribution de taille par DLS

Les échantillons lyophilisés ont été solubilisés à raison de 0.5% (m/m) dans un tampon phosphate 50 mM en présence de 20 mM de NaCL et 20 mM de DTT, 4M urée à pH 7. Après une bonne agitation (vortex), les solutions ont été filtrées (0.22 µm) puis analysées par un appareil DLS (Submicron Partical Sizer ; NICOMP 380, California,

USA) ayant une gamme de mesure de taille allant de 1nm à 1µm. Les mesures ont été effectuées à un angle de diffusion de 90° et à une température de 25°C.

II.2.5. Analyse statistique

Tous les essais ont été répétés au minimum trois fois. L'analyse de variance (ANOVA) des résultats a été réalisée par le logiciel XLSTAT Pro version 2013. Le test Fisher's a été appliqué avec un intervalle de confiance de 95%.

III. Résultats et discussion

III.1. Mise en place des méthodes de suivi de la réaction enzymatique

III.1.1. SDS-PAGE

L'électrophorèse est une technique fréquemment utilisée dans le suivi de la réticulation enzymatique des protéines. Elle permet de suivre le comportement de chaque sous-unité constituant la protéine vis-à-vis du traitement enzymatique. Une éventuelle diminution de l'intensité des bandes, voir leur disparition, permet d'estimer l'effet du traitement.

L'analyse doit être réalisée dans des conditions dénaturante (en présence de SDS) et réductrice (en présence de DTT) pour rompre respectivement les liaisons non-covalentes (hydrophobe, hydrogène…) et les liaisons covalentes (S-S) naturellement présentes dans la protéine et/ou formées parallèlement au traitement enzymatique, hors réticulation, par effet thermique. Ces conditions dénaturante et réductrice permettent au final de visualiser uniquement les liaisons covalentes Gln-Lys, non-affectée par le SDS et le DTT, résultantes de la réticulation enzymatique.

Le profil électrophorétique d'une solution de globuline (1% m/m) traitée par la transglutaminase (10 unités / g de protéine) à 40 °C et pH 7 est montré dans la **Figue III.1.** Les échantillons de la fraction Glob traités (pistes 10 à 300 min) par rapport au témoin (piste T) présentent une trainée en haut du gel qui s'intensifie proportionnellement avec la durée du traitement. Ceci est dû aux molécules de haut poids moléculaire formées à la suite des liaisons intermoléculaires catalysées par la transglutaminase.

Aucune nouvelle bande n'apparait dans tous les profils, indiquant qu'aucune interaction spécifique entre les peptides constituant la globuline n'est présente. Toutes les liaisons formées sont donc aléatoires.

L'analyse densitométrique du gel a montré que les fractions les plus affectées par la transglutaminase sont la conviciline (71 kDa), les vicilines 55, 50, 35 kDa ainsi que la légumine acide (Lα 40 kDa) avec un taux de disparition de l'intensité des bandes correspondantes, après 300 min de traitement, de 100, 33, 100, 32 et 49% respectivement. Tandis que la légumine basique (Lβ 20 kDa) et les vicilines de masse moléculaire inférieure à 20 kDa restent intactes durant toute la durée de traitement.

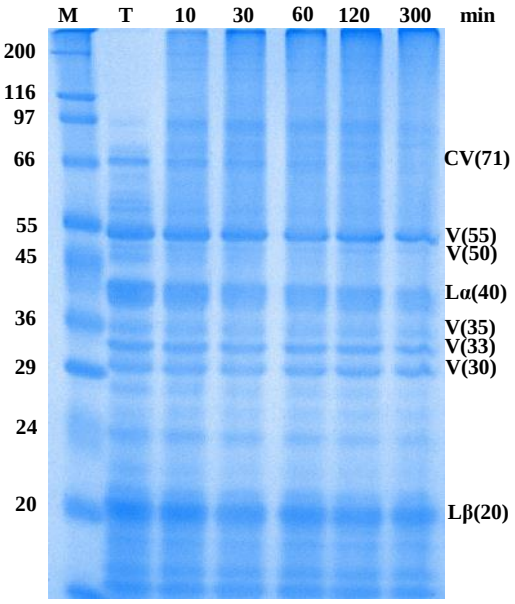


Figure III.1. Profil SDS-PAGE de la globuline (1% m/m) incubée avec 10 unités MTGase/g de protéines à 40 °C et pH 7. M : Marqueurs de masse molaire (kDa) ; T : Globuline non traitée (témoin) ; les pistes 10-300 min: durées d'incubation ; CV : conviciline ; V : polypeptides de la viciline ; Lα : polypeptide acide de la légumine ; Lβ : polypeptide basique de la légumine.

Le taux de disparition de l'ensemble des bandes (Glob totale) après 120 et 300 min de traitement est respectivement 42 et 47%. Ce taux de disparition est considéré par quelques auteurs comme étant le degré de réticulation **(Basman et al., 2002)**. Or, il est bien connu que l'électrophorèse est une technique d'analyse semi quantitative. En effet, il suffit qu'une seule liaison Gln-Lys s'établisse entre deux polypeptides, identiques ou non, pour que ces derniers disparaissent de leur position d'origine dans le gel. Dans ces conditions, le polypeptide qui participe au réseau formé avec une ou plusieurs liaisons Gln-Lys est visualisé dans le gel de la même manière (il disparait qu'une fois), conduisant soit à une surestimation ou bien une sous-estimation du degré de réticulation. Dans notre travail, il ne sera exploité que la dimension qualitative de cette technique.

III.1.2. Méthodes spectrophotométriques: OPA et TNBS

A l'origine, les méthodes spectrophotométriques utilisant les réactifs, acide O-phtaldiadehyde (OPA) et l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), ont été utilisées pour

suivre le degré d'hydrolyse des protéines (Silvestre, 1997). Le principe repose sur le suivi de l'évolution des groupements amines qui se libèrent au cours de la réaction d'hydrolyse. Par analogie, la méthode a été adoptée pour la réticulation enzymatique en suivant les groupements amine libres en cours de réaction, déduisant ainsi ceux qui disparaissent suite à leur implication dans la réaction enzymatique (Dinnella et al., 2002 ; Gan et al., 2009). Ainsi, le degré de réticulation peut être calculé à partir du rapport de la quantité d'amine libre après et avant réaction enzymatique.

La cinétique de la réticulation enzymatique de la fraction Glob (1% m/m), traitée avec 10 unités MTGase/g protéine à pH 7 et 40 °C, a été étudiée par les méthodes spectrophotométriques à l'OPA et au TNBS. Les résultats sont présentés respectivement dans les Figures III.2 et III.3.

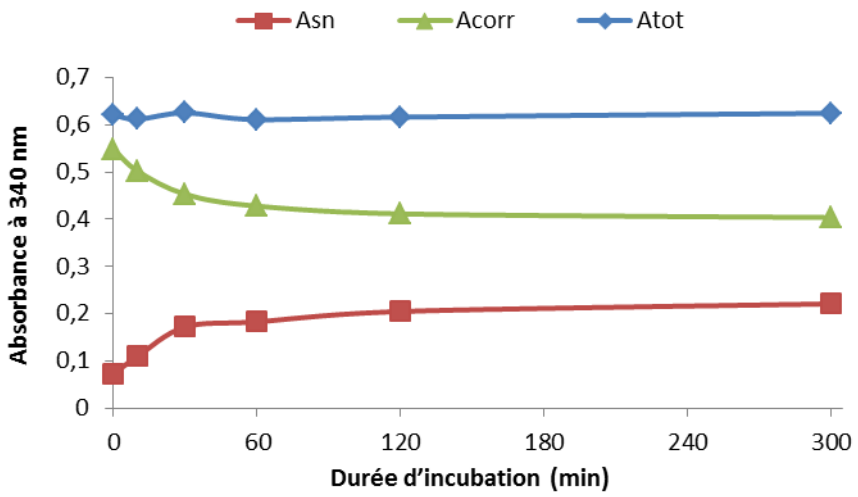


Figure III.2. Evolution de l'absorbance des groupements amines libres analysés par la méthode OPA de la fraction Glob (1% m/m) en cours de traitement enzymatique (10 unités MTGase/g de protéine à 40 °C et pH 7). Atot : absorbance de la fraction Glob traitée ; Asn : absorbance du surnageant après une précipitation acide ; Acorr : absorbance corrigée (Atot-Asn).

Les valeurs d'absorbance des amines libres de la fraction Glob traitée avec la MTGase (Atot), des deux méthodes OPA et TNBS, sont constantes tout le long du traitement, donnant l'impression que la réaction enzymatique n'a pas eu lieu. Or, l'électrophorèse a bien montré le contraire **(Figure III.1)**. Ceci est dû aux interférences de l'ammoniaque libéré en parallèle de

la formation du fragment Gln-Lys. En effet, la réaction enzymatique est stœchiométrique, les amines libres des résidus lysine consommées sont remplacées par l'ammoniaque qui forme, avec les réactifs OPA et TNBS des complexes qui absorbent à 340 nm, remontant l'absorbance à sa valeur initiale. Une correction d'absorbance est donc nécessaire pour pouvoir quantifier le degré de réticulation. Pour se faire, l'ammoniaque est dosé dans le surnageant (Asn) après une précipitation acide des protéines. Les amines des protéines non-consommées (libres) par la réaction enzymatique sont déduites par soustraction de l'absorbance totale (Acorr = Atot - Asn) **(Dinnella et al, 2002).**

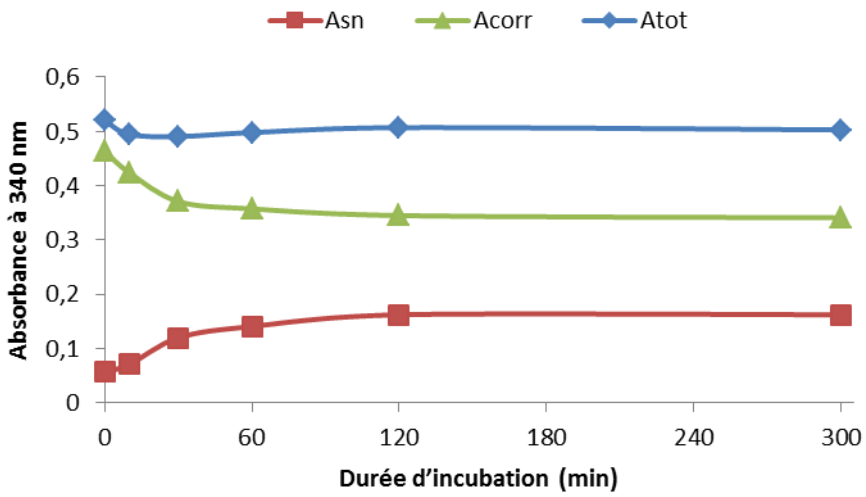


Figure III.3. Evolution de l'absorbance des groupements amines libres analysés par la méthode TNBS de la fraction Glob (1% m/m) en cours de traitement enzymatique (10 unités MTGase/g de protéine à 40 °C et pH 7). Atot : absorbance de la fraction Glob traitée ; Asn : absorbance du surnageant après une précipitation acide ; Acorr : absorbance corrigée (Atot-Asn).

Une augmentation de l'absorbance en fonction de la durée de traitement enzymatique du surnageant (Asn) est constatée. Ceci est dû à l'ammoniaque libéré mettant en évidence la réaction enzymatique.

Une diminution de groupements amines libres (Acorr) est constatée en fonction de la durée de traitement rendant compte de la quantité du fragment Gln-Lys formé. Au début de la réaction, l'absorbance corrigée diminue rapidement et se stabilise après 2 heures. Cela

s'explique par la disponibilité et l'accessibilité des groupements NH_2 libres au début de la réaction et de leur disparition progressive en fonction du temps.

Les rendements de réticulation de la fraction Glob (1% m/m) en fonction de la durée d'incubation déterminés par les méthodes OPA et TNBS sont présentés dans la **Figure III.4.** Les degrés de réticulation augmentent rapidement avec la durée d'incubation durant les deux premières heures. Ils atteignent une valeur de 25% après deux heures de traitement et ne dépassent pas les 26 % après 5 heures.

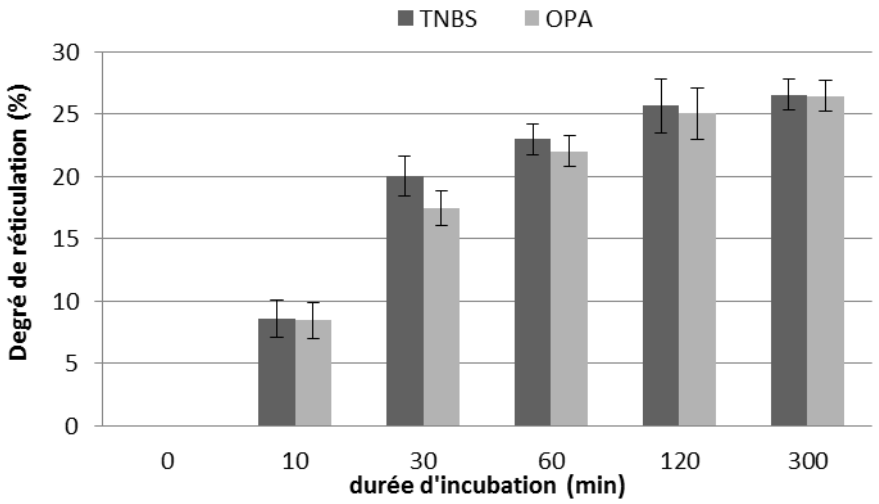


Figure III.4. Rendement de réticulation de la fraction Glob (1% m/m) déterminés par les méthodes OPA et TNBS en fonction de la durée d'incubation.

La **Figure III.5** compare les rendements de réticulation déterminés par les deux méthodes (OPA et TNBS). Un coefficient de corrélation de 0.992 est obtenu, indiquant que les résultats sont très proches. La méthode à l'OPA est cependant relatée comme étant plus facile à mettre en œuvre, plus rapide, plus sensible et plus sûre d'un point de vue environnemental par rapport à la méthode TNBS **(Silvestre, 1997).**

La méthode à l'OPA a été utilisé par **Dinnella et al., (2002)** pour l'étude de la cinétique de réticulation de la caséine. Ces auteurs ont conclu que la méthode OPA est bien adaptée pour le suivi de la réticulation enzymatique. Ceci a été contredit par **Flanagan et al. (2003)**, qui ont suggéré que les groupes amines libres du caséinate de sodium, après traitement enzymatique, sont emprisonnés à l'intérieur du réseau réticulé formé (gel), les rendant

inaccessibles au réactif OPA et conduisant à une sous-estimation de groupes amines libres et donc à une surestimation du degré de réticulation. Les deux résultats nous semblent corrects et la seule différence se résume dans la concentration du substrat utilisée. En effet, dans la première étude **(Dinnella et al., 2002)** une concentration de 0.24 % (m/v) a été utilisée soit 16 fois moins que dans la seconde étude où une concentration de 4 % (m/v) est utilisée (**Flanagan et al., 2003)**. Dans le premier cas la concentration en protéine est très faible et aucun réseau tridimensionnel continu n'est formé, maintenant ainsi les groupes amines libres toujours accessibles à l'OPA. Par contre, avec une concentration de 4%, un réseau tridimensionnel formant un gel est constitué rendant les amines libres inaccessibles au réactif OPA. Donc, la Méthode OPA est à utiliser avec précaution.

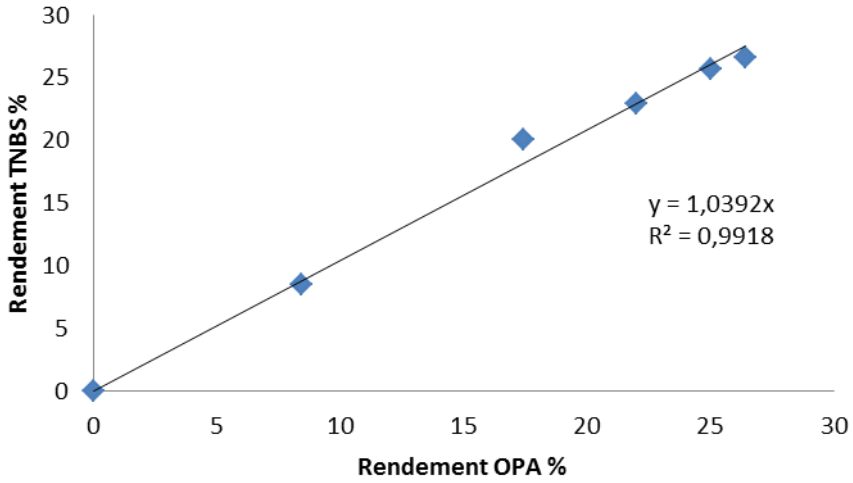


Figure III.5. Corrélation entre les rendements de réticulation déterminés par les méthodes OPA et TNBS.

III.1.3. Dosage du fragment Gln-lys par HPLC-MS

Les quantités formées du fragment Gln-Lys dosé par HPLC-MS (après digestion protéolytique) au cours du traitement enzymatique à 40 °C et pH 7 en fonction du temps de la fraction Glob (1% m/m) sont présentées dans la **Figure III.6**. Avant incubation enzymatique (t = 0), la fraction Glob contenait une petite quantité du fragment Gln-Lys, indiquant que ce fragment est naturellement présent dans cette fraction. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux **(Sakamoto et al., 1995 ; Schafer et al., 2005 et 2007)**. Après incubation avec la MTGase, la quantité du fragment Gln-Lys formée évolue rapidement pour se stabiliser

après 120 min de réaction enzymatique. Ceci reflète la consommation presque totale du substrat (résidus glutamine et lysine accessibles à la MTGase).

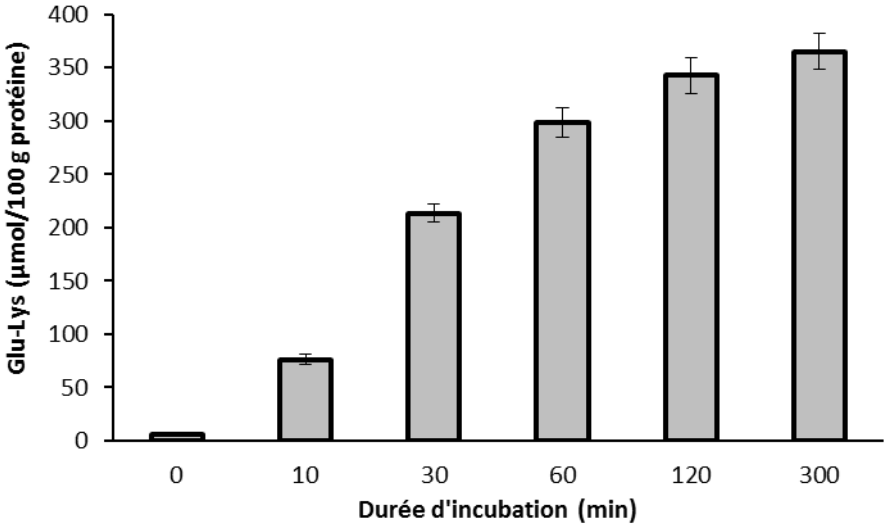


Figure III.6. Dosage du fragment Gln-lys par HPLC-MS de la fraction Glob (1% m/m) traitée avec 10 unités de MTGase/g de protéine à pH 7 et 40 °C.

La comparaison de l'évolution de la formation du fragment Gln-Lys avec le degré de réticulation de la fraction Glob déterminés respectivement par HPLC-MS et la méthode OPA est présentée dans la Figure III.7. Les résultats des deux méthodes sont bien corrélés avec un coefficient de 0.985.

Le dosage du fragment Gln-Lys par HPLC-MS est la méthode la plus précise pour étudier la réticulation enzymatique par la MTGase **(Schafer et al., 2005)**. Cependant, en raison d'une digestion protéolytique extensive des échantillons (6 jours) afin de libérer le fragment Gln-Lys pour pouvoir le doser, cette méthode devient très longue et fastidieuse.

En outre, elle se limite à doser uniquement le fragment Gln-Lys sans pour autant pouvoir déterminer le degré de réticulation. Elle doit être complétée, par exemple, par la méthode OPA pour déterminer la quantité de lysine initiale avant traitement enzymatique. Or, la méthode OPA est aussi à utiliser avec précaution.

Aussi, ces méthodes se limitent à visualiser uniquement l'effet global (apparent) engendré par la réticulation enzymatique. Elles sont incapables de distinguer les liaisons intra et intermoléculaire.

Par conséquent, de nouvelles méthodes doivent être développées afin de combler les limites constatées. Dans ce qui suit nous présentons deux travaux permettant de compléter les méthodes précédentes sous forme d'articles scientifiques.

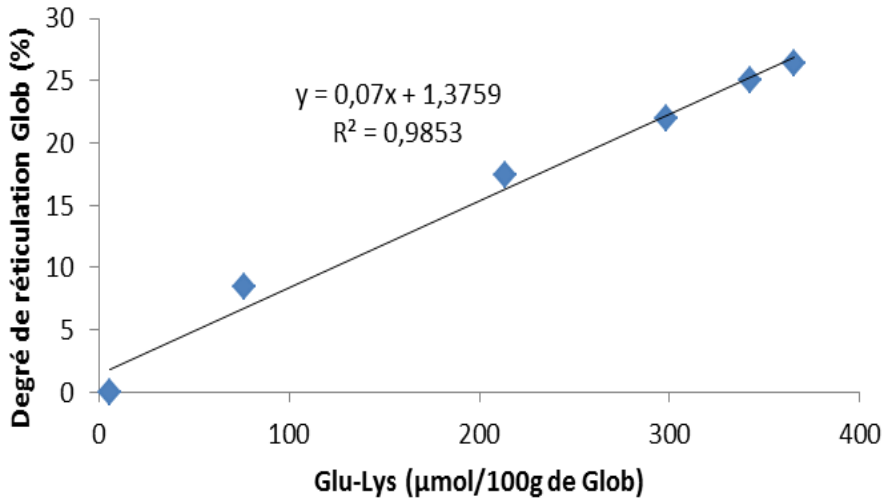


Figure III.7. Corrélation entre la quantité du fragment Gln-Lys formé et le degré de réticulation de la Glob (1%), pour des durées de traitement identiques, déterminés respectivement avec HPLC-MS et la méthode OPA.

III.2. Article 1 : Suivie de la réticulation enzymatique par la RMN ^{1}H

Monitoring of transglutaminase crosslinking reaction by ^{1}H NMR spectroscopy on model substrates

Djoullah, A., Sok, N., Djemaoune, Y., Penouilh, M.-J., Husson, F*., Saurel, R*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (In press).

Abstract

A new method based on ^{1}H NMR spectroscopy was developed for monitoring transglutaminase crosslinking reaction with model molecules (CBZ-Gln-Gly and N-α-acetyl-lysine). The transglutaminase reaction led to the appearance of new resonances on NMR spectrum as well as significant decrease in others. The new observed resonances, originated from newly formed ε-(γ-glutamyl)lysine isopeptide bonds, evidence the enzymatic reaction and allow to quantify the ε-(γ-glutamyl)lysine fragment. Moreover, the decrease in resonance intensity, originated from lysine, permit to determine the crosslinking degree. These results obtained by ^{1}H NMR spectroscopy can be used as an alternative method to LC-MS, reducing drastically the analysis time from 7 days to 2 hours.

Résumé

Une nouvelle méthode basée sur la RMN du proton a été développée, sur des substrats modèles (CBZ-Gln-Gly et N-α-acetyl-lysine), pour suivre la réticulation enzymatique catalysée par la transglutaminase. La réaction enzymatique conduit à l'apparition de nouvelles résonances dans les spectres RMN ainsi qu'une diminution significative dans d'autres. Les nouvelles résonances, originaires de la nouvelle liaison ε-(γ-glutamyl)-lysine formée, permettent de mettre en évidence la réaction enzymatique et de quantifier le fragment ε-(γ-glutamyl)-lysine. La diminution de l'intensité de la résonnance originaire de la lysine permet la détermination du degré de réticulation. Après ajustement sur des matrices protéiques réelles, la RMN ^{1}H peut être une bonne alternative à l'HPLC-MS, réduisant ainsi le temps d'analyse de 7 jours à 2 h.

III.2.1. Introduction

Microbial transglutaminase (MTGase) is an enzyme widely used in foodstuffs to improve textural and functional properties of proteins (restructuration of meat, fish, and seafood products) [1]. It catalyses acyl-transfer reactions between glutamine (Gln) and primary amine. The proposed transglutaminase (TGase) mechanism reaction [2, 3] takes place in two steps (Fig.III.8). In the first step, the γ-carboxyamide group of Gln, an acyl-donor substrate, interacts with the enzyme's catalytic cysteine residue to form a covalent acyl-enzyme intermediate with release of ammonia. Then, this intermediate reacts with a second substrate, the acyl-acceptor, which can be almost any primary amino group of a variety of amines (Fig.III.8a) or the ε-amino group of lysine (Lys) residues (Fig.III.8b), to yield γ-glutamyl-amine product (primary amine incorporation) or ε-(γ-glutamyl)lysine (Gln-Lys) isopeptide bond (crosslinking) respectively with regeneration of free enzyme. In the absence of primary amine, the water can act as an acyl-acceptor substrate (Fig.III.8c). In this case, the acyl-enzyme intermediate is hydrolyzed and the glutamic acid is formed (deamidation) [4-6]. The most interesting reaction is that of crosslinking (Fig.III.8b), where the resulting isopeptide bonds (Gln-Lys) contribute to the formation of a stable protein network via intermolecular and intramolecular cross-links [7]. Furthermore, it is anticipated that processing of protein isolates with MTGase, modifying their techno-functional properties, will open up new areas of applications such as microencapsulation of bioactive molecules [8]. Therefore, to achieve the intended application in the desired way, controlling the reaction in the course of the cross-linking process is a prerequisite. For this purpose, the quantitative determination of the Gln-Lys isopeptide bonds formed by the enzymatic reaction is essential. However, detection of the isopeptide bonds is not easy because of matrix complexity. Generally it is accomplished using exhaustive proteolytic digestion of cross-linked proteins, derivatization of generated aminoacid mixture and purification by chromatographic techniques. Several chromatographic methods have been used to isolate the Gln-Lys isodipeptide. The most reliable method of isolation involves reverse phase HPLC [9, 10]. More recently, Schafer and al [11] developed a rapid and convenient liquid chromatography method based on mass spectrometric detection (LC-MS). This improved alternative process, without sample treatment after proteolytic digestion, avoids sample preparation steps like preliminary chromatographic fractionation and derivatization. However, because of sequential proteolytic digestion (6 days), the method is still time consuming and tedious to establish. De Kruif et al [12] used ^{1}H-NMR spectroscopy to study the effect of MTGase treatment of κ- and

β-casein. They observed significant changes on NMR spectra of MTGase-treated samples compared to untreated one. These changes included a decrease in intensity of some resonances as well as the appearance of a new signal. The latter resonance was attributing to the Gln-Lys isopeptide bond newly formed during enzymatic reaction. From this approach, it seems interesting to refine these results in order to develop a new method to follow enzymatic crosslinking reaction. The aim of this work was to develop a simplified, rapid and precise method based on ^{1}NMR spectroscopy to detect and quantify the Gln-Lys isopeptide bonds formed by enzymatic reaction on model substrates.

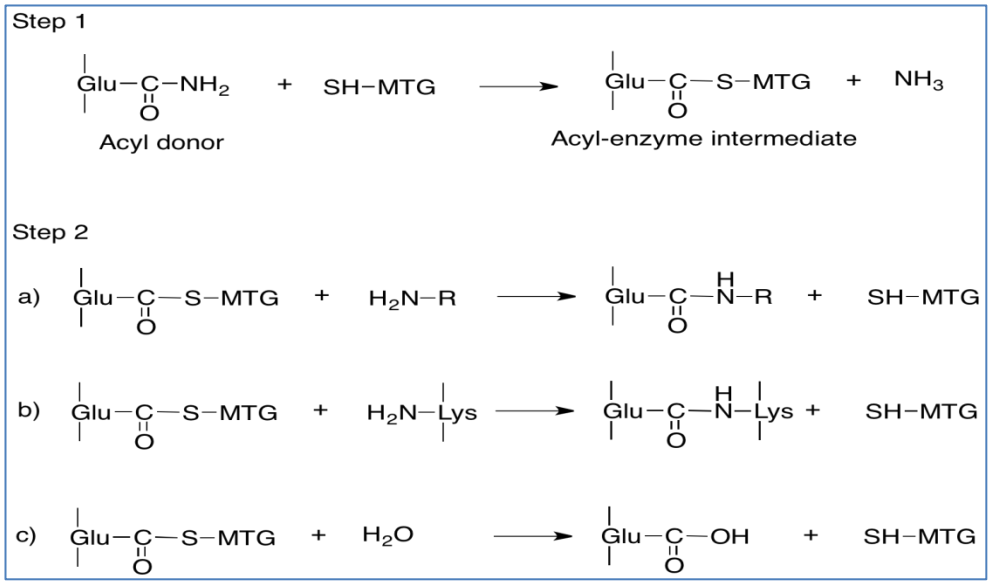


Figure.III.8. The two steps acyl transfer reaction catalyzed by transglutaminase (TGase). Step 1: formation of the intermediate acyl donor-enzyme and release of ammonia. Step 2: (a) primary amine incorporation, (b) crosslinking and (c) deamidation with release of the free enzyme.

III.2.2. Results and discussion

The interest of high field NMR over spectroscopic techniques results from the fact that every NMR active nucleus gives rise to an individual resonance in the spectrum. Although NMR is not a new analytical tool to follow chemical reaction, our strategy was to use this method to monitor crosslinking transglutaminase reaction and to lay the basis for developing a direct quantification method applied to proteic substrate. Indeed, enzymatic reaction leads to

the formation of a new bond, Gln-Lys, inducing change in molecular structure which can be observed by comparing ^{1}H NMR spectra of crosslinked and non-crosslinked samples.

III.2.2.1. Choice of models

The study of TGase reaction based on NMR spectroscopy was developed with model substrates. The use of models is an effective method for simplifying and understanding complex reactions such as enzymatic MTGase crosslinking. Indeed, the simple structure and the small size of these models avoided many problems like availability of the substrates Gln and Lys in proteins [7], steric hindrance [14] or substrate specificity of Gln [15] and Lys [16], and thus allowed a better crosslinking yield than with complex proteins.

The choice of acyl-donor substrate was based on the early works of Folk and Cole 1965 and 1966 [17, 18]. These authors concluded that the recognition of a glutamine on a small peptide by guinea pig liver TGase, must be at least the next-to-last residue and the peptide should bear an N-terminal CBZ group. This result was confirmed by Chica *et al* 2004 [2]. For this reason, the commercially available CBZ-Gln-Gly peptide serves as one of the most common non-proteic acyl-donor substrates for TGases in the literature. Ohtsuka et al 2000 [15] showed that the CBZ-Gln-Gly is an efficient acyl-donor substrate of both red sea bream TGase and guinea pig liver TGase as well as MTGase. Therefore, the CBZ-Gln-Gly peptide was the acyl-donor model substrate selected for this study. Whereas, the acyl-acceptor model substrate was N-α-acetyl-lysine. In this molecule, only Lys ε-amino group can act as an acyl-acceptor substrate, the Lys α-amino group being blocked by acetyl group. In this case, the enzymatic cross-linking reaction between these two models can occur in only one possibility leading to the formation of Gln-Lys isopeptide bonds (Fig.III.8b). In a previous work [19], a similar study was done with L-glutamine and L-lysine as model substrates. However, the enzymatic reaction occurred not only between the γ-carboxyamide groups of Gln and ε-amino group of lysine, but also with α-amino group of lysine leading to the formation of α-(γ-glutamyl) lysine fragment in addition to ε-(γ-glutamyl) lysine fragment. Therefore, special attention in this study was given to the choice of model substrates.

III.2.2.2. Identification of specific NMR resonances for ε-(γ-glutamyl) lysine

Our strategy in this work was first to identify a specific ^{1}H NMR resonances for Gln-Lys isopeptide bonds, and then to quantify the amount of this bond formed during the

enzymatic reaction. Solutions of the selected models were prepared alone and in mixture and then incubated with and without MTGase. The effect of MTGase reaction e.g. formation of Gln-Lys bonds, was observed by comparing ^{1}H NMR spectra of these combinations. Fig.III.9 shows ^{1}H NMR spectra of (a) MTGase, (b) N-α-acetyl-lysine, (c) N-α-acetyl-lysine + MTGase, (d) CBZ-Gln-Gly and (e) CBZ-Gln-Gly + MTGase. In spectra (c) and (e), in addition to resonances originated from N-α-acetyl-lysine and CBZ-Gln-Gly alone, only resonances originated from MTGase appeared in spectra. This indicate that no reaction between MTGase and each model substrates occurred, except for the new resonance observed at 1.85 ppm in spectrum (c), which probably originated from the reaction between impurities contained in the MTGase and N-α-acetyl-lysine solutions and not from enzymatic reaction which is not possible without donor substrate (Gln).

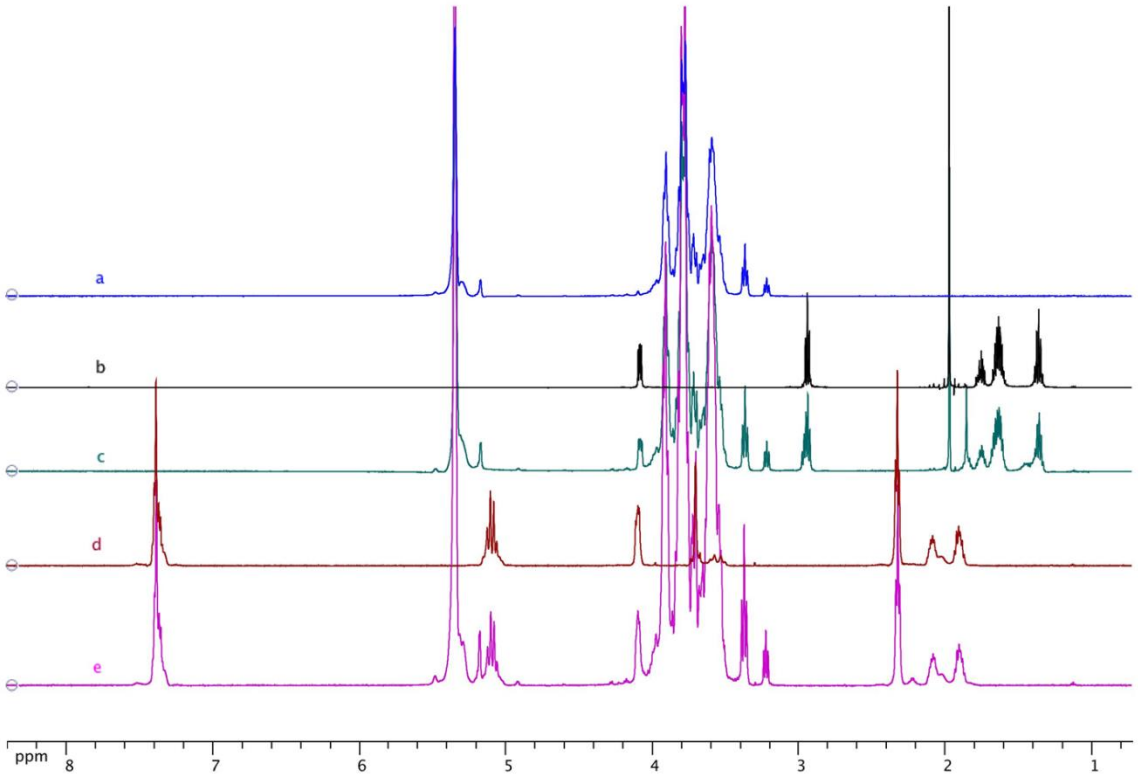


Figure.III.9. 1H NMR spectra of single model substrate with and without MTGase, prepared in 0.1M D2O phosphate buffer (pD7) and incubated at 40°C for 2 hours. (a) MTGase (2% w/w), (b) N-α-acetyl-lysine (10 mM), (c) N-α-acetyl-lysine + MTGase, (d) CBZ-Gln-Gly (10 mM) and (e) CBZ-Gln-Gly + MTGase.

The ^{1}H NMR spectra of the N-α-acetyl-lysine and CBZ-Gln-Gly mixture with and without MTGase are presented in Fig.III.10. To better visualize differences between NMR spectra of studied mixtures, only resonances between 1 and 3.5 ppm were presented. Beyond this value, no changes were observed in all spectra.

In absence of MTGase, the mixture spectrum (Fig.III.10f) was simply composed of the sum of resonances observed separately in N-α-acetyl-lysine and CBZ-Gln-Gly spectra (Fig.III.9 b and d). No changes in resonances were observed, indicating that no reaction between the two models in absence of MTGase occurred.

The incubation of N-α-acetyl-lysine and CBZ-Gln-Gly mixture with inactivated MTGase (treated at 90 °C for 10 min before adding to mixture) at 40 °C for 2 hours (Fig.III.10g) gave a spectrum which additionally contains only specific MTGase resonances comparing to spectrum (f). However, incubating the mixture with the active MTGase led to important changes in NMR spectrum (Fig.III.10h). Three new resonances were observed at 1.44, 1.85 and 3.07 ppm as well as significant decreases in several resonances, the most outstanding are those at 1.63 and 2.94 ppm. The decreased resonances originated from N-α-acetyl-lysine. However, no significant change was observed in resonances originating from CBZ-Gln-Gly, except for that at 3.67 ppm (Fig.III.9d) which could not be observed in spectrum (Fig.III.10h), because of the severe overlap with the MTGase resonances.

After MTGase treatment, the resonances at 1.36, 2.32 ppm (Fig.III.10f) were shifted to 1.31, 2.28 ppm (Fig.III.10h) respectively. The new resonance at 1.85 ppm is not attributed to MTGase crosslinking treatment because it was observed also in the reaction between N-α-acetyl-lysine alone with MTGase (Fig.III.9c).

The origin of the new observed resonances is, probably due to Gln-Lys isopeptide formed by enzymatic reaction between ε lysine amino group of N-α-acetyl-lysine and γ glutamine carboxyamide of CBZ-Gln-Gly. The same phenomenon was observed by De Kruif *et al.* [12] on ^{1}H NMR spectrum of MTGase treated κ-casein. However, it seems that the new resonance observed at 5.4 ppm in their spectrum originated from MTGase as observed in our results (Fig.III.9) and not from ε-methylene protons of Gln-Lys isopeptide bond as proposed by these authors.

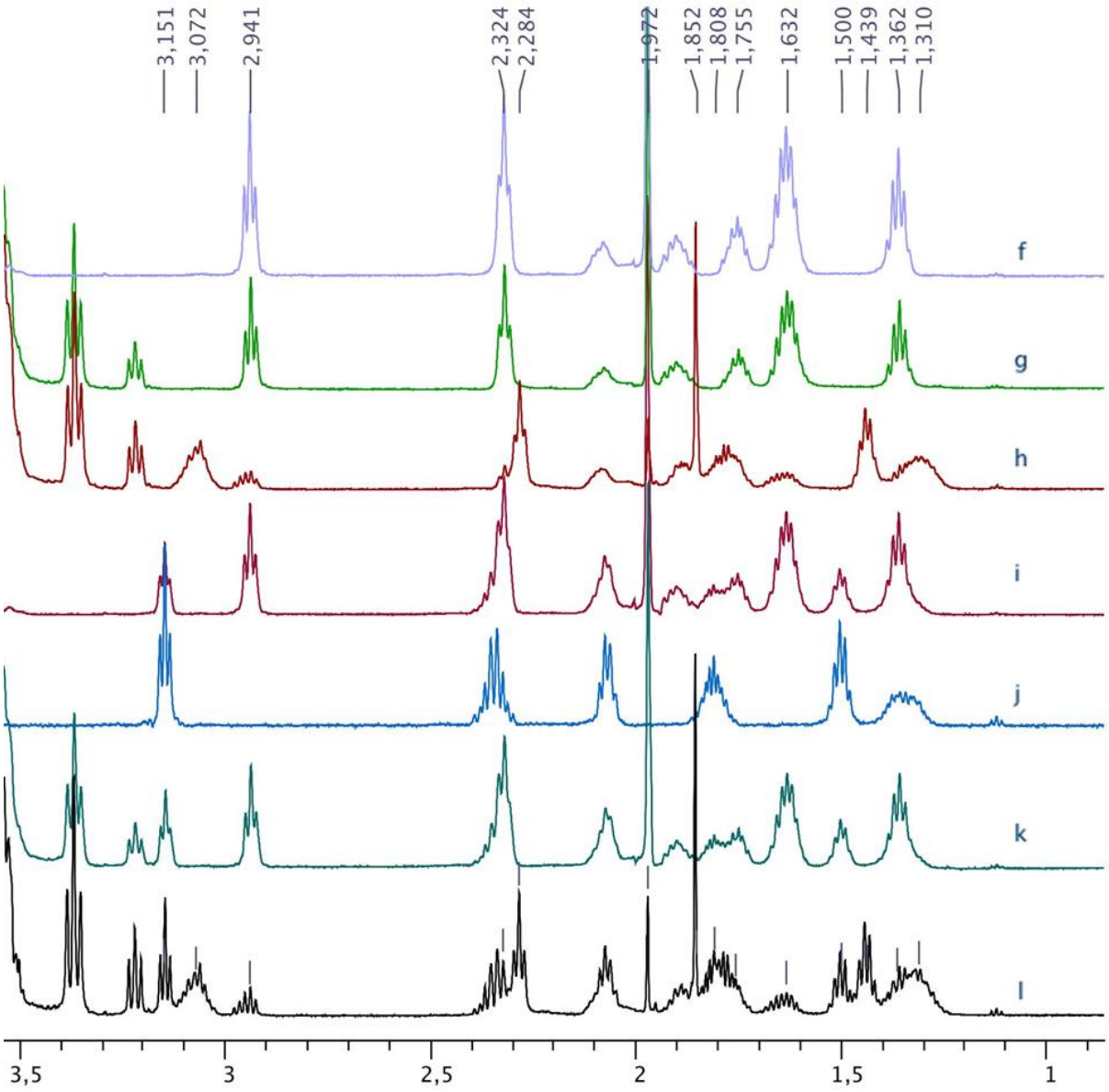


Figure.III.10. 1H NMR spectra of the model substrate mixture solutions with and without MTGase, prepared in 0.1M D2O phosphate buffer (pD7) and incubated at 40°C for 2 hours. (f) N-α-acetyl-lysine + CBZ-Gln-Gly, (g) N-α-acetyl-lysine + CBZ-Gln-Gly + inactivated MTGase, (h) N-α-acetyl-lysine + CBZ-Gln-Gly + MTGase, (i) N-α-acetyl-lysine + CBZ-Gln-Gly + ε-(γ-glutamyl) lysine, (j) ε-(γ-glutamyl) lysine, (k) sample g + ε-(γ-glutamyl) lysine, (l) sample h + ε-(γ-glutamyl) lysine. MTGase was inactivated (90°C for 5min) before adding to the mixture. ε-(γ-glutamyl) lysine was added after heat treatments.

To identify specific resonances for this new cross-link, ^{1}H NMR spectrum of MTGase treated model system was compared with that of synthetic Gln-Lys fragment. The objective

was to see, by spectra superimposition, if the new resonances observed at 1.44 and 3.07 ppm after the enzymatic treatment (Fig.III.10h) are part of the Gln-Lys ^{1}H NMR resonances (Fig.III.10j). This comparison permitted to confirm that all resonances observed in Gln-Lys spectra are superimposed with those of model MTGase treated one, including the new observed resonance at 1.44 and 3.07 ppm. However, due to difference in chemical environment, a shift in resonances was observed. To better visualize this chemical shift, the synthetic Gln-Lys isopeptide was added to samples f, g and h (Table.III.1) and then analyzed by ^{1}H NMR. The corresponding spectra are presented in Fig.III.10, spectrum i, k and l respectively. The resonances observed at 1.50 and 3.15 ppm (Fig.III.10i) correspond to those newly observed at 1.44 and 3.07 ppm in MTGase treated model (Fig.III.10h). The resonance observed at 1.81 ppm is overlapped with that at 1.75 ppm originated from model molecules, but this has no incidence since it was already rejected in our study. The same ascertainments were recorded in spectrum k (Fig.III.10). In spectrum l (Fig.III.10), where the Gln-Lys was added to MTGase treated model, the resonance shift is clearly observed. The chemical shift concerns only the two resonances newly observed after MTGase reaction. This means that the protons originated from these two resonances are most affected by chemical environment change. So, they are the closer protons to the new covalent crosslink (Gln-Lys) following the enzymatic reaction. Indeed, after MTGase reaction, the ε-amino group of lysine is transformed from primary to secondary amine (Fig.III.8b). This reaction induces changes in general chemical environment, but especially for ε-methylene protons leading to the decrease of some resonances and the appearance of new ones. Therefore, new resonances at 1.44 and 3.07 ppm (Fig.III.10h) are considered as markers of MTGase catalysis and their peak areas reflect the amount of the Gln-Lys fragment formed.

III.2.2.3. Quantification of formed Gln-Lys fragment

Calibration curves were obtained by using synthetic Gln-Lys as a standard compound. Standard samples with a concentration ranging from 1 to 10 mM were prepared in phosphate D_2O buffer pD 7.0 and then analyzed by ^{1}H NMR (Table.III.1, samples m to p). The calibration curves of both resonances at 1.50 and 3.15 ppm (MTGase treatment markers) had been drawn from the peak area corresponding to each resonance as a function of standard concentration. They are presented in Fig.III.11. In the studied concentration range, the relationship between the peak area and standard concentration is linear (R= 0.990 for 1.50 ppm and 0.994 for 3.15 ppm) and the two calibration curves seem rather close.

The quantitative Gln-Lys determination of MTGase treated model (sample h) was performed by extrapolation of the peak areas at 1.44 and 3.07 ppm (Fig.III.10h) in corresponding calibration curves, 1.50 and 3.15 ppm respectively. The amount of Gln-Lys fragment formed was 3.79 (± 0.34) mM for 1.44 ppm resonance and 3.91 (± 0.39) mM for 3.07 ppm resonance. These two results were close and they were not significantly different. Therefore, both resonances can serve as key to quantify the Gln-Lys fragment formed following MTGase treatment.

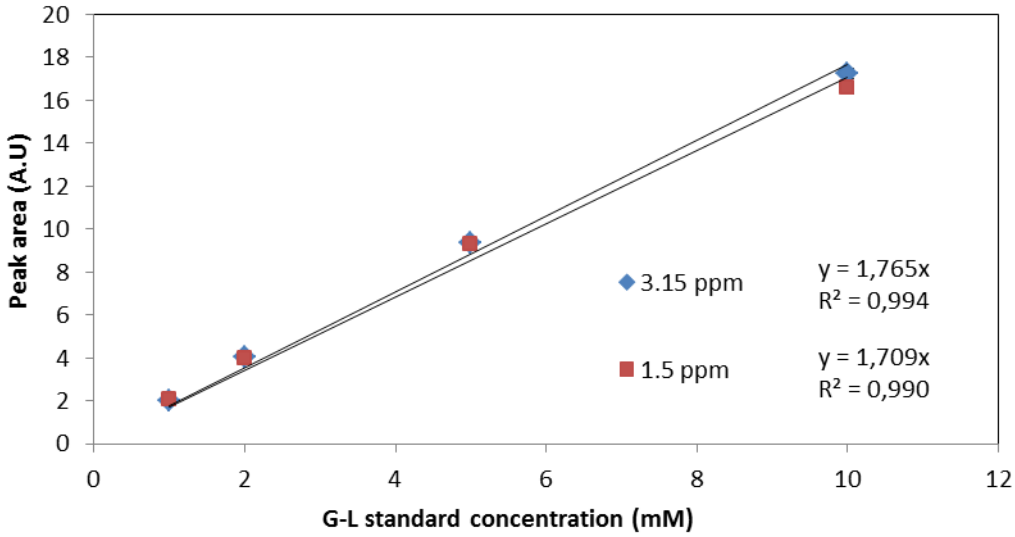


Figure.III.11. ε-(γ-glutamyl) lysine standard curves drawn from the pic areas of 1.50 and 3.15 ppm 1H NMR resonances as a function of standard concentration.

III.2.2.4. Determination of crosslinking degree

The crosslinking degree (CD) can be determined by two methods. In the first method, it is calculated from the ratio between the amount of experimental Gln-Lys formed and the theoretical one. The second method of CD determination is based on the relative decrease of the lysine ε-methylene protons resonance intensity (approximately at 3.0 ppm) of treated and untreated-MTGase samples as proposed by de Kruif (2002) [12]. In sample h, the strong decrease in resonance intensity at 2.94 ppm is the proof of a high degree of cross-linking which is quantified at about 95%.

Both methods have limitations regarding the characteristics of real substrates to which they could be applied. In the first one, the theoretical amount of GL fragment in real matrices, proteins or peptides, is not always known. This requires the use of other methods such as the

free lysine amount determination by ortho-phthalaldehyde (OPA) or trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) spectrophotometry [14, 20]. The limit of the second method is the identification of lysine ε-methylene protons resonance which can be overlapped by other resonances.

Compared to the LC-MS method involving proteolytic digestion [11], the newly developed ^{1}H NMR method provided a rapid and convenient analytical tool for the Gln-Lys isopeptide quantitative determination. The analysis time is reduced from 7 days for LC-MS method to 2 hours for ^{1}H NMR without any sample pretreatment. The proteolytic digestion used in the LC-MS method aims, by cleaving peptide bonds, to break down a complete peptide into amino acids. Thus, the Gln-Lys fragment, resistant to proteolytic attack [4], is released and becomes detectable by mass spectrometry. Therefore, the LC-MS method is well adapted only for proteins and polypeptide chains. It can't be used for molecules containing bonds other than peptide bonds such as the studied models which are protected with CBZ and acetyl groups. For this reason, the quantitative Gln-Lys determination by 1H NMR method was not compared with the LC-MS method in this study. Furthermore, the newly developed ^{1}H NMR method permits to determine the crosslinking degree at the same time with the identification and quantification of Gln-Lys fragment which is not allowed by the LC-MS method.

III.2.3. Conclusion

^{1}H NMR spectroscopy was used to study transglutaminase crosslinking reaction. Following enzymatic treatment of model substrates, new resonances as well as significant decrease in others were observed on their ^{1}H NMR spectra. Based on these spectral data, it was proved that it is possible to simultaneously quantify the Gln-Lys bond and determine the crosslinking degree which is not allowed with other chemical methods. The prospective adjustment of ε-(γ-glutamyl)-lysine isopeptide quantification in real matrix will allow ^{1}H NMR spectroscopy to be used as an alternative method to HPLC-MS, reducing analysis time from 7 days to 2 hours.

III.2.4. References

[1] Y. Zhu, A. Rinzema, J. Tramper, J. Bol, Microbial transglutaminase-a review of its production and application in food processing, Applied Microbiology and Biotechnology 44 (1995) 277-282.

[2] R.A. Chica, P. Gagnon, J.W. Keillor, J.N. Pelletier, Tissue transglutaminase acylation: Proposed role of conserved active site Tyr and Trp residues revealed by molecular modeling of peptide substrate binding, Protein Science 13 (2004) 979-991.

[3] J.E. Folk, Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase: VI. Order of substrate addition, journal of biological chemistry 244 (1969) 3707-3713.

[4] M. Griffin, R. Casadio, C.M. Bergamini, Transglutaminases: nature's biological glues, Biochemical Journal 368 (2002) 377-396.

[5] D. Serafini-Fracassini, S. Del Duca, Transglutaminases: Widespread cross-linking enzymes in plants, Annals of Botany 102 (2008) 145-152.

[6] K. Yokoyama, N. Nio, Y. Kikuchi, Properties and applications of microbial transglutaminase, Applied Microbiology and Biotechnology 64 (2004) 447-454.

[7] G.A.H. DeJong, S.J. Koppelman, Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications, Journal of Food Science 67 (2002) 2798-2806.

[8] M. Motoki, Y. Kumazawa, Recent research trends in transglutaminase technology for food processing, Food Science and Technology Research 6 (2000) 151-160.

[9] M.L. Miller, G.V.W. Johnson, Rapid, single-step procedure for the identification of transglutaminase-mediated isopeptide crosslinks in amino acid digests, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 732 (1999) 65-72.

[10] H. Sakamoto, Y. Kumazawa, H. Kawajiri, M. Motoki, ε-(γ-Glutamyl)lysine crosslink distribution in foods as determined by improved method, Journal of Food Science 60 (1995) 416-420.

[11] C. Schafer, M. Schott, F. Brandl, S. Neidhart, R. Carle, Identification and quantification of ε-(γ-glutamyl)-lysine in digests of enzymatically cross-linked leguminous proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS), Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (2005) 2830-2837.

[12] C.G. De Kruif, R. Tuinier, C. Holt, P.A. Timmins, H.S. Rollema, Physicochemical study of k- and β-casein dispersions and the effect of cross-linking by transglutaminase, Langmuir 18 (2002) 4885-4891.

[13] J.E. Folk, Transglutaminase (guinea pig liver), Academic Press, New York, 1970.

[14] C. Dinnella, M.T. Gargaro, R. Rossano, E. Monteleone, Spectrophotometric assay using o-phtaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein, Food Chemistry 78 (2002) 363-368.

[15] T. Ohtsuka, M. Ota, N. Nio, M. Motoki, Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 64 (2000) 2608-2613.

[16] J.J. Grootjans, P.J.T.A. Groenen, W.W. de Jong, Substrate requirements for transglutaminases: Influence of the amino acid residue preceding the amine donor lysine in a native protein, journal of biological chemistry 270 (1995) 22855-22858.

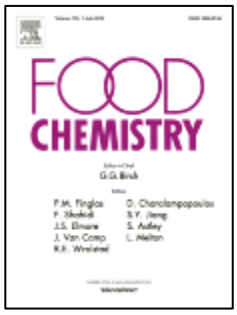
[17] J.E. Folk, P.W. Cole, Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase, journal of biological chemistry 240 (1965) 2951-2960.

[18] J.E. Folk, P.W. Cole, Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase: I. Purification and properties of the enzyme: Identification of a functional cysteine essential for activity, Journal of Biological Chemistry 241 (1966) 5518-5525.

[19] A. Djoullah, N. Sok, Y. Djemaoune, F. Husson, R. Saurel, ^{1}H NMR spectroscopy as tool to study transglutaminase crosslinking of pea globulin, in: K. Petrotos, A. Filintas (Eds.), FaBE 2013 International Conferences on Food and Biosystems Engineering, Technological Educational Institute of Thessaly, Skiathos Island, GREECE, 2013, pp. 351-355.

[20] C.Y. Gan, L.H. Cheng, A.M. Easa, Assessment of cross-linking in combined cross-linked soy protein isolate gels by microbial transglutaminase and maillard reaction, Journal of Food Science 74 (2009) C141-C146.

III.3. Article 2: Suivi des liaisons intramoléculaires



Size measuring techniques as tool to monitor pea proteins intramolecular crosslinking by transglutaminase treatment

Attaf Djoullah, Ghali Krechiche, Florence Husson*, Rémi Saurel*. *Food Chemistry* (Submitted).

Abstract

In this work, techniques for monitoring the intramolecular transglutaminase cross-links of pea proteins, based on protein size determination, were developed. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis profiles of transglutaminase-treated low concentration (0.01% w/w) pea albumin samples, compared to the untreated one (control), showed a higher electrophoretic migration of the major albumin fraction band (26 kDa), reflecting a decrease in protein size. This protein size decrease was confirmed, after DEAE column purification, by dynamic light scattering (DLS) where the hydrodynamic radius of treated samples appears to be reduced compared to the control one.

Résumé

Dans ce travail, des techniques de mesure de taille ont été adaptées pour le suivi des liaisons intramoléculaires des protéines de pois. Les profils d'électrophorèse d'échantillons d'albumine à très faible concentration (0.01% m/m), par rapport au témoin, ont montrés une migration électrophorétique plus importante du polypeptide majoritaire (PA2 26 kDa), reflétant une diminution de la taille de la protéine. Cette diminution de taille a été confirmée, après une purification de la PA2 sur une colonne d'échange ionique (DEAE), avec la diffusion dynamique de la lumière, où le rayon hydrodynamique des échantillons traités semble réduit par rapport au témoin.

III.3.1. Introduction

Microbial transglutaminase (MTGase) is an enzyme widely used in foodstuffs to improve textural and functional properties of proteins (restructuration of meat, fish, and seafood products). Furthermore, it is admitted that processing of protein isolates with MTGase, modifying their techno-functional properties, will open up new areas of applications such as microencapsulation of bioactive molecules (Yokoyama, Nio, & Kikuchi, 2004). Therefore, to achieve the intended application in the desired way, controlling of the reaction in the course of the cross-linking process is a prerequisite. In proteins, MTGase catalyses acyl-transfer reactions between carboxyamide groups (acyl donors) of glutamine residues and ε amino group of lysines (acyl acceptors), leading to the formation of ε-(γ-glutamyl)-lysine (Gln-Lys) crosslinks. The resulting isopeptide bonds contribute to the formation of a stable protein network via intermolecular and intramolecular cross-links. The intermolecular bonds are formed between two proteins and more leading to the formation of high molecular weight polymers, which result in aggregation or even gelation. The intramolecular bonds are formed within one protein molecule resulting on more compact structure with a reduced hydrodynamic radius of this molecule (Mariniello, Giosafatto, Di Pierro, Sorrentino, & Porta, 2007).

The effect of enzymatic crosslinking can be followed by observing changes in rheological properties of the system (Sun & Arntfield, 2011), electrophoretic (Basman, Köksel, & Ng, 2002), and chromatographic (Anuradha & Prakash, 2009) profiles of proteins, as well as decreases in free amino acid groups (Dinnella, Gargaro, Rossano, & Monteleone, 2002) and Gln-Lys (Schafer, Schott, Brandl, Neidhart, & Carle, 2005; Djoullah, Sok, Djemaoune, Penouilh, Husson, & Saurel, 2015) quantification. All these technics are complementary and their combination allows a good understanding of the crosslinking process. However, these methods are limited to evaluate the overall effect (apparent) generated by enzymatic treatment. Indeed, the decrease of hydrodynamic size of protein molecules, resulting from intramolecular crosslinks, is negligible compared to the size increase of simultaneously formed polymers by intermolecular crosslinks, which makes hard the distinction between the two types of bonds.

In the case of a classical application of textural modification, where intermolecular crosslinks type is mainly desired, these methods are still valid and effective. But for an

application like encapsulation (Fig.III.12a), where the two types of intra and intermolecular crosslinks are involved in the performance of the microcapsule, these methods are unable to distinguish between each type of bonds influencing the properties of the formed network, especially for intramolecular crosslinks. This appears capital towards the retention and release of the encapsulated molecules during storage, passage in the mouth or in the gastrointestinal tract.

The aim of this study is to develop analytical tools capable to qualitatively follow the intramolecular crosslinking during the transglutaminase treatment applied to a pea albumin fraction.

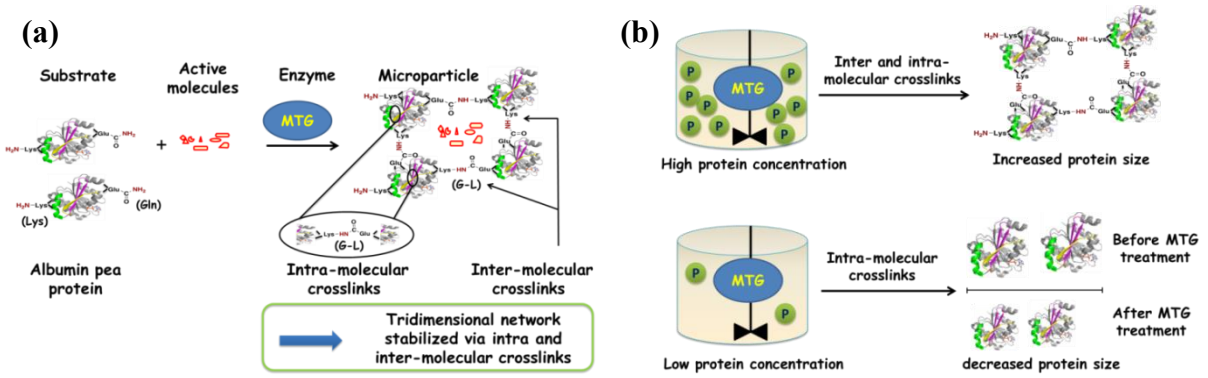


Figure III.12. (a) Encapsulation of bioactive molecules in microparticles prepared by transglutaminase crosslinking reaction. Lys: lysine; Gln: glutamine; MTG: Microbial-Transglutaminase. (b) Modulation of protein concentration as differentiation strategy between intra and inter-molecular crosslinks. P: protein.

III.3.2. Results and discussion

In all cases, both crosslink types led to a change in size. Indeed, the intramolecular bonds reduce the protein hydrodynamic radius, whereas the intermolecular bonds increase the size by producing polymers (DeJong & Koppelman, 2002). Thus, our strategy to follow the intramolecular crosslinks is based on size measuring methods by using SDS-PAGE and DLS techniques. To validate our hypothesis, we first selected the pea albumin protein fraction as substrate to MTGase because pea albumin (i) is easy to extract and to purify, (ii) is rich in glutamine and lysine (Bhatty, 1982; Leterme, Monmart, & Baudart, 1990), and (iii) is a small protein composed of an abundant polypeptide (PA2= 26 kDa) which can be easily followed

by SDS-PAGE. Next, Alb was treated at decreasing protein concentration (down to 0.01% w/w) with MTGase in order to promote intramolecular crosslinks. Indeed, at low protein concentration the probability that two proteins are close to each other and react together is low. Thereby, MTGase could catalyze the formation of Gln-Lys bonds in the same protein easier than between two different proteins. Thus intramolecular crosslinks are able to be favored than intermolecular ones (Fig.III.12b).

III.3.2.1. SDS-PAGE and DLS profiles

Electrophoresis experiments were realized in denatured (SDS) and reduced (DTT) conditions to break down non-covalent and disulfide bonds naturally present in proteins or formed during enzymatic treatment due to ionic strength and thermal effects following stopping reaction. This denatured and reduced conditions allowed visualizing only covalent links (Gln-Lys) effect, non-affected by SDS and DTT, resulting from MTGase crosslinking reaction. The profiles of 0.1% and 0.01 % (w/w) of Alb fractions treated with MTGase were shown in Fig.III.13a. After enzymatic treatment, changes in the profiles were evident. Both concentrations of MTGase-treated Alb showed a smearing at the top of the gel induced by polymers formation via intermolecular cross-links, as well as decrease of the intensity of some protein bands. Moreover, the 0.01% MTGase-treated Alb profiles compared to the untreated one (control) show a higher electrophoretic migration of the band (26 kDa), the major pea albumin polypeptide (PA2), and the appearance of a new band with a molecular weight of about 52 kDa. The higher electrophoretic migration reflects a change in hydrodynamic size which is most likely resulting from intramolecular crosslinks catalyzed by MTGase (Mariniello, et al., 2007). The new band observed around 52 kDa was probably a dimer of PA2 formed following the enzymatic reaction.

Conversely, when higher protein concentration (0.1% w/w) is used, these two last results were not observed, thus our hypothesis that the use of low protein concentration favors the appearance of intramolecular crosslinks is verified. To confirm these results, MTGase-treated Alb was subjected to DLS analysis to follow the evolution of particle mean diameters as a function of Alb concentration. However, DLS results showed non-Gaussian profiles and polydisperse size distributions due to the heterogeneity of Alb fraction which contains some contaminations from pea globulins during extraction process. Alb fraction was then purified

before MTGase treatment to produce PPA. The elution profile and SDS-PAGE characterization of collected fractions were presented in Fig.III.13b.

The PPA fraction was subjected to MTGase treatment as described previously for Alb fraction. The SDS-PAGE analysis of MTGase-treated PPA (0.01% w/w) was presented in Fig.III.13c. The profile of untreated MTGase purified fraction (control, Fig.III.13c), compared to total fraction (control, Fig.III.13a), showed only one band at 26 kDa (PA2) reflecting an efficient purification. After MTGase treatment, the mobility of the band inside the gel varied progressively depending on incubation time. It is well-known in electrophoresis technique that protein migration mostly depends on both net charge and stokes radius. Since SDS confers to proteins a negative charge, the higher electrophoretic mobility is mainly due to the stokes radius value, which should be lower when the intramolecular links occurred. Indeed, this size decrease is maybe due to the formation of covalent bonds between the polypeptide chains constituting the same protein (intramolecular bonds) which approximate these chains from each other, leading to a more compact protein structure with reduced size. This phenomenon, corresponding to higher electrophoretic migration, has been already observed on phaseolin (Mariniello, et al., 2007) and ovalbumin (Giosafatto, et al., 2012) MTGase-treated proteins indicating that intramolecular crosslinks were formed. These crosslinked proteins were more resistant to enzymatic digestion than the untreated ones, thus, suggesting the possibility of a novel use as drug delivery system with additional internal pockets due to intramolecular crosslinks.

This result was confirmed by DLS technique (Fig.III.13d) where it was clearly shown that the mean diameter of MTGase-treated 0.01% PPA was lower than the control. Conversely, when higher concentrations of PPA were used (0.1, 0.5 and 1% w/w), the particle mean diameters increased with protein concentration reflecting the formation of high molecular weight particles as a result of intermolecular crosslinks.

III.3.3. Conclusion

In summary, we have developed a simple strategy based on modulation of protein concentration to orientate the intramolecular crosslinks, which could be observed by size measuring techniques SDS-PAGE and DLS. A study based on high performance liquid chromatography- size exclusion chromatography- multi angles light laser scattering (HPLC-

SEC-MALLS) seems to be interesting to investigate in order to avoid additional purification steps.

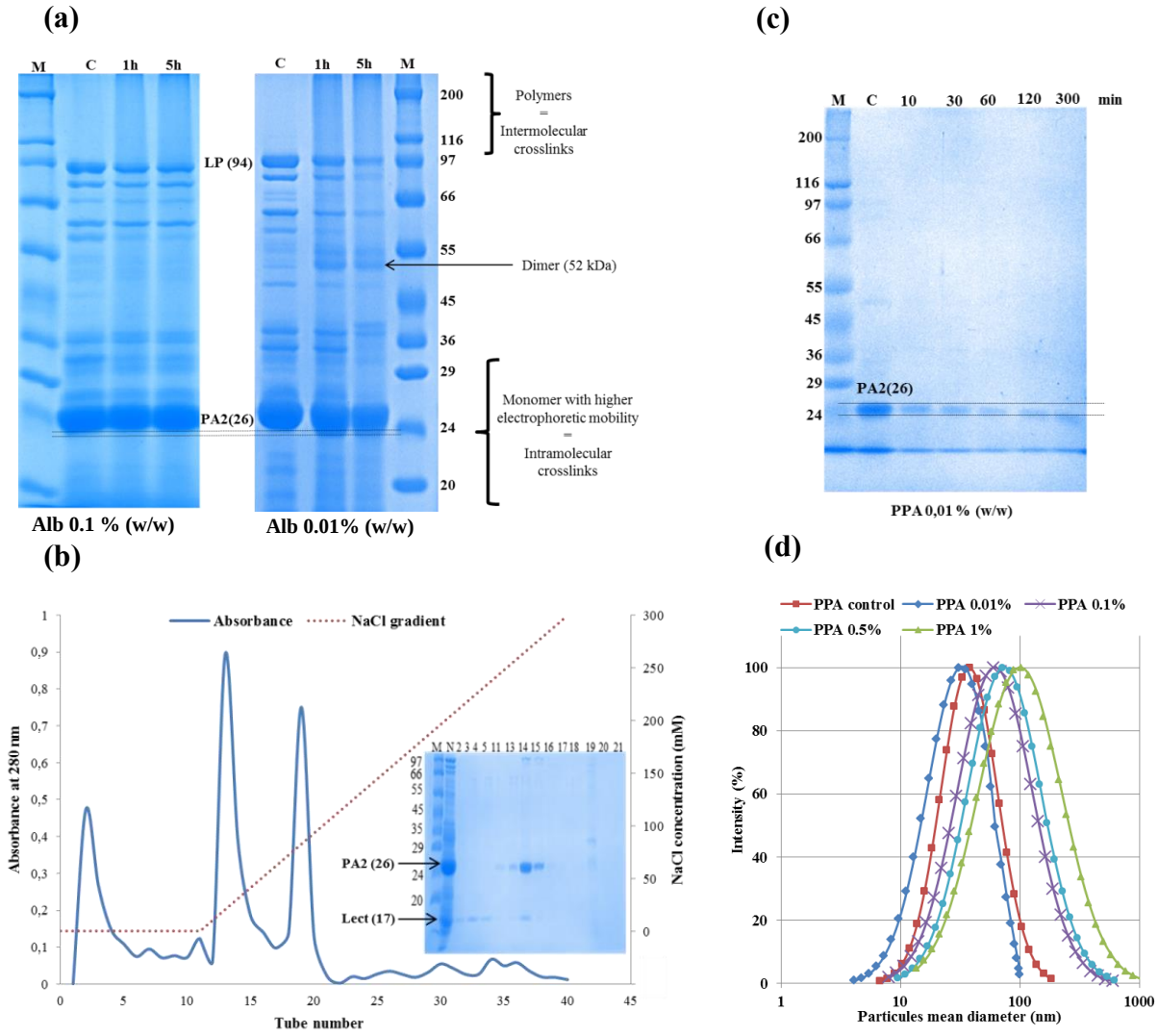


Figure.III.13. (a) SDS-PAGE (10%) analysis of 0,1% left and 0,01% (w/w) right predenaturated (80 °C, 20 mM DTT) total pea albumin fraction (Alb) treated with MTGase (250 units/g protein) at 40°C, pH 7 for 1 and 5 h. Control (lane C) was simultaneously run for 5 h in the absence of MTGase; M, protein markers. The molecular mass of each standard is indicated in the right margin of the gel. LP, lipoxygenase ; PA2, major polypeptide albumin. (b) Elution profile of total pea albumin fraction (Alb) off DEAE Sepharose Fast Flow column. (Inset) SDS-PAGE analysis of fractions eluted off the column indicated by tube number on top of the gel lanes. M, protein markers; N, protein loaded on to the column (Alb); the

molecular mass of each standard is indicated in the left margin of the gel. PA2, major polypeptide albumin 26 kDa; Lect, lectin 17 kDa. (c) SDS-PAGE analysis of 0,01% (w/w) predenaturated (80°C, 20 mM DTT) purified pea albumin fraction (PPA) treated with MTGase (250 units/g protein) at 40°C and pH7 for different incubation times. M, protein markers. The molecular mass of each standard is indicated in the left margin of the gel. Control (lane C) was simultaneously run for 300 min in the absence of MTGase. Incubation times are indicated on the top of gel lanes per min. PA2, major polypeptide albumin 26 kDa. (d) Particle size distribution of MTGase treated purified pea albumin (PPA) incubated 5 h at different concentrations with 250 units of MTGase /g PPA at 40 °C and pH 7. Control (0.01% w/w) was simultaneously run for 300 min in the absence of MTGase. The mean diameters of Control; 0.01%; 0.1%; 0.5%; and 1% (w/w) PPA were 43.5; 41.2; 75; 95; and 138 nm respectively. All analyses were performed in triplicate.

III.3.4. References

Anuradha, S. N., & Prakash, V. (2009). Altering functional attributes of proteins through cross linking by transglutaminase - A case study with whey and seed proteins. *Food Research International, 42*(9), 1259-1265.

Basman, A., Köksel, H., & Ng, P. K. W. (2002). Effects of transglutaminase on SDS-PAGE patterns of wheat, soy, and barley proteins and their blends. *Journal of Food Science, 67*(7), 2654-2658.

Bhatty, R. S. (1982). Albumin proteins of eight edible grain legume species. Electrophoretic patterns and amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30*(3), 620-622.

Crévieu, I., Bérot, S., & Guéguen, J. (1996). Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. *Food / Nahrung, 40*(5), 237-244.

DeJong, G. A. H., & Koppelman, S. J. (2002). Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications. *Journal of Food Science, 67*(8), 2798-2806.

Dinnella, C., Gargaro, M. T., Rossano, R., & Monteleone, E. (2002). Spectrophotometric assay using o-phtaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. *Food Chemistry, 78*(3), 363-368.

Djoullah, A., Sok, N., Djemaoune, Y., Penouilh, M.-J., Husson, F., & Saurel, R. (2015). Monitoring of transglutaminase crosslinking reaction by 1H NMR spectroscopy on model substrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, In press: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.066.

Folk, J. E. (1970). Transglutaminase (guinea pig liver). In Tabor H and Tabor WC (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 17, pp. 889-894). New York: Academic Press.

Giosafatto, C. V. L., Rigby, N. M., Wellner, N., Ridout, M., Husband, F., & Mackie, A. R. (2012). Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin. *Food Hydrocolloids, 26*(1), 261-267.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature, 227*(5259), 680-685.

Leterme, P., Monmart, T., & Baudart, E. (1990). Amino acid composition of pea (*Pisum sativum*) proteins and protein profile of pea flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 53*(1), 107-110.

Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., Di Pierro, P., Sorrentino, A., & Porta, R. (2007). Synthesis and resistance to in vitro proteolysis of transglutaminase cross-linked phaseolin, the major storage protein from phaseolus vulgaris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(12), 4717-4721.

Schafer, C., Schott, M., Brandl, F., Neidhart, S., & Carle, R. (2005). Identification and quantification of ε-(γ-glutamyl)-lysine in digests of enzymatically cross-linked leguminous proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(8), 2830-2837.

Sun, X. D., & Arntfield, S. D. (2011). Gelation properties of chicken myofibrillar protein induced by transglutaminase crosslinking. *Journal of Food Engineering, 107*(2), 226-233.

Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology, 64*(4), 447-454.

IV. Conclusion du chapitre

Les techniques utilisées pour le suivi de la réticulation enzymatique (HPLC/ MS, OPA, TNBS et SDS-PAGE) ont montré leur efficacité, complémentarité et concordance ainsi que leurs limites en terme de résultats obtenus. La formation des liaisons intramoléculaires ne concerne que certains peptides de la fraction Glob et le type d'interaction entre eux semble aléatoire. Le degré de réticulation atteint un palier après 2 heures d'incubation et tend vers une valeur maximum de 25 %. La méthode OPA est à utiliser avec précaution pour les matrices à grandes concentrations protéiques.

La spectroscopie RMN du proton est une méthode pratique, rapide et non destructive pour étudier la réaction de réticulation enzymatique. Aucun prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Elle permet non seulement la quantification du fragment Gln-Lys, mais aussi la détermination du degré de réticulation comblant ainsi les limites de l'HPLC-MS, mais elle reste toujours incapable de distinguer les liaisons intra- et inter-moléculaires. L'ajustement de cette méthode sur des matrices réelles, permettra à la RMN ^{1}H d'être utilisée comme une alternative à la méthode HPLC-MS, réduisant le temps d'analyse de 7 jours à 2 heures.

La migration électrophorétique (SDS-PAGE) ainsi que le changement du diamètre moyen des particules (DLS) ont pu mettre en évidence la différence entre les liaisons intra- et inter-moléculaires et ce par la maîtrise de la concentration protéique. Une étude par HPLC-SEC-MALLS semblerait intéressante à mettre en œuvre afin d'éviter les étapes de purification supplémentaires.

Chapitre IV : Comportement des protéines de pois vis-à-vis de la réticulation enzymatique

I. Introduction

Pour qu'une protéine soit un bon substrat pour la MTGase, elle doit contenir suffisamment de résidus glutamine et lysine accessibles. Certaines protéines, telles que les caséinates et la gélatine, sans structure tertiaire sont facilement réticulées. Par contre, de nombreuses autres protéines comme la β-lactoglobuline, possédant des structures globulaires et plus compactes, sont de mauvais substrats à l'état natif **(De Jong et al., 2002)**.

Plusieurs stratégies sont possibles pour déstabiliser la structure d'une protéine dans le but de rendre les résidus glutamine et lysine plus accessibles à la MTGase. Les techniques les plus décrites sont les traitements thermique et chimique **(Jaros et al., 2006)**.

Dans ce chapitre, nous allons étudier le comportement des fractions Alb et Glob à l'état natif et dénaturé, ainsi qu'en mélange à l'état natif, vis-à-vis du traitement enzymatique dans le but d'évaluer leur aptitude à constituer un réseau gélifié pouvant servir de support d'encapsulation. Il s'agit de déterminer la concentration minimale de gélification enzymatique, le rendement de réticulation ainsi que les propriétés rhéologiques et la microstructure des gels formés tout en optimisant les paramètres de la réaction enzymatique.

Le travail consistera dans un premier temps à étudier les fractions Alb et Glob à l'état natif comme substrat de la MTGase. Ce travail a fait l'objet d'un article soumis dans « Process Biochemistry ».

Dans un second temps, il s'agira de comprendre l'effet de la pré-dénaturation thermique et chimique (DTT) des fractions Alb et Glob sur la cinétique enzymatique ainsi que sur les propriétés de structure des systèmes étudiés.

La troisième étape consistera à mettre en évidence la synergie de comportement existant lorsque la fraction protéique totale de pois à l'état natif (un mélange de 20% Alb et 80% Glob) est soumise à l'action de l'enzyme. Il s'agirait d'une nouvelle stratégie d'amélioration du rendement de réticulation.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

La poudre de pois utilisée a été fournie par la société Roquette Frères (Lestrem France). C'est une farine issue d'un mélange de plusieurs variétés. La transglutaminase microbienne (MTGase) a été fournie par la société Ajinomoto Foods Europe SAS, France. Les réactifs chimiques ainsi que les enzymes utilisés pour les différentes analyses sont de grade analytique et commercialisés par la société Sigma Aldrich® (France) et VWR (France).

II.2. Méthodes

II.2.1. Extraction et purification des protéines

L'extraction sélective et successive des fractions albumines (Alb) et globulines (Glob) a été réalisée en fonction de leurs solubilités (les albumines dans l'eau et les globulines dans les tampons salins) selon **Crévieu et al., (1996).** Le protocole d'extraction et de purification a été décrit dans le chapitre II (§ II.2.1.1).

L'extraction de la fraction protéique totale (PPT) a été réalisée par la dispersion de 100 g de farine de pois dans un 1 litre de tampon phosphate (0.1 M, pH 8 en présence de 1% K_2SO_4) pendant 1 h à 4 °C. La fraction protéique (surnageant) a été récupérée par centrifugation (12000 x g, 10 min) puis concentrée (5 fois par ultrafiltration) et purifiée par diafiltration (contre 10 volumes d'une solution de 5 mM de carbonate d'ammonium). L'extrait protéique de pois obtenu est ensuite congelé et lyophilisé. Les poudres récupérées dans chaque extraction ont été rassemblées, broyées et conservées à -20°C. Le dispositif de filtration utilisé (Millipore Pellicon 2®) est équipé d'une cassette « Kvick » d'une surface de 0.11 m^2 et un seuil de coupure de 10 kDa. La pression à l'intérieur du dispositif a été réglée à 2,2 bars.

II.2.2. Pré-dénaturations thermique et chimique des fractions Alb et Glob

Des solutions de Glob et d'Alb ont été préparées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) aux concentrations désirées. Après une heure d'agitation, les solutions protéiques ont été séparées en trois parties distinctes. La première partie a été dénaturée thermiquement (chauffage 80 °C pendant 1h avec une rampe de chauffage et de refroidissement de 1°C /

min). La deuxième a été dénaturée chimiquement (incubation avec 20 mM de DTT pendant une nuit à température ambiante). La troisième partie n'a subi aucun traitement, elle est restée à l'état natif. Tous les mélanges ont été préparés en absence de sel (NaCl 20 mM) pour ne pas affecter les propriétés de gélification thermique, notamment la concentration minimale de gélification thermique.

II.2.3. Incubation et suivi de la réaction enzymatique

Des solutions protéiques natives et dénaturées des fractions Alb et Glob séparément et en mélange ainsi que des solutions natives de la fraction PPT ont été incubées avec la MTGase dans différentes conditions de concentration protéique, de température, de pH et de ratio enzyme/protéine. A des intervalles de temps allant de 10 à 300 min, la réaction a été arrêtée par chauffage (90 °C, 5 min) et les solutions ont été congelées, lyophilisées puis analysées par SDS-PAGE, par la méthode spectrophotométrique à l'OPA, par HPLC-MS comme décrit précédemment (Chapitre III, § II.2.2). En parallèle, et pour chaque expérience, des échantillons témoins ont subi les mêmes traitements en absence de MTGase.

II.2.4. Concentration minimale de gélification enzymatique

La détermination de la concentration minimale de gélification enzymatique (CMG_{Enzy}) des fractions protéiques de pois natives et dénaturées (Alb, Glob et PPT) a été adaptées à partir de travaux précédents de gélification thermique **(Boye et al., 2010)**. Des concentrations protéiques des différentes fractions allant de 1 à 10% (m/m) ont été préparées dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7) et mises dans des tubes en verre. Une quantité d'enzyme a été ajoutée dans chaque tube à raison de 20 unités de MTGase / g de protéine. Le mélange a été vortexé pendant 1 min et incubé à 40 °C pendant 10 heures. Pour évaluer la formation des gels, les tubes ont été retournés. La concentration minimale de gélification enzymatique est la concentration critique à partir de laquelle le gel formé ne coule pas.

II.2.5. Rhéologie des gels

Des échantillons protéiques (1.5 ml) à une concentration de 10% (m/m) ont été introduits avec une quantité d'enzyme (20 unités MTGase/g protéine) dans des tubes ependorf (2ml). L'ensemble a été rapidement vortexé (1 min pour disperser la MTGase), centrifugé (1000xg, 1 min pour éliminer les bulles d'air) puis 1 ml a été déposé dans le plateau d'un

rhéomètre (SR-5000, Rheometric Scientific, Piscataway, NJ, Etats-Unis) équipé d'une géométrie de type plan-plan (d= 25 mm). Les mesures ont été réalisées en contrainte imposée (0.5- 2 Pa déterminée par des pré-tests) à une fréquence de 1 rad/s et un entrefer (GAP) de 1mm. La régulation en température se fait par l'intermédiaire du plateau inférieur, équipé d'un thermostat à effet Peltier. Le dispositif anti-évaporation est constitué d'une enceinte amovible, que l'on remplit d'huile minérale jusqu'à ce que l'échantillon soit complètement recouvert. L'évolution des modules de stockage G' et de perte G'' a été enregistrée en fonction du temps (cinétique), de la fréquence (spectre mécanique) ainsi que de la contrainte (domaine linéaire) à l'aide du logiciel RSI Orchestrator version (V.6.5.8).

II.2.6. Etudes de la microstructure des gels par microscopie confocal à balayage laser (MCBL)

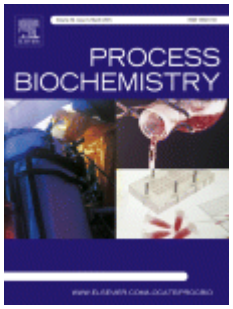
Des solutions protéiques de pois à 10 % (m/m), natives et dénaturées, préparées comme décrit précédemment, ont été marquées de manière non-covalente avant l'incubation enzymatique. Vingt µl d'une solution aqueuse de rhodamine B isothiocyanate (RITC, à 1 mg/ml) ont été ajoutés à 2 ml de solution protéique suivie d'une agitation à l'obscurité à 4°C pendant au moins 1 h. La RITC se fixe aux amines libres des protéines via des interactions hydrophobes. Une quantité d'enzyme, 20 unités MTGase / g de protéines, a été ajoutée et dispersée dans les solutions protéiques marquées et l'ensemble a été introduit dans des tubes en plastique, centrifugé (1000xg, 1 min pour éliminer les bulles d'air) puis incubé à 40 °C pour une période de 12 h. Les gels formés ont été ensuite démoulés et une fine coupe a été déposée sur une lamelle pour observation microscopique. L'appareillage utilisé pour examiner la microstructure des gels formés est un microscope confocal à balayage laser (MCBL) de marque Nikon modèle Eclipse TE-2000, en mode fluorescence. La source de lumière est un laser néon-argon. L'objectif utilisé ayant un taux de grossissement de 20x. Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation étaient 543 nm et comprises entre 560 and 590 nm, respectivement. L'acquisition des images a été faite en format « .JPEG » avec une résolution de 512x512 pixels.

II.2.7. Analyse statistique

Tous les essais ont été répétés au minimum trois fois. L'analyse de variance (ANOVA) des résultats a été réalisée par le logiciel XLSTAT Pro version 2013. Le test Fisher's a été appliqué avec un intervalle de confiance de 95%.

III. Résultats et discussion

III.1. Article 3: Comportement des fractions Alb et Glob à l'état natif vis-à-vis la réticulation enzymatique par la MTGase



Pea albumins and globulins behaviors at native state toward transglutaminase treatment

Attaf Djoullah, Yanis Djemaoune, Florence Husson*, Rémi Saurel*.
Process biochemistry (in revision).

Abstract

The behavior of pea albumins (Alb) and globulins (Glob) at native state toward microbial transglutaminase (MTGase) treatment was studied. Up to 10% (w/w) concentration, only Glob was able to form gel with minimum gelling concentration and crosslinking degree of 6% (w/w) and 25% respectively. The most affected Glob subunits were convicilin (71 kDa), Vicilins 55, 50 and 35 kDa as well as legumin acidic subunit (40 kDa). Whereas, the legumin basic subunit (20 kDa) and vicilins lower than 20 kDa were almost intact in all studied conditions. The crosslinking degree of Alb was 12% which was not sufficient to form MTGase-induced gel. Albumin major polypeptide (PA2 26 kDa) was not affected neither by MTGase concentration nor by pH variation. Pea Alb and Glob at native state were ranked poor and moderately good substrates to MTGase respectively and unfolding them by thermal or chemical denaturation can be an interesting way to improve the efficiency of crosslinking reaction.

Résumé

Le comportement des fractions Alb et Glob à l'état natif vis-à-vis du traitement enzymatique a été étudié. A une concentration de 10% (m/m), uniquement la fraction Glob a été capable de former un gel avec une concentration minimale de gélification et un degré de réticulation respectivement de 6% et 25%. Les polypeptides de la fraction Glob les plus affectés par la transglutaminase étaient la conviciline (71 kDa), les vicilines 55, 50 et 35 kDa ainsi que la légumine acide (40 kDa). Par contre la légumine basique (20 kDa) et les vicilines de masses moléculaires inférieurs à 20 kDa n'ont pas été affectées par le traitement enzymatique. Le degré de réticulation de la fraction Alb (12%) n'était pas suffisant pour former un gel. Le polypeptide majoritaire (PA2 26 kDa) n'a pas été affecté ni par le ratio enzyme/protéine, ni par la variation de pH. Les fractions Alb et Glob de pois ont été respectivement évaluées mauvais et moyen substrat pour la transglutaminase, et leur dénaturation par voie thermique et chimique semble une stratégie intéressante pour améliorer leur réticulation enzymatique.

III.1.1. Introduction

Transglutaminase (TGase; E.C.2.3.2.13) is an enzyme which catalyses acyl-transfer reactions between γ-carboxyamide groups (acyl donor) of glutamine residues and free amino groups (acyl acceptor). In proteins, lysine residues act as acyl acceptor and lead to the formation of ε-(γ-glutamyl)-lysine (Gln-Lys) crosslinks [1]. As a consequence, textural and functional properties of proteins such as gelling [2], water holding capacity [3], solubility [4], interfacial properties [5] and thermal stability [6] can be improved opening a wide range of applications.

Beyond foodstuffs texturization, the first feasibility studies aimed to use the transglutaminase as natural glue for binding restructuring fish or meat pieces together in desired shapes [7]. TGase was also used to improve nutritional value by lysine incorporation in proteins [8]. Babin and Dickinson [9] showed the possibility to control the thermo-reversibility gelation of gelatin by additional covalent TGase-induced crosslinks which is desirable in pastry and confectionery industries. TGase was used to produce edible films from gelatin and casein proteins [10]. Bronts and others [11] have described the preparation of a modified protein ingredient based on TGase-induced heteropolymer between plant (wheat) and animal (whey) proteins. It is also possible to use TGase as strategy to encapsulate bioactive compounds [12]. The encapsulation can be achieved by emulsification and subsequent TGase-gelation process, thus overcoming the limitations of thermal and chemical-gelation methods [13, 14].

Among these applications, the encapsulation of bioactive compounds is especially interesting. Indeed, the TGase-resulting isopeptide bond (Gln-Lys) is highly resistant to mechanical stress and proteolytic degradation [15]; it contributes to the formation of a stable protein network via intermolecular and intramolecular cross-links [16]. Such supports are suitable to be used as shell or matrix materials for developing new bioactive delivery systems. However, most of the applications dealt with animal proteins, TGase has rarely been used with plant proteins, at the exception of soybean and wheat [17]. With the increasing demand for vegetarian foods as well as economic dependence on soy producing countries [18], utilization of novel plant proteins source as functional ingredients looks necessary. Mainly used as protein source in animal feed, pea (*Pisum sativum* L.) proteins could represent an alternative to soybean as functional ingredient in human food [17, 19].

Pea proteins represent 20-30% of total dry pea seed; they are mainly composed of 50-60% globulins and 15-25% albumins [20]. Pea globulins (Glob) are salt-soluble proteins and are composed of two major groups, legumin-type (11S) and vicilin-type (7S) families. Legumin, has been described as a hexameric protein of between 360 and 400 kDa. Each monomer consists of a 40 kDa acidic subunit and a 20 kDa basic subunit linked by disulphide bonds [21]. It is hypothesized that most of legumin acidic subunits are situated on the surface of protein, while the basic subunits constitute the inner hydrophobic core [22]. Compared to legumins, vicilins structure is less studied and defined. It is admitted that it is a trimer of about 160-200 kDa. Subunits composition of pea vicilin varies mostly because of post-translation processing. Mainly, vicilins consist of ~50 kDa, and 30-35 kDa subunits [23]. A third major storage protein, named convicilin (7S), has a subunit of ~71,000 and a molecular weight in its native form of 290 kDa [24]. Somme vicilins are partially soluble at pH 4.8, while legumins are not [25]. Albumins (Alb; 2S) are water soluble proteins. Pea Alb consists mainly of two components [26]. The most abundant one is the major albumin protein (PA2) which contains two polypeptides of approximately 26 kDa. The second component is the low molecular weight albumin protein (PA1) containing tow polypeptides of approximately 6 kDa. Unlike the 2S albumins, the two polypeptides are not linked by disulfide bonds [27]. Lipoxygenases, glycosidases, protease inhibitors, and lectins belong also to the albumin fraction [18]. The pea Alb is richer in sulfur amino acids and lysine than the pea Glob and may be used to improve the methionine-cysteine levels of edible grain legumes [28]. However, because of industrial extraction, mainly isoelectric precipitation process and washing steps, where Alb is still soluble, the protein isolates contain only Glob fraction making the Alb an unexploitable fraction. The alkaline extraction followed by ultrafiltration process is desired to retain Alb in protein isolates with reduced amounts of anti-nutritional compounds [29].

The amino acid composition on glutamine and lysine (residues/ 100 residues) is 22.08 and 8.18 for convicilin, 19.18 and 8.10 for vicilin, 19.74 and 4.24 for legumin [24], whereas, for Alb it is 14.00 and 8.80 [28] respectively. These relatively high glutamine and lysine contents make Glob and Alb fractions attractive candidates for TGase crosslinking reaction. Although there are some studies using pea Glob as a substrate for TGase [17, 30, 31], no data were available in the literature concerning the use of pea Alb as substrate. The objective of this work was to compare the behavior of pea Alb and pea Glob at native state toward transglutaminase treatment. This consideration is a prerequisite to tailor pea proteins for industrial TGase applications.

III.1.2. Results and discussion

III.1.2.1. Minimum gelling concentration

The gelling ability of pea Alb and Glob fractions was evaluated with minimum gelling concentration test. The results are presented in **Figure.IV.1.** The minimum gelling concentration of Glob fraction treated whit 10 units of MTGase/ g of protein at 40 °C, 20 mM NaCl and pH 7 was 6% (w/w), whereas, in the same conditions, Alb fraction did not form gel over studied concentration range. To understand these enzymatic gelling behaviors, MTGase-treated Alb and Glob were subjected to Gln-Lys isopeptide quantification, degree of crosslinking determination and SDS-PAGE analysis.

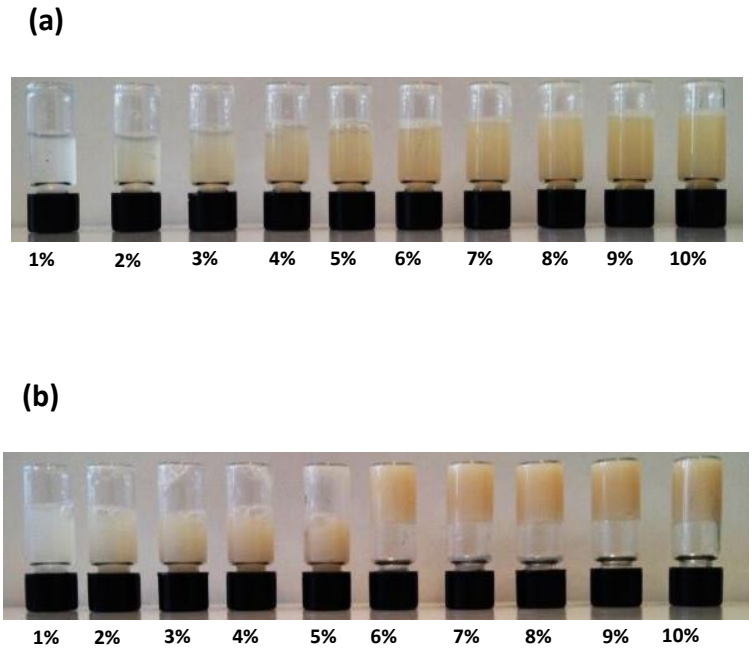


Figure.IV.1. Least gelling concentration of pea proteins fractions treated with MTGase. (a): Albumins and (b) globulins. Experiments were conducted with 10 units MTGase/g of protein at 40 °C, pH 7 and 20 mM NaCl. Protein concentrations (% w/w) are shown in the bottom of each tube.

III.1.2.2. Gln-Lys isopeptide quantification and degree of crosslinking determination

The **Figure.IV.2** showed the kinetic of Gln-Lys isopeptide bond formation of 1 % (w/w) Glob and Alb solutions treated with 10 units of MTGase/g of protein at 40 °C, 20 mM NaCl and pH 7. Before incubation (t=0), only Glob fraction contained small quantity of Gln-Lys isopeptide bond, indicating that Gln-Lys is naturally present in Glob fraction. These results are in agreement with other previous works [40, 41, 58]. After incubation with MTGase, the formation of Gln-Lys isopeptide bond increased proportionally with incubation time. The Gln-Lys formed amount in Glob fraction is 2 times higher than it was observed for Alb fraction, which could explain the better gelling ability of Glob compared to Alb. This result was further confirmed by crosslinking degree determination by OPA method which is shown in **Figure.IV.3.** Indeed, the crosslinking degree of both Alb and glob fractions increased with incubation time, reaching a plateau of 12% and 25% after 30 min and 120 min of reaction respectively. The increasing crosslinking degree is due to the progressive loss of free amino groups involved in the formation of Gln-Lys isopeptide bonds. The formed amounts of Gln-Lys isopeptide in MTGase-treated Alb and Glob as a function of incubation time were highly correlated with their degree of crosslinking determined by OPA method. The correlation coefficients were 0.942 for Alb and 0.985 for Glob.

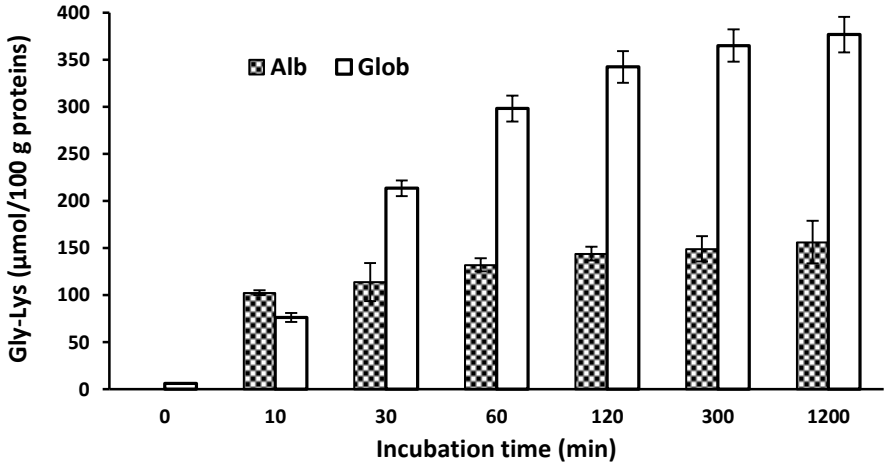


Figure.IV.2. Resulting glutamyl-lysine (Gln-Lys) bond contents in pea proteins fractions treated with 10 units MTGase/g protein at 40°C and pH 7 and 20 mM NaCl. (Alb): albumins and (Glob): globulins.

The Gln-Lys determination by HPLC-ESI-MS is the most precise method for studying MTGase crosslinking reaction [40]. However, because of extensive proteolytic digestion of MTGase-treated samples (6 days), this method becomes time consuming and very laborious. Thus, it can be replaced by free amino acid determination using OPA method since both methods are in good correlation. The OPA method was used by Dinnella et al. [39] for studying the cross-linking kinetic of casein. These results were not in accordance with those of Flanagan et al. [59], where it was suggested that free amino groups in MTGase-treated sodium caseinate were masked within the gel network making them inaccessible to the OPA reagent leading to an underestimation of free amino groups and hence overestimation of crosslinking degree.

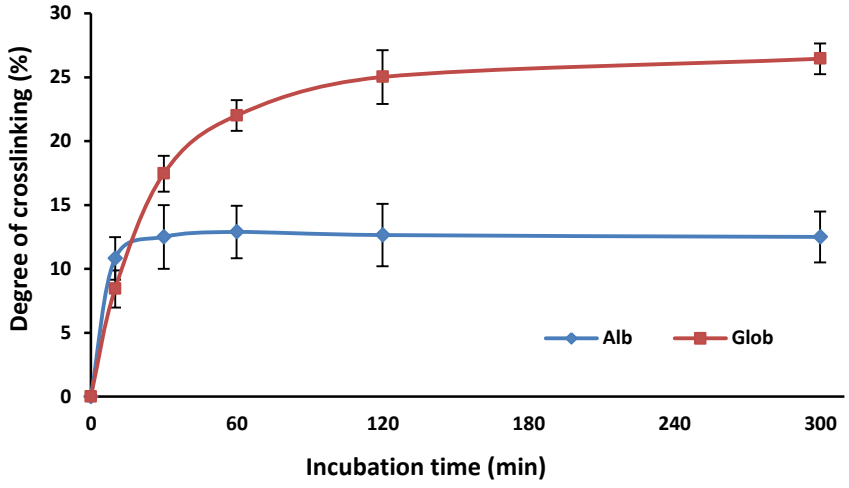


Figure.IV.3. Crosslinking degree of pea proteins fractions treated with 10 units of MTGase /g of protein at 40°C, pH7 and 20 mM NaCl as a function of incubation time. Alb: albumins; Glob: globulins.

Although native Glob is more sensitive to enzymatic treatment than Alb, it is still a modest substrate for MTGase compared to its homologous soy protein [60] with a degree of crosslinking of 25% against 78% after 5h of reaction respectively. Larré et al. [61] reported that pea legumin was a poor substrate for the enzyme despite its high content in glutamine and lysine residues. They indicated that in the native globular conformation, only the acidic polypeptides (Lα 40 kDa) were polymerized, the basic polypeptides (Lβ 20 kDa) were not affected by enzymatic treatment. The low affinity was related to the compact globular structure of these storage proteins, restricting the access to the reactive residues. However,

data on transglutaminase-treated pea legumin is not enough to explain the overall behavior of pea proteins toward transglutaminase treatment. Indeed, pea Glob in this study is composed of only 25% of legumin and the rest is Vicilins (65%) and convicilin (10%) as determined by densitometry on electrophoresis native Glob sample.

III.1.2.3. SDS-PAGE profiles

In order to better understand the behavior of each polypeptide constituting pea proteins, MTGase-treated Glob and Alb fractions were subjected to SDS-PAGE analysis. Electrophoresis experiments were realized in denatured (SDS) and reduced (DTT) conditions to break down noncovalent and disulfide bonds naturally present in proteins or formed during enzymatic treatment due to ionic strength and thermal effects following stopping reaction. This denatured and reduced conditions allowed visualizing only covalent links (Gln-Lys), non-affected by SDS and DTT, resulting from MTGase crosslinking reaction. As shown in **Figure.IV.4a and b**, both profiles revealed formation of high molecular weight polymers, demonstrated by intensified smearing at the top of the gels, thus reflecting crosslinking reaction. Compared to Alb profile, the smearing is more pronounced on Glob profile which is consistent with previous results. The majority of Glob subunits declined continuously with incubation time **(Figure.IV.1a)**. The most MTGase-affected polypeptides were convilin (71 kDa), vicilins 55, 50, 35 kDa and legumin acidic subunit (40kDa) with a decrease in band intensity of 100, 33, 100, 32 and 49% respectively. While the legumin basic subunit (20 kDa) and vicilins lower to 20 kDa were almost intact during the whole incubation. This data confirm the previous findings [61, 62].

As evidenced in **Figure.IV.4b**, Alb fraction electrophoresis profile illustrated that major albumin polypetide (PA2 26 kDa), the abundant component with 70% of total Alb composition fraction as determined by densitometry, was not affected by MTGase treatment. Only lipoxygenase (97 kDa) and some water soluble vicilins were partially cross-linked by MTGase. This can explain the low degree of crosslinking and non-ability of pea Alb fraction to form MTGase induced-gel even at 10% (w/w). Compared to other albumins, pea Alb behavior is similar to bovine serum albumin, human serum albumin, conalbumin [63, 64], ovalbumin [65] and α-lactalbumin [66].

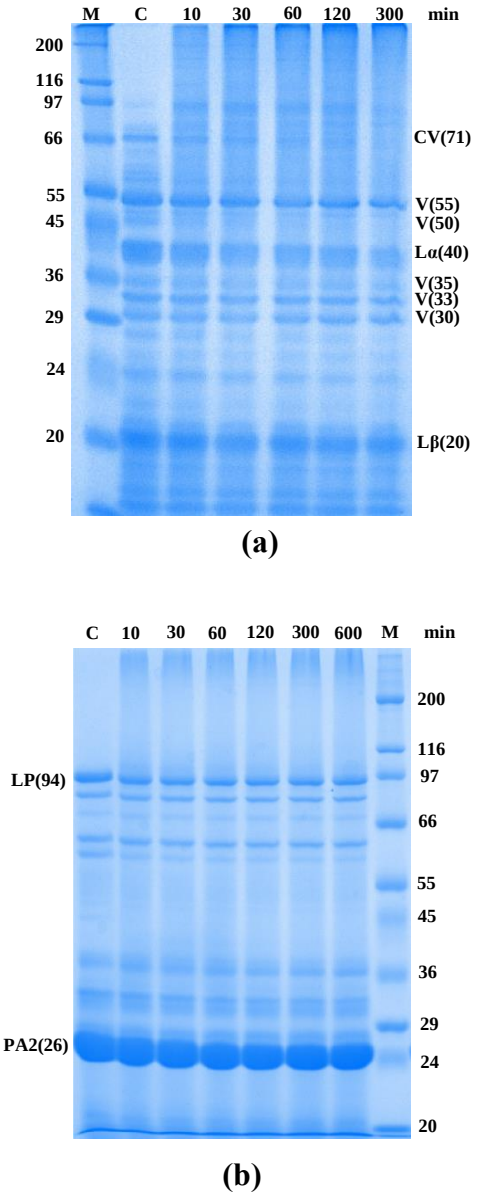
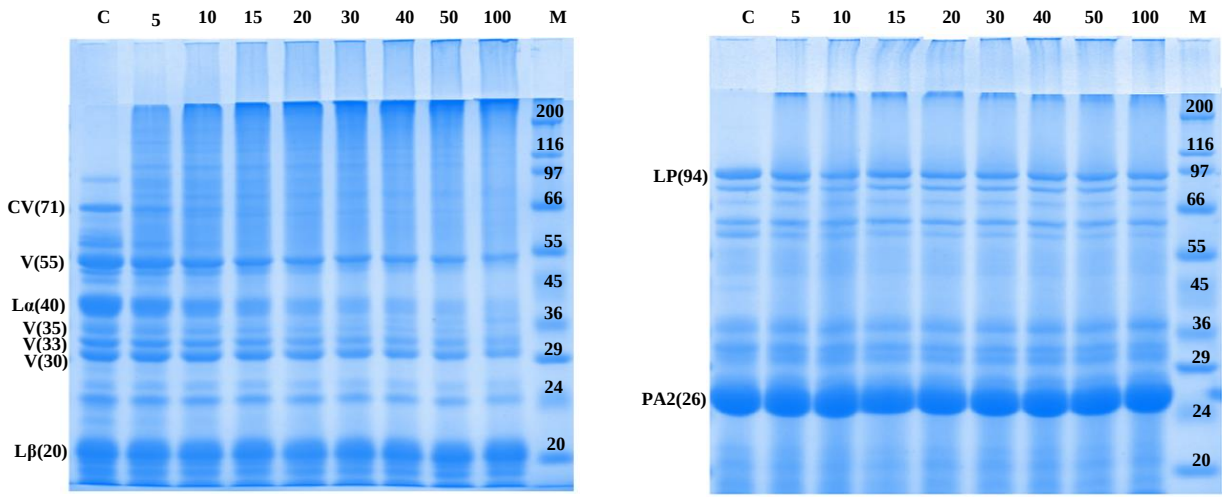


Figure.IV.4. SDS-PAGE profiles of pea proteins fractions (1% w/w) treated by 10 units of MTGase/ g of protein at 40 °C, pH 7 for different incubation times. (a): Globulins and (b): Albumins. M: standard protein markers. The molecular mass of each standard is indicated in the margin of the gels; C: control (sample simultaneously run in the absence of MTGase for 300 min). Incubation times are indicated on the top of gel lanes per min. Bands CV: convicilin; V= vicilin; Lα: legumin acidic subunit; Lβ: legumin basic subunit; PA2: major albumin polypeptide.

III.1.2.4. Effect of enzyme concentration

The enzymatic reaction is highly dependent on enzyme: substrate ratio [59] which largely differs with protein substrate nature [67]. The higher gel strengths from soy, caseinate, gelatin, egg yolk and egg white proteins were obtained by using 40, 15, 30, 30, 10 units of MTGase/g of protein respectively. This indicates that customized optimum enzyme levels are required for each protein in order to obtain maximum improvement of the techno-functional properties [17]. The amount of enzyme used in these experiments, 10 units MTGase/ g of protein, based on Eissa et al. [36] and Sun et al. [31] studies, maybe was not sufficient for optimum pea proteins enzymatic reaction. Thus, we optimized this parameter. **Figure.IV.5** shows electrophoretic patterns of 1% (w/w) pea proteins treated with various concentrations of MTGase at 40 °C, pH 7 for 120 min. As previously shown, SDS-PAGE profiles evidenced enzymatic crosslinking reaction by the formation of polymers that could not enter the separating and staking gels. MTGase-affected Glob bands **(Figure.IV.5a)** grew fainter with the increasing amount of MTGase and some of them (CV 71, V 50, Lα 40 kDa) completely disappeared when 100 units of MTGase was used. However, because of economical factor, 20 units seem to be optimum for pea Glob enzymatic reaction as shown by bands intensities. Whereas, Alb profile **(Figure.IV.5b)** did not change by increasing MTGase concentration confirming that pea Alb fraction at native state is poor substrate to MTGase.



(a) **(b)**

Figure.IV.5. SDS-PAGE profiles of MTGase-treated pea proteins fractions (1% w/w) at different enzyme concentrations. All experiments were conducted at 40 °C, pH 7 and 20 mM NaCl for 2 h. (a): Globulins and (b): Albumins. M: standard protein markers. C: control (sample simultaneously run in the absence of MTGase for 2 h). Enzyme concentration is indicated on the top of gel lanes by units of MTGase/ g of protein. Bands CV: convicilin; V= vicilin; Lα: legumin acidic subunit; Lβ: legumin basic subunit; LP: lipoxygenase; PA2: major albumin polypeptide.

The low and moderate affinities of Alb and Glob proteins to MTGase crosslinking reaction respectively, are related to the compact structure of these proteins, which limit the access to glutamine and lysine reactive residues. Increasing the pH, where MTGase is still active, may affect protein structure and enhance cross-linking reaction [16].

III.1.2.5. Effect of the pH

The effect of pH on MTGase treatment is showed in **Figure.IV.6.** Alb fraction is not affected by changing pH **(Figure.IV.6b)**; it is still poor substrate to MTGase treatment in all pH studied conditions. However, the Glob fraction is clearly affected by varying the pH **(Figure.IV.6a)**. Darker bands were revealed at pH 6, indicating a higher concentration of unpolymerized polypeptides. At this pH, near the isoelectric point (~ 5), protein-protein interaction is favored (low solubility) and the structure is very compact which limit the accessibility of active lysine and glutamine residues to MTGase and thus decreasing crosslinking reaction.

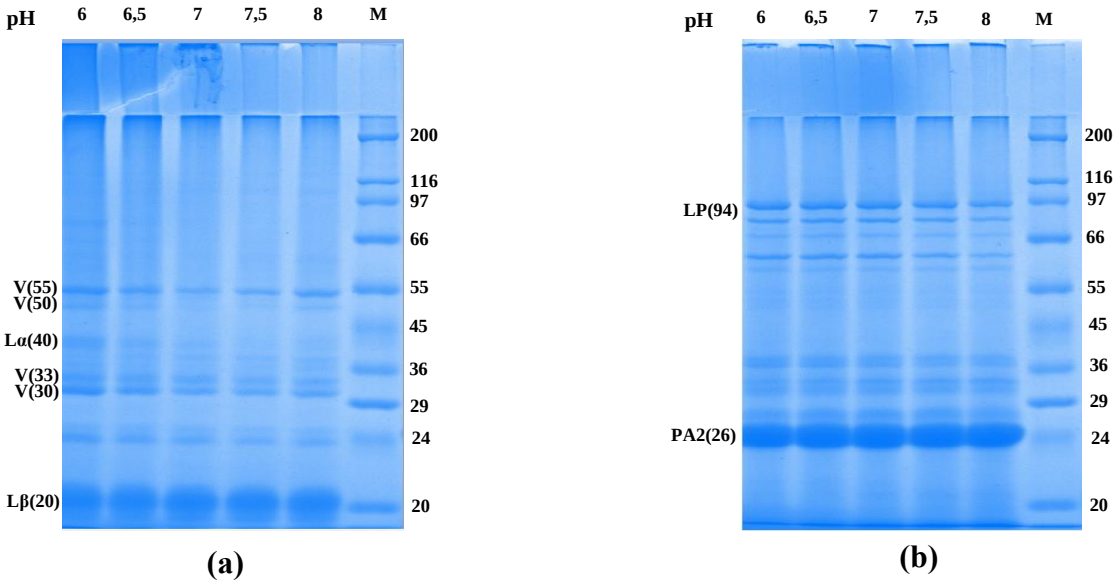


Figure.IV.6. SDS-PAGE profiles of MTGase-treated pea proteins fractions (1% w/w) at different pH. All experiments were conducted with 20 units MTGase/g protein at 40 °C in the presence of 20 mM NaCl for 2 h. (a): Globulins and (b): Albumins. M: standard protein markers. pH are indicated on the top of gel lanes. Bands; V= vicilin; Lα: legumin acidic subunit; Lβ: legumin basic subunit; LP: lipoxygenase; PA2: major albumin polypeptide.

Increasing the pH up to 7.5 increased the extent of polymerization of pea Glob until the complete disappearance of viciline 50 kDa and the legumin acidic subunits (Lα 40 kDa). The conformation of pea Glob in this pH range is still native [22, 68], hexameric for legumin and tetrameric for vicilin, however, the structure is more flexible than at pH 6.

At pH 8, vicilins are less crosslinked by MTGase compared to pH 7, vicilin 50 band is visible again and vicilin 55 is darker, while legumin acidic subunit is still absent. The decrease of polymerization is may be due to the partial loss of enzyme activity at this pH (Figure.IV.4b). It should be noted that in all MTGase-treated samples at different pH, convicilin band (CV71) is absent. This indicates that convicilin does not need unfolding to improve MTGase reaction, it is naturally a good substrate to MTGase. On the basis of these results, pH 7 represents a viable environment for the cross-linking of native pea Glob proteins by transglutaminase.

III.1.3. Conclusion

This study shows that at the native state only pea Glob can be a moderately good substrate to MTGase, pea Alb is a poor one despite its relative high content of glutamine and lysine residues, as well as its high solubility. The structure and conformation of the protein seem to play an important role for enzymatic reaction and unfolding the protein by thermal or chemical denaturation can be an interesting way to improve the efficiency of crosslinking.

III.1.4. Bibliographie

[1] Djoullah A, Sok N, Djemaoune Y, Penouilh M-J, Husson F, Saurel R. Monitoring of transglutaminase crosslinking reaction by 1H NMR spectroscopy on model substrates. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2015; in press: http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.066.

[2] Popovic LM, Pericin DM, Vastag ZG, Popovic SZ. Optimization of transglutaminase cross-linking of pumpkin oil cake globulin; Improvement of the solubility and gelation properties. Food and Bioprocess Technology. 2011;6:1105-11.

[3] Gauche C, Tomazi T, Barreto PLM, Ogliari PJ, Bordignon-Luiz MT. Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. LWT - Food Science and Technology. 2009;42:239-43.

[4] Nonaka M, Matsuura Y, Nakano K, Motoki M. Improvement of the pH-solubility profile of sodium caseinate by using Ca2+-independent microbial transglutaminase with gelatin. Food Hydrocolloids. 1997;11:347-9.

[5] Dickinson E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization. Trends in Food Science & Technology. 1997;8:334-9.

[6] Tang C-H, Ma C-Y. Modulation of the thermal stability of β-lactoglobulin by transglutaminase treatment. European Food Research and Technology. 2007;225:649-52.

[7] Kuraishi C, Sakamoto J, Yamazaki K, Susa Y, Kuhara C, Soeda T. Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. Journal of Food Science. 1997;62:488-90.

[8] Nonaka M, Matsuura Y, Motoki M. Incorporation of lysine-and lysine dipeptides into αs1-casein by Ca2+-independent microbial transglutaminase. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 1996;60:131-3.

[9] Babin H, Dickinson E. Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. Food Hydrocolloids. 2001;15:271-6.

[10] Chambi H, Grosso C. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. Food Research International. 2006;39:458-66.

[11] Bronts HM, Hendrickx ACM, Mallee LF. Preparation de proteines. Google Patents; 2002.

[12] Motoki M, Kumazawa Y. Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. Food Science and Technology Research. 2000;6:151-60.

[13] Cho YH, Shim HK, Park J. Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase Crosslinked proteins. Journal of food science. 2003;68:2717-23.

[14] Heidebach T, Forst P, Kulozik U. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. International Dairy Journal. 2009;19:77-84.

[15] Griffin M, Casadio R, Bergamini C. Transglutaminases: nature's biological glues. Biochem J. 2002;368:377-96.

[16] DeJong GAH, Koppelman SJ. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. Journal of Food Science. 2002;67:2798-806.

[17] Dube M, Schäfer C, Neidhart S, Carle R. Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. European Food Research and Technology. 2007;225:287-99.

[18] Le Gall M, Gueguen J, Seve B, Quillien L. Effects of grinding and thermal treatments on hydrolysis susceptibility of pea proteins (Pisum sativum L.). Journal of agricultural and food chemistry. 2005;53:3057-64.

[19] Roy F, Boye JI, Simpson BK. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. Food Research International. 2010;43:432-42.

[20] Boye J, Zare F, Pletch A. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. Food Research International. 2010;43:414-31.

[21] Croy RRD, Gatehouse JA, Evans IM, Boulter D. Characterisation of the storage protein subunits synthesised in vitro by polyribosomes and RNA from developing pea (Pisum sativum L.). I. Legumin. Planta. 1980;148:49-56.

[22] Gueguen J, Chevalier M, And JB, Schaeffer F. Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1988;44:167-82.

[23] Croy RD, Gatehouse J, Marta Evans I, Boulter D. Characterisation of the storage protein subunits synthesised in vitro by polyribosomes and RNA from developing pea (Pisum sativum L.). II. Vicilin. Planta. 1980;148:57-63.

[24] Croy RR, Gatehouse JA, Tyler M, Boulter D. The purification and characterization of a third storage protein (convicilin) from the seeds of pea (Pisum sativum L.). Biochem J. 1980;191:509-16.

[25] Casey R. The genetics of pea seed storage proteins. Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum). 1982;31:281-95.

[26] Croy RR, Hoque MS, Gatehouse JA, Boulter D. The major albumin proteins from pea (Pisum sativum L). Purification and some properties. Biochem J. 1984 218:795-803.

[27] Bérot S, Le Goff E, Foucault A, Quillien L. Centrifugal partition chromatography as a tool for preparative purification of pea albumin with enhanced yields. Journal of Chromatography B. 2007;845:205-9.

[28] Bhatty RS. Albumin proteins of eight edible grain legume species. Electrophoretic patterns and amino acid composition. Journal of agricultural and food chemistry. 1982;30:620-2.

[29] Arntfield SD, Maskus HD. 9 - Peas and other legume proteins. In: Phillips GO, Williams PA, editors. Handbook of Food Proteins: Woodhead Publishing; 2011. p. 233-66.

[30] Shand PJ, Ya H, Pietrasik Z, Wanasundara PKJPD. Transglutaminase treatment of pea proteins: Effect on physicochemical and rheological properties of heat-induced protein gels. Food Chemistry. 2008;107:692-9.

[31] Sun XD, Arntfield SD. Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. Food hydrocolloids. 2011;25:25-31.

[32] Crévieu I, Berot S, Guéguen J. Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. Food/Nahrung. 1996;40:237-44.

[33] Mosse J. Nitrogen-to-protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1990;38:18-24.

[34] Adebiyi AP, Aluko RE. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (Pisum sativum L.) seed protein isolate. Food Chemistry. 2011;128:902-8.

[35] Folk JE. Transglutaminase (guinea pig liver). In: Tabor H and Tabor WC, editor. Methods in Enzymology. New York: Academic Press; 1970. p. 889-94.

[36] Eissa AS, Bisram S, Khan SA. Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004;52:4456-64.

[37] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-5.

[38] Goodno CC, Swaisgood HE, Catignani GL. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. Analytical Biochemistry. 1981;115:203-11.

[39] Dinnella C, Gargaro MT, Rossano R, Monteleone E. Spectrophotometric assay using o-phtaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. Food Chemistry. 2002;78:363-8.

[40] Schafer C, Schott M, Brandl F, Neidhart S, Carle R. Identification and quantification of ε-(γ-glutamyl)-lysine in digests of enzymatically cross-linked leguminous proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53:2830-7.

[41] Sakamoto H, Kumazawa Y, Kawajiri H, Motoki M. ε-(γ-Glutamyl)lysine crosslink distribution in foods as determined by improved method. Journal of Food Science. 1995;60:416-20.

[42] Gueguen J, Barbot J. Quantitative and qualitative variability of pea (Pisum sativum L.) protein composition. Journal of the Science of Food and Agriculture. 1988;42:209-24.

[43] Mession JL, Assifaoui A, Cayot P, Saurel R. Effect of pea proteins extraction and vicilin/legumin fractionation on the phase behavior in admixture with alginate. Food Hydrocolloids. 2012;29:335-46.

[44] Damodaran S. Amino acids, peptides, and proteins. Marcel Dekker Inc ed. New York: O. R. Fennema; 1996.

[45] Deng Q, Wang L, Wei F, Xie B, Huang F, Huang W, et al. Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from Ginkgo biloba seeds. Food Chemistry. 2011;124:1458-65.

[46] Boye JI, Aksay S, Roufik S, Ribéreau S, Mondor M, Farnworth E, et al. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. Food Research International. 2010;43:537-46.

[47] Papalamprou EM, Doxastakis GI, Biliaderis CG, Kiosseoglou V. Influence of preparation methods on physicochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. Food Hydrocolloids. 2009;23:337-43.

[48] Gueguen J. Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics. Plant Foods for Human Nutrition. 1983;32:267-303.

[49] Kimura A, Fukuda T, Zhang M, Motoyama S, Maruyama N, Utsumi S. Comparison of Physicochemical Properties of 7S and 11S Globulins from Pea, Fava Bean, Cowpea, and French Bean with Those of Soybeanâ€"French Bean 7S Globulin Exhibits Excellent Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008;56:10273-9.

[50] Cserhalmi Z, Czukor B, Gajzago-Schuster I. Emulsifying properties, surface hydrophobicity and thermal denaturation of pea protein fractions. Acta alimentaria. 1998;27:357-63.

[51] Pérez SG, Vereijken JM, Koningsveld GA, Gruppen H, Voragen AGJ. Physicochemical properties of 2S albumins and the corresponding protein isolate from sunflower (Helianthus annuus). Journal of food science. 2005;70:C98-C103.

[52] Lawal OS, Adebowale KO, Ogunsanwo BM, Sosanwo OA, Bankole SA. On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flours of African locust bean (Parkia biglobossa). Food Chemistry. 2005;92:681-91.

[53] Lakemond CMM, de Jongh HHJ, Hessing M, Gruppen H, Voragen AGJ. Soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000;48:1985-90.

[54] Kinsella J. Functional properties of soy proteins. Journal of the American Oil Chemists Society. 1979;56:242-58.

[55] Tian S, Kyle WSA, Small DM. Pilot scale isolation of proteins from field peas (Pisum sativum L.) for use as food ingredients. International Journal of Food Science & Technology. 1999;34:33-9.

[56] Umezawa Y, Ohtsuka T, Yokoyama K, Nio N. Comparison of Enzymatic Properties of Microbial Transglutaminase from Streptomyces sp. Food Science and Technology Research. 2002;8:113-8.

[57] Rossa PN, De Sà EMF, Burin VM, Bordignon-Luiz MT. Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. LWT - Food Science and Technology. 2011;44:29-34.

[58] Schafer C, Zacherl C, Engel K-H, Neidhart S, Carle R. Comparative study of gelation and cross-link formation during enzymatic texturisation of leguminous proteins. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2007;8:269-78.

[59] Flanagan J, FitzGerald RJ. Characterisation and quantification of the reaction(s) catalysed by transglutaminase using the o-phthaldialdehyde reagent. Food / Nahrung. 2003;47:207-12.

[60] Gan CY, Cheng LH, Easa AM. Assessment of crosslinking in combined crosslinked soy protein isolate gels by microbial transglutaminase and maillard reaction. Journal of food science. 2009;74:C141-C6.

[61] Larre C, Kedzior ZM, Chenu MG, Viroben G, Gueguen J. Action of transglutaminase on an 11 S seed protein (pea legumin): influence of the substrate conformation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1992;40:1121-6.

[62] Larre C, Chiarello M, Dudek S, Chenu M, Gueguen J. Action of transglutaminase on the constitutive polypeptides of pea legumin. Journal of agricultural and food chemistry. 1993;41:1816-20.

[63] De Jong GAH, Wijngaards G, Boumans H, Koppelman SJ, Hessing M. Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and Streptoverticillium mobaraense. Journal of agricultural and food chemistry. 2001;49:3389-93.

[64] Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, Motoki M, Ando H, Umeda K, et al. Polymerization of several proteins by Ca2+-independent transglutaminase derived from microorganisms. Agricultural and biological chemistry. 1989;53:2619-23.

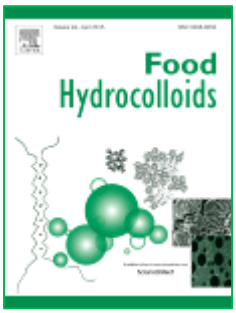
[65] Lim L-T, Mine Y, Tung MA. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998;46:4022-9.

[66] Matsumura Y, Chanyongvorakul Y, Kumazawa Y, Ohtsuka T, Mori T. Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of α-lactalbumin in the molten globule state. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology. 1996;1292:69-76.

[67] Sakamoto H, Kumazawa Y, Motoki M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. Journal of Food Science. 1994;59:866-71.

[68] Schwenke KD. Reflections about the functional potential of legume proteins A Review. Food / Nahrung. 2001;45:377-81.

III.2. Article 4: Comportement des fractions Alb et Glob à l'état dénaturé vis-à-vis la réticulation enzymatique par la MTGase



Pea albumins and globulins behaviors at denatured state toward transglutaminase treatment

Attaf Djoullah, Florence Husson*, Rémi Saurel*. *Food Hydrocolloids* (In preparation).

Abstract

The behavior of pea albumins (Alb) and globulins (Glob) at denatured state toward microbial transglutaminase (MTGase) treatment was studied. The protein transformation from native to molten globule state brought about by chemical (DTT) and thermal treatments enhanced the crosslinking degree of both fractions with more significance for Glob one. The chemical denaturation affected only legumin acidic subunit (40 kDa) for Glob sample and albumin polypeptide 2 (PA2 26 kDa) for Alb sample. Whereas, the heat treatment led to complete disappearance of 55, 35 and 30 kDa vicilin bands on SDS-PAGE profiles. Up to 10% (w/w) concentration, the Alb fraction was not able to form MTGase crosslinked gels in all states; Alb gelation properties were not affected neither by thermal pre-denaturation nor by chemical one. Compared to native state, thermal and chemical pre-denaturations of Glob fraction led to the formation of weaker and stronger gels respectively. These results indicate that the enzymatic crosslinking reaction is highly related to the structure and conformation of proteins and the use of pre-denaturation as a strategy to enhance the enzymatic crosslinking reaction has to be used with caution.

Résumé

Le comportement des fractions albumines (Alb) et globulines (Glob) de pois à l'état dénaturé vis-à-vis du traitement enzymatique par la MTGase a été étudié. La pré-dénaturation chimique (DTT) et thermique des protéines améliore le degré de réticulation des deux fractions de façon plus efficace pour la fraction Glob. La dénaturation chimique n'affecte que la légumine acide (40 kDa) et la PA2 (26 kDa) respectivement pour les fractions Glob et Alb. Par contre, le traitement thermique conduit à la disparition totale des polypetides 55, 35 et 30 kDa des vicilines. Dans tous les états, la fraction Alb n'est pas capable de former des gels réticulés par la MTGase; ses propriétés gélifiantes n'ont pas été affectées par la pré-dénaturation thermique et chimique. La pré-dénaturation thermique et chimique de la fraction Glob a conduit à la formation de gels, respectivement, plus faibles et plus forts qu'à l'état natif. Ces résultats indiquent que la réaction de réticulation enzymatique est fortement liée à la structure et la conformation des protéines et l'utilisation de la pré-dénaturation protéique, comme un outil d'amélioration la réticulation enzymatique, doit être utilisée avec précaution.

III.2.1. Introduction

Dans la partie précédente portant sur l'influence des paramètres opératoires sur le rendement de réticulation des fractions Alb et Glob natives par la MTGase, il a été déterminé qu'une température de 40 °C, un pH 7, une activité de 20 unités MTGase /g protéine, une force ionique 20 mM NaCl et une durée d'incubation 2 h constituent des paramètres offrant un bon compromis entre niveau élevé de réticulation et stabilité de l'activité enzymatique. En comparaison du comportement des protéines de soja **(Gan et al. 2009)**, il a été conclu que l'albumine et la globuline de pois à l'état natif sont classées respectivement mauvais et moyen substrats pour la MTGase, malgré leur composition riche en lysine et glutamine. Il semble que la conformation de la protéine joue un rôle déterminant et sa dénaturation permettrait une meilleure accessibilité de l'enzyme aux résidus lysine et glutamine, améliorant ainsi le rendement de la réticulation. Dans cette partie, on s'est attaché à comprendre l'effet de la pré-dénaturation chimique (traitement réducteur au DTT) et physique (température) des fractions Alb et Glob de pois sur la réaction enzymatique et sur la réticulation du réseau protéique, et ce par comparaison avec le comportement des fractions natives précédemment étudiées.

III.2.2. Résultats

III.2.2.1. Effet de la dénaturation sur les profils SDS-PAGE et les rendements de réticulation

La **Figure. IV.7** montre les profils SDS-PAGE de la globuline : (a) native (Glob nat), (b) dénaturée avec DTT (Glob dtt) et (c) dénaturée thermiquement (Glob ther), traitées avec 20 unités MTGase/g protéine à 40 °C et pH 7 en fonction de la durée d'incubation. Tous les profils des échantillons traités par la MTGase par rapport à leur témoin (pistes T), montrent une trainée en haut du gel. Ceci est dû aux agrégats de haut poids moléculaire formés à la suite des liaisons intermoléculaires catalysées par la MTGase rendant compte de la réaction enzymatique.

Le profil de la Glob nat **(Figure. IV.7a)** montre que les bandes les plus concernées par la réticulation sont principalement : la conviciline (71 kDa), la légumine acide (Lα 40kDa) et dans une moindre mesure les vicilines 55, 50 et 35 kDa.

La dénaturation de la globuline par le DTT (Glob dtt) présente pratiquement le même profil que la Glob nat à l'exception de la Lα 40 kDa qui disparaît presque totalement après une heure de traitement **(Figure. IV.7b)**.

Par contre la dénaturation thermique (Glob ther) améliore sensiblement la réticulation de la globuline qui s'est traduit essentiellement par la disparition totale des vicilines 55, 35 et 30 kDa **(Figure. IV.7c)**.

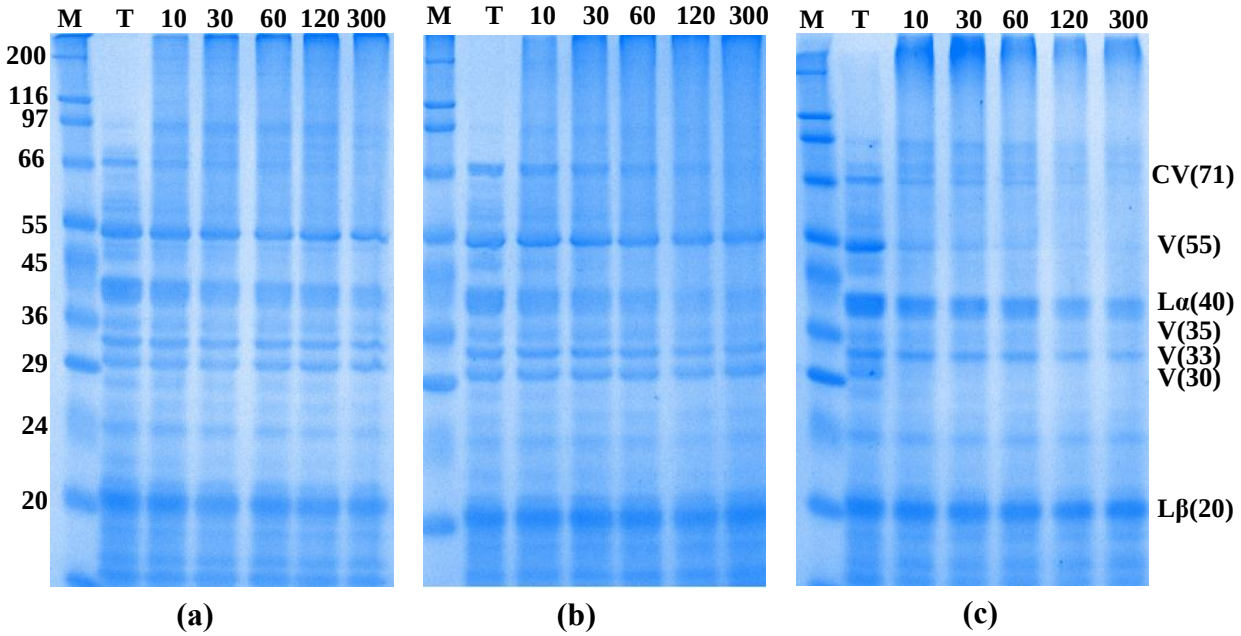


Figure.IV.7. Profils SDS-PAGE de la fraction Glob à 1% (m/m) incubées avec 20 unités MTGase/g de protéines à 40 °C et pH 7 (tampon) à différentes durées d'incubation. (a) Glob nat, (b) Glob dtt et (c) Glob ther. M: marqueurs de masse molaire (kDa) ; T : échantillons témoins incubés 300 min sans MTGase ; les pistes 10 à 300 min : temps d'incubation en min. CV : conviciline ; V : polypeptide de la viciline ; Lα : polypeptide acide de la légumine ; Lβ : polypeptide basique de la légumine.

Afin de mieux visualiser l'effet de la dénaturation sur la réaction enzymatique, les rendements de réticulation des Glob nat, Glob dtt et Glob ther ont été calculés sur la base de l'évolution des amines libres, au cours de la réaction enzymatique, dosées par la méthode OPA. Ces rendements sont présentés dans la **Figure. IV.8**.

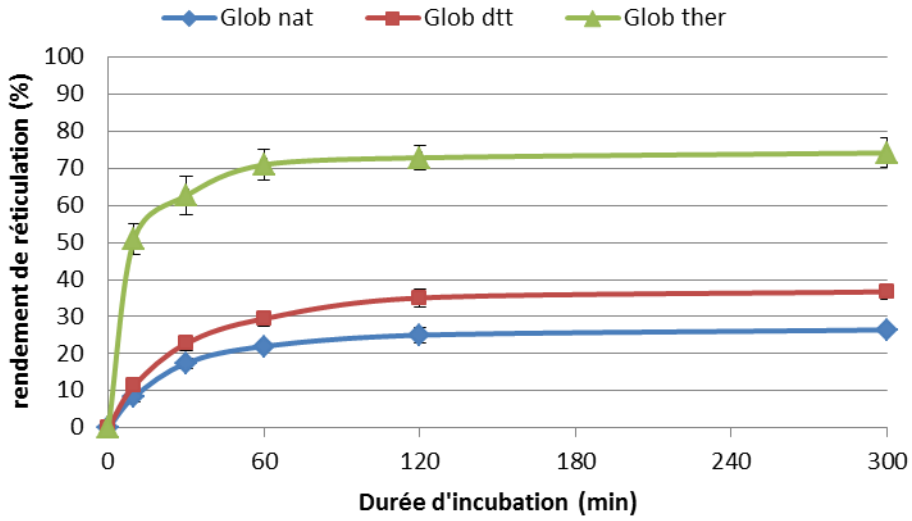


Figure. IV.8. Rendement de réticulation des fractions Glob nat, Glob dtt et Glob ther incubées à 40 °C avec 20 unités MTGase/ g de protéine à pH 7 à différentes durées d'incubation. La concentration protéique est de 1% (m/m) dans tous les échantillons.

On constate que le degré de réticulation, pour les trois échantillons, est proportionnel à la durée d'incubation. Cette évolution montre qu'un pallier est atteint après 2 h de traitement et atteint les valeurs 24, 35 et 72% respectivement pour la Glob nat, Glob dtt et Glob ther. La dénaturation de la globuline améliore le rendement de réticulation de 46% par l'effet réducteur du DTT et 200% par l'effet de la chaleur.

Il est aussi important de noter que la vitesse de réticulation de la Glob ther est nettement supérieure à celle de la Glob nat et Glob dtt. En effet, le degré de réticulation de la Glob ther atteint les 50% dès 10 min de traitement contre 7 et 11 % respectivement pour les Glob nat et Glob dtt. En outre, ce rendement (50% après 10 min de traitement) de la Glob ther est supérieur aux rendements de réticulation maximaux de la Glob nat et Glob dtt atteints après 5 h de traitement. Cet effet peut s'expliquer par la disparition très rapide des polypeptides de vicilines (55, 35 et 30 kDa) lorsqu'une dénaturation thermique a été appliquée **(Figure. IV.7)**.

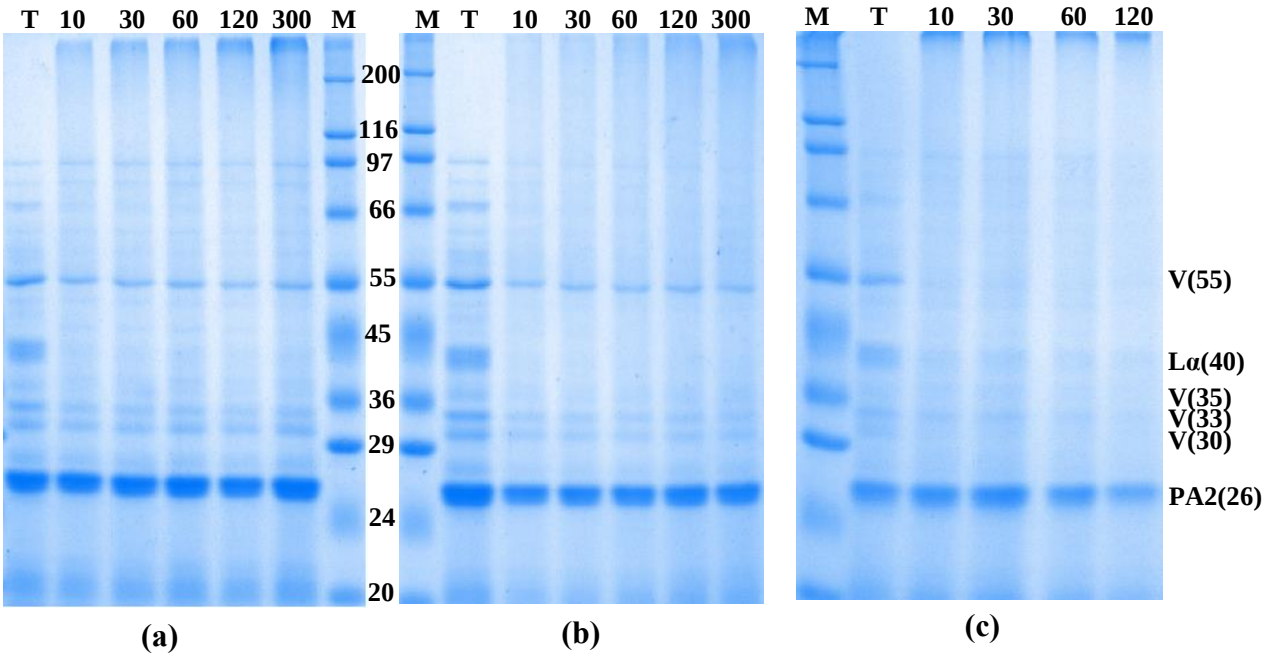


Figure. IV.9. Profils SDS-PAGE de la fraction Alb à 1% (m/m) incubée avec 20 unités MTGase/g de protéine à 40 °C et pH 7 à différents durées d'incubation. (a) Alb nat, (b) Alb dtt et (c) Alb ther. M : marqueurs de masse molaire (kDa) ; T : échantillons témoins incubés 300 min sans MTGase ; les pistes 10 à 300 min : durées d'incubation. LP : lipoxygénase ; CV : conviciline ; V : polypeptide de la viciline ; Lα : polypeptide acide de la légumine ; PA2 : polypeptide albumine majoritaire.

L'étude de l'effet de la dénaturation chimique et thermique de la fraction Alb est présentée sur la **Figure. IV.9.** Le traitement enzymatique de l'albumine native (Alb nat), dénaturée DTT (Alb dtt) et dénaturée thermiquement (Alb ther) engendre la formation de molécules de haut poids moléculaires qui restent accrochées en haut du gel, qui s'intensifie proportionnellement avec la durée d'incubation.

On remarque, pour les trois profils d'Alb traitée **(Figure. IV.9a, b et c)**, que les traces de globulines contaminant cette fraction d'albumine totale démontre le même comportement que dans le cas des globulines seules **(Figure. IV.7a, b et c)**. A l'exception de la Lα 40 kDa qui disparait immédiatement dès les premières minutes de traitement enzymatique. Quant à la fraction majoritaire de l'albumine (PA2), elle reste moins sensible à la MTGase (il n'y a pas de disparition totale de la bande caractéristique à 26 kDa). Néanmoins, la pré-dénaturation chimique (DTT) ou thermique augmente l'effet de la MTGase sur cette fraction.

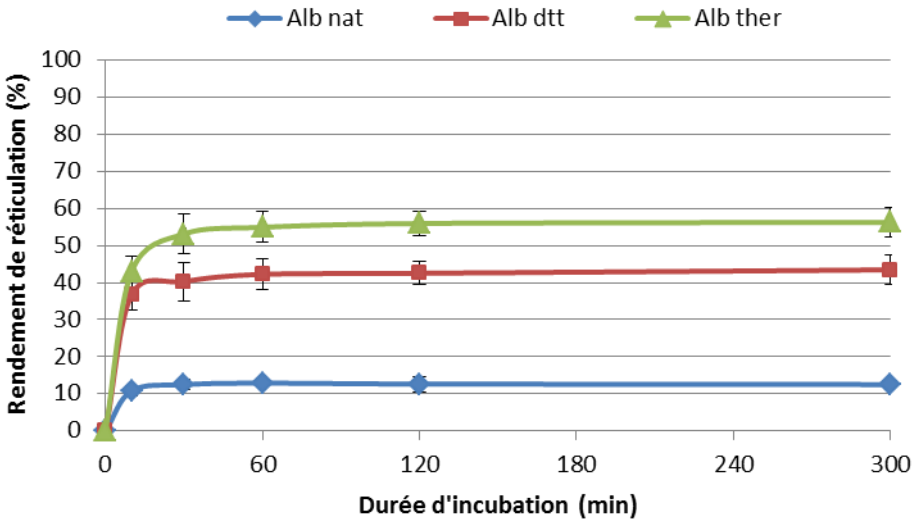


Figure. IV.10. Rendement de réticulation des fractions Alb nat, Alb dtt et Alb ther incubées avec 20 unités MTGase/g de protéine à pH 7 à différentes durées d'incubation. La concentration protéique est de 1% (m/m) dans tous les échantillons.

Les rendements de réticulation correspondant aux trois échantillons d'albumines sont présentés dans la **Figure. IV.10**. Ils atteignent les valeurs de 12.5, 40 et 53% après 30 min de traitement respectivement pour l'Alb nat, Alb dtt et Alb ther. La dénaturation de l'albumine améliore le rendement de réticulation de 220% pour le DTT et 320% pour le traitement thermique.

III.2.2.2. Effet de la dénaturation sur la gélification des protéines

Les hydrogels à base de protéines sont des matrices couramment utilisées comme support encapsulant et leur obtention fait appel à des mécanismes de gélification souvent complexes. Les propriétés du réseau formé notamment l'efficacité d'encapsulation sont généralement déterminées par le type de liaison qui le stabilise (covalentes et/ou non covalentes).

Dans le cas d'une gélification par voie enzymatique (MTGase) une liaison covalente se catalyse entre un résidu glutamine et un résidu lysine conduisant à la formation d'un fragment glutamine-lysine (Gln-Lys) très résistant aux stress mécaniques et aux attaques protéolytiques **(Griffin et al., 2002)**. De telles propriétés semblent très intéressantes pour un système d'encapsulation (**Motoki et al., 2000)** surtout que la réaction enzymatique se réalise dans des

conditions relativement douces (pH 7 à 40 °C) qui sont très favorables pour la stabilité de la majorité des molécules actives. Cependant, la compatibilité de la protéine en tant que substrat pour la MTGase n'est pas évidente, et une valeur faible de la concentration minimale de gélification enzymatique reflète une bonne compatibilité.

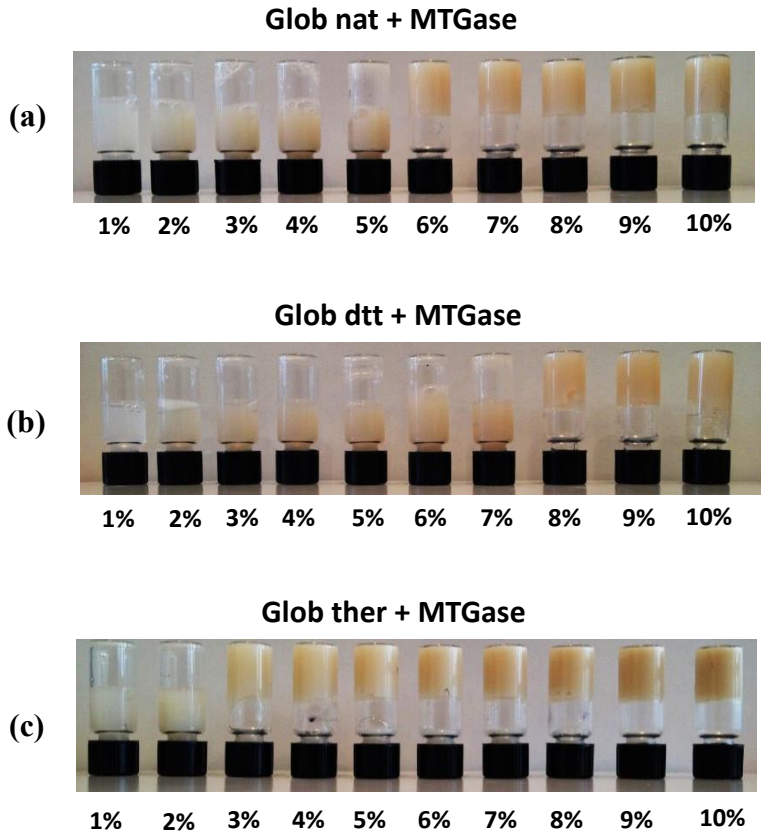


Figure. IV.11. Concentration minimale de gélification enzymatique de la Glob nat (a), Glob dtt (b) et Glob ther (c) traitées avec 20 unités MTGase/g protéine à 40 °C et pH 7.

Les concentrations minimales de gélification par voix enzymatique (CMG_{Enzy}) des fractions Glob et Alb natives et dénaturées sont présentées respectivement dans les **Figures. IV.11 et IV.12**. Les concentrations minimales de gélification de la Glob nat, Glob dtt et Glob ther sont de 6%, 8% et 3% respectivement. La diminution de cette concentration minimale après dénaturation thermique semble logique et en parfaite adéquation avec le rendement de réticulation et le profil électrophorétique correspondants. Ceci est principalement dû au comportement des vicilines 55, 35 et 30 kDa après dénaturation thermique qui disparaissent

dès les 10 min de traitement enzymatique gouvernant ainsi la gélification du fait de leur proportion majoritaire (65 %) dans la fraction Glob **(Figure. IV.7 et 8)**.

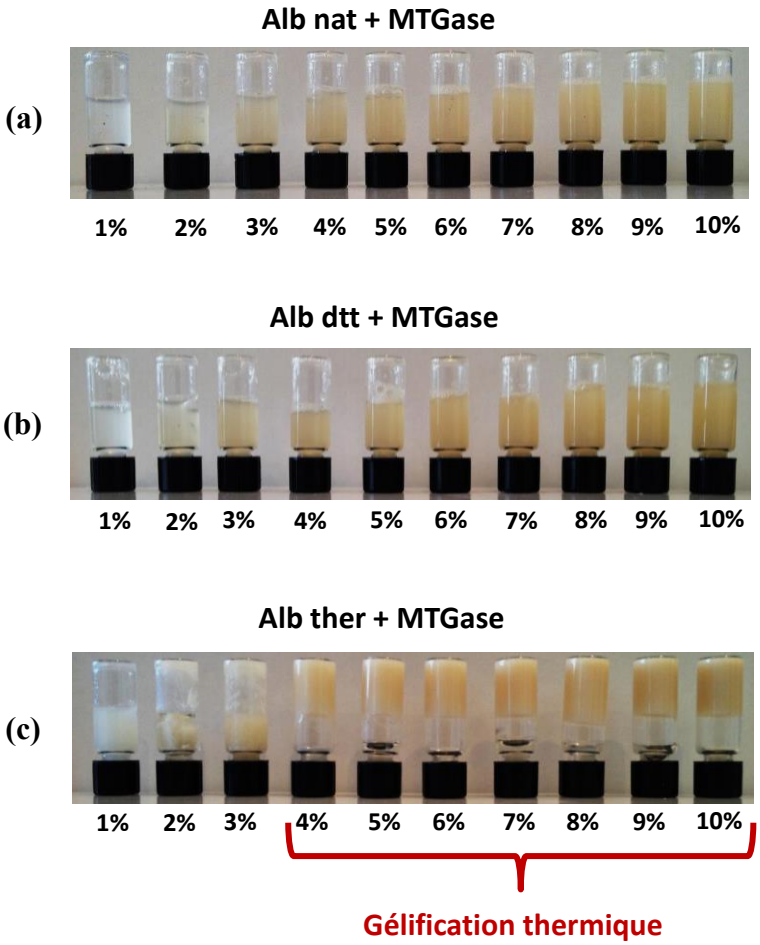


Figure. IV.12. Concentration minimale de gélification enzymatique de l'Alb nat (a), Alb dtt (b) et Alb ther (c) traitées avec 20 unités MTGase/g protéine à 40 °C et pH 7.

Par contre l'augmentation de la CMG_{Enzy} après dénaturation chimique (DTT) constitue un résultat inattendu. En effet, après dénaturation de la fraction Glob par le DTT, le rendement de réticulation s'est amélioré par rapport à la globuline native **(Figure. IV.8)**. La responsabilité de cette augmentation a été attribuée à la légumine acide 40 kDa suite à son affectation, par le DTT, comme observé dans le profil électrophorétique correspondant

(Figure. IV.7b). On aurait pu s'attendre à ce qu'une augmentation du degré de réticulation engendre une diminution de la CMG_{Enzy} et non pas une augmentation. Une caractérisation de la microstructure ainsi que des propriétés viscoélastiques des gels semblent nécessaires afin de mieux comprendre et expliquer ces résultats contradictoires.

La fraction albumine n'est pas capable de former des gels dans la gamme de concentration étudiée, et ce même après dénaturation thermique ou chimique **(Figure. IV.12)**. Les gels observés dans la **Figure. IV.12c** sont formés suite au traitement thermique, avant l'ajout de la MTGase, et non pas suite à la réticulation enzymatique (aucune quantité d'enzyme n'a pu être ajoutée dans ce cas). Même dans le cas où le rendement de réaction a été augmenté (après dénaturation chimique au DTT), la formation d'un gel continu n'est pas observée pour la fraction Alb dans la gamme de concentrations explorées. Ceci rejoint l'idée que les liaisons Gln-Lys intramoléculaires seraient favorisées au détriment des liaisons intermoléculaires.

III.2.2.3. Rhéologie des gels

La cinétique de gélification par réticulation enzymatique de la globuline de pois a été suivie par rhéologie oscillatoire à faible amplitude. En rhéologie dynamique une transition sol-gel est signifiée par le croisement des modules de conservation G' (élastique) et de perte G'' (visqueux) au point gel Gp où tan $\delta = 1$, suivi d'une augmentation marquée de G', significative d'un renforcement du réseau formé. Le matériau passe ainsi d'un état liquide/visqueux avec G''> G' à un état élastique dominant, à partir de Gp, avec G'>>G''. Le mélange atteint un équilibre lorsque les deux modules sont pratiquement stables, fluctuant généralement à ±10% autour d'une valeur moyenne. Celle-ci a été relevée comme la valeur finale d'élasticité du gel.

La **Figure. IV.13.** montre l'évolution des modules G' et G'' au cours de l'incubation enzymatique (20 unités MTGase/g protéine, pH7) des fractions Glob nat, Glob dtt et Glob ther à une concentration de 10% (m/m). Il est à noter que la concentration en protéine dans cette étude a été fixée (10% m/m) en considérant un compromis entre les concentrations critiques de gélification thermique et enzymatique respectivement de la Glob ther (12% m/m) et Glob dtt (8% m/m).

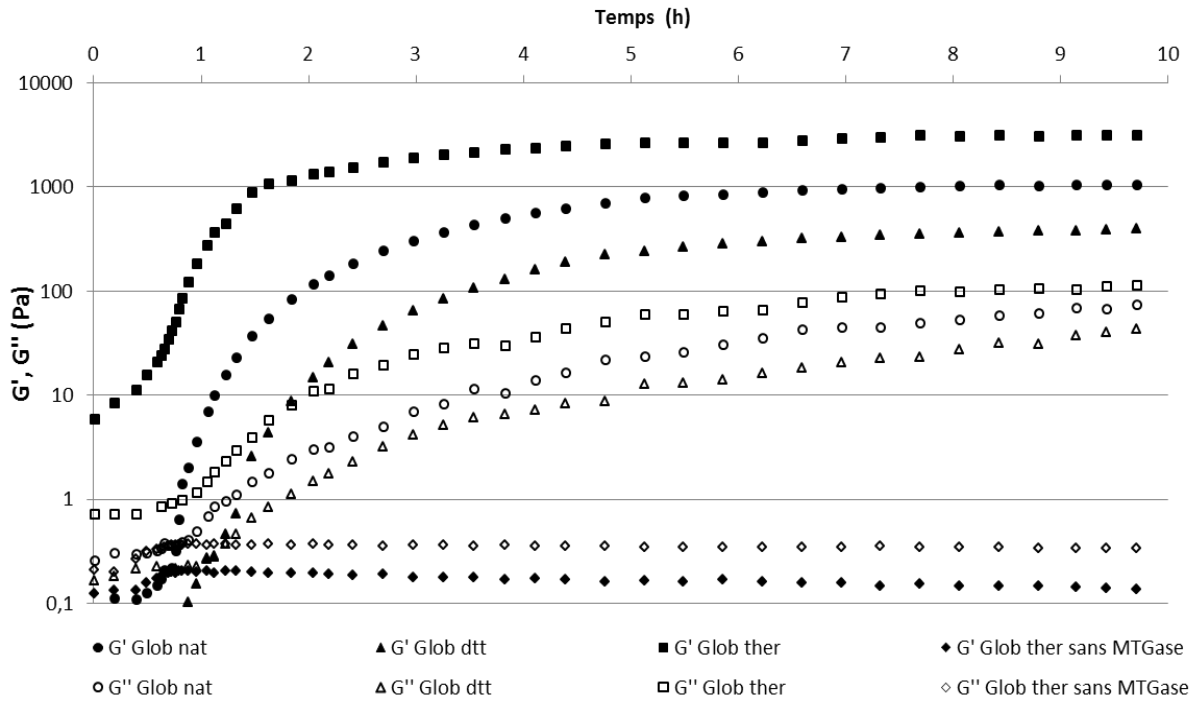


Figure.IV.13. Evolution des modules élastique G' et de perte G'' en fonction du temps de la Glob nat, Glob dtt et Glob ther incubées en présence de 20 unités MTGase/g protéine, à pH7 et à 40 °C. La concentration protéique est de 10% (m/m) pour l'ensemble des échantillons.

L'ensemble des échantillons ont montré un profil de formation d'un gel, à l'exception de l'échantillon témoin de Glob ther, incubé dans les mêmes conditions sans ajout de MTGase, qui a montré des modules pratiquement constants tout le long de l'analyse avec G''> G'. Ceci montre que la gélification des échantillons étudiés est induite uniquement par la réaction enzymatique catalysée par la transglutaminase. La pré-dénaturation thermique ainsi que l'incubation à 40 °C ne participent pas d'une façon directe au processus de gélification.

La gélification de Glob nat avec la MTGase a montré un point de gel (Gp), point de croisement des de G'' et G', qu'après 46 min de traitement **(Figure. IV.14)**, à partir duquel, une rapide augmentation de G' a été observée jusqu'à atteindre un plateau après 6 h avec une force moyenne finale de 1000 Pa.

La pré-dénaturation de la fraction Glob, thermique (Glob ther) et chimique (Glob dtt), affecte considérablement la cinétique de gélification ainsi que la force finale des gels.

La dénaturation thermique (Glob ther) conduit à une accélération de la cinétique de gélification avec un gel plus fort (3000 Pa) que celui obtenu pour Glob nat (1000 Pa). Ce résultat est en parfaite adéquation avec ceux obtenus précédemment pour l'électrophorèse, le degré de réticulation ainsi que la concentration minimale de gélification.

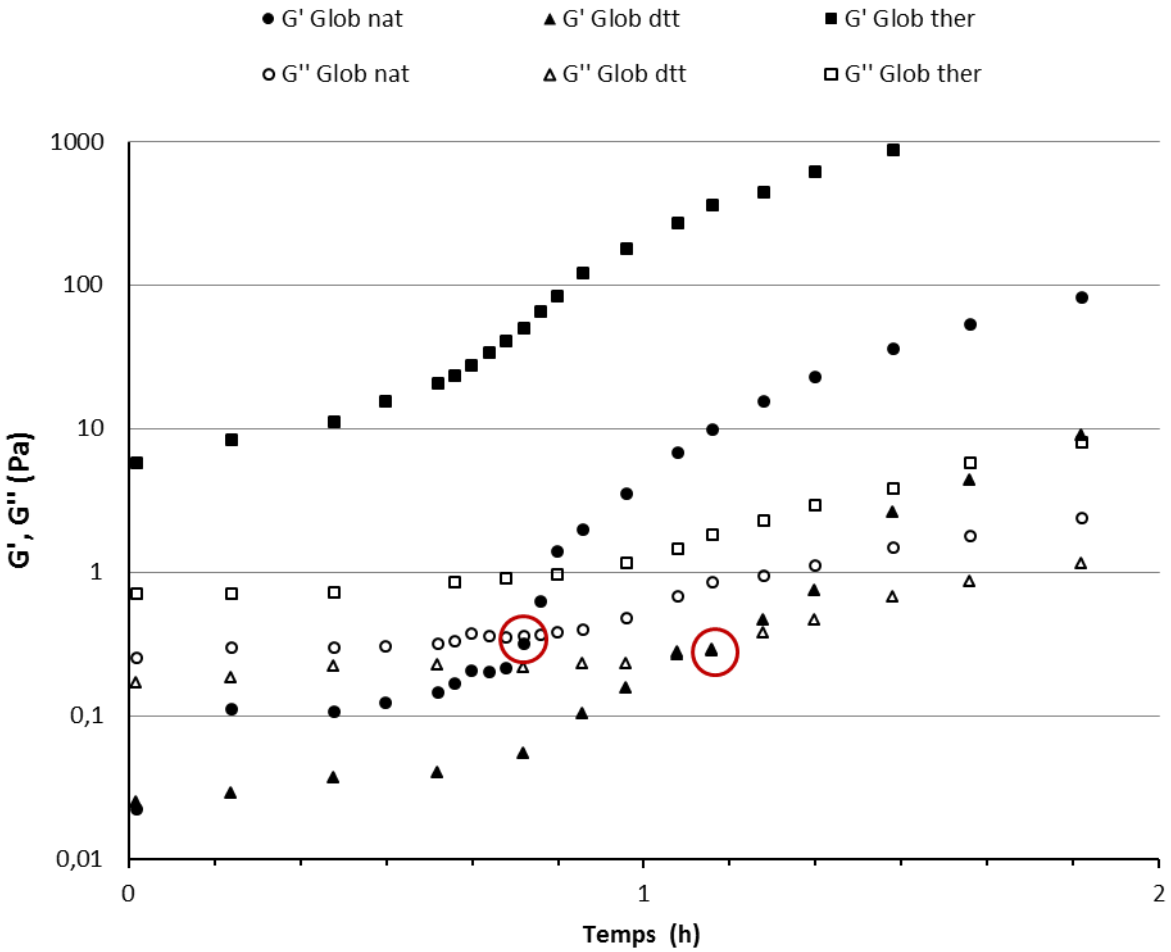


Figure. IV.14. Observation des points de gel des fractions Glob nat, Glob dtt et Glob ther dénaturée thermiquement traitées avec avec 20 unités MTGase/g protéine, pH7 à 40 °C. Le point gel, le croisement entre G' et G'', est repéré par un cercle rouge.

Contrairement à la pré-dénaturation thermique, la pré-dénaturation chimique de la fraction Glob avec le DTT ralentie la cinétique de gélification et diminue la force finale du gel (400 Pa). Le point de gel et le plateau n'ont été observés respectivement qu'après 68 min **(Figure. IV.14)** et 7 h **(Figure. IV.13)** de réaction enzymatique. Ce résultat vient renforcer l'observation faite sur la CMG_{Enzy}, qui a augmenté de 6% pour la fraction Glob nat à 8% pour

la fraction Glob dtt **(Figure. IV.11)**. Cette tendance à former des gels plus difficilement, va à l'inverse de l'augmentation du rendement de réaction **(Figure. IV.8)**.

En pratique, tan δ joue le rôle d'un indicateur très précieux du partage entre les propriétés élastiques et visqueuses. Il est clair que si la valeur de tan δ < 1 (point gel ou G'=G''), l'échantillon a un comportement plus élastique que visqueux ; alors que c'est le contraire si la valeur de tan δ > 1. Autrement dit, plus tan δ est petit (G'>>G'') plus le gel est fort. Selon **Clark et Ross-Murphy (1987)**, un gel «fort» ou «vrai» est un gel qui possède des grandeurs dynamiques G' et G'' très peu dépendante de la fréquence avec G' > 10 G'' (tan δ < 0.1). sinon, le gel est considéré comme « faible ».

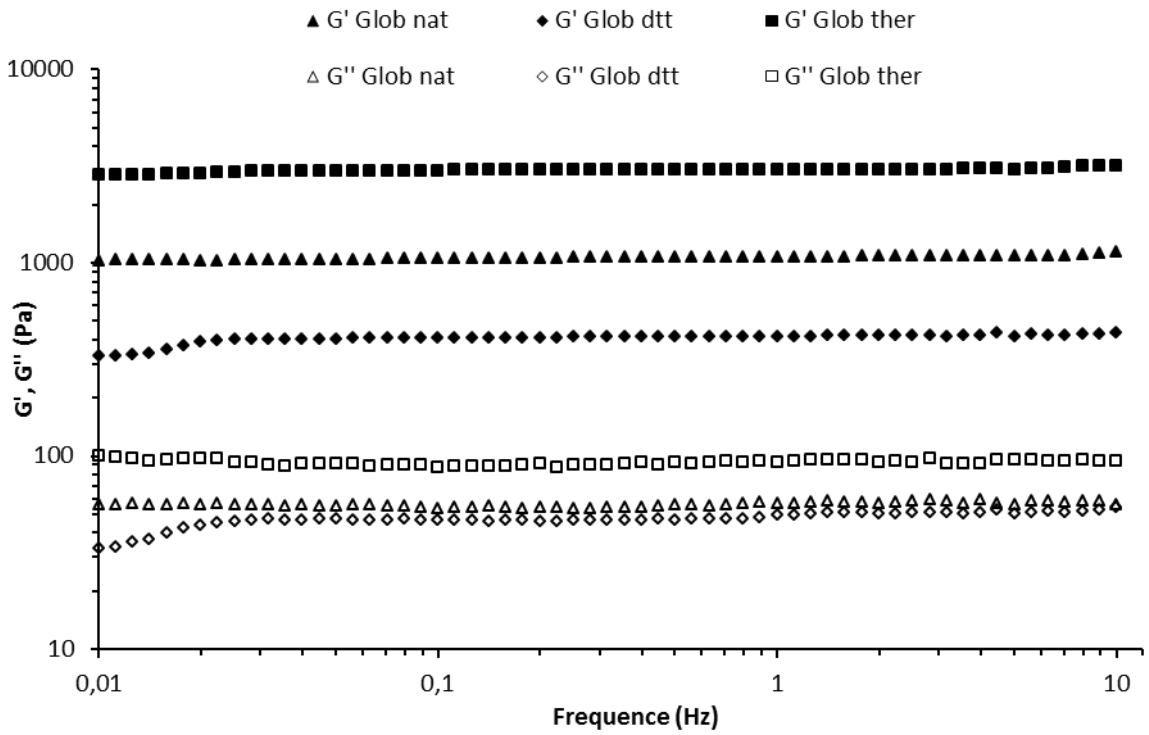


Figure. IV.15. Spectre mécanique (G', G'' en fonction de la fréquence) des gels Glob nat, Glob dtt et Glob ther en fin de cinétique de gélification (à 20 °C).

Les spectres mécaniques des systèmes étudiés, courbes de variations de G' et G'' ainsi que tan δ (= G''/G') en fonction de la fréquence sont présentés respectivement dans les **Figures. IV.15 et IV.16**. Ils ont été obtenus à la fin du traitement enzymatique (10 h) à 20 °C.

Quel que soit le système, G' est toujours supérieur à G'' et les deux modules présentent une faible dépendance de la fréquence, à l'exception de la fraction Glob dtt où G' et G'' sont relativement dépendants aux faibles fréquences. La fraction Glob ther présente les valeurs de G' et G'' les plus élevées suivie de la fraction Glob nat **(Figure. IV.15)**. De même les valeurs de tan δ des fractions Glob nat et Glob ther sont plus stables que celle de la fraction Glob dtt. Les valeurs moyennes de tan δ sont respectivement 0.05, 0.12 et 0.03 pour la Glob nat, Glob dtt et Glob ther.

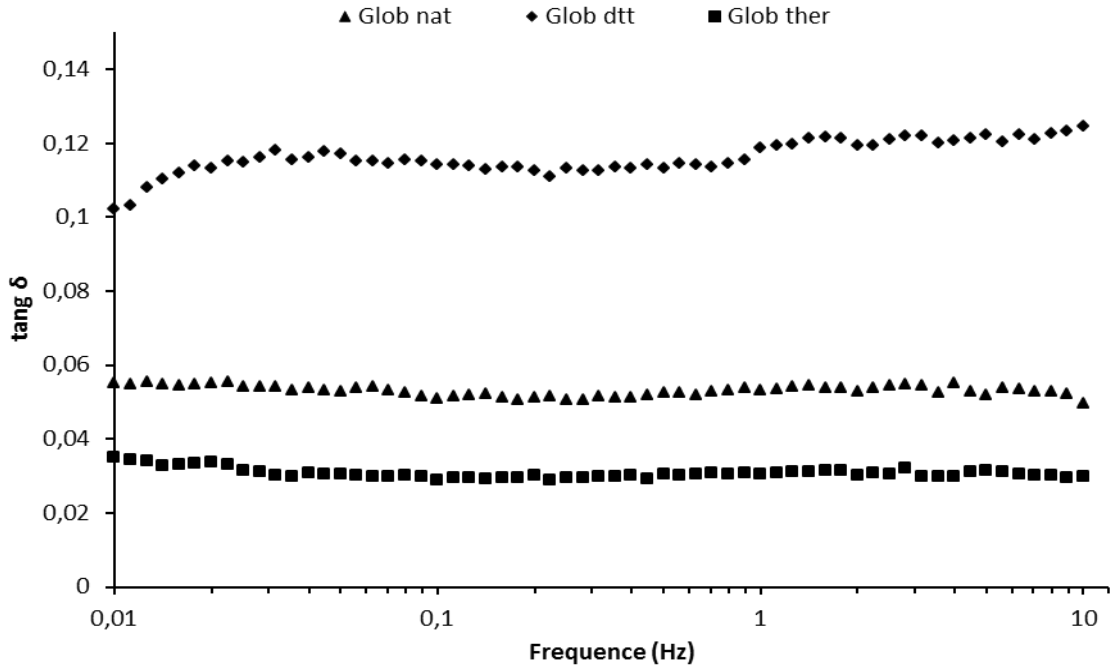


Figure IV.16. Spectre mécanique (tan δ en fonction de la fréquence) des gels de Glob nat, Glob dtt et Glob ther en fin de cinétique de gélification (à 20 °C).

En s'appuyant sur la définition de **Clark et Ross-Murphy (1987)**, on peut qualifier que les gels de Glob nat et Glob ther sont des gels forts et quasiment élastiques. Tandis que celui de la fraction Glob dtt est un gel faible. L'imperfection du gel de la fraction Glob dtt est due aux particules protéiques, principalement la Lβ (20 kDa) non gélifiées par la MTGase, dispersées dans le réseau sous forme de micro-domaines à l'état liquide, conférant au final une plus grande composante visqueuse au gel. Dès à présent, des observations par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) permettent d'investiguer la microstructure des gels.

III.2.3.4. Microstructure des gels par MCBL

Les microstructures des systèmes natif et dénaturé étudiés, observées au cours du traitement enzymatique par MCBL des fractions Alb et Glob sont respectivement présentées dans les **Figure. IV.17 et IV.18** (la protéine étant marquée avec la RITC).

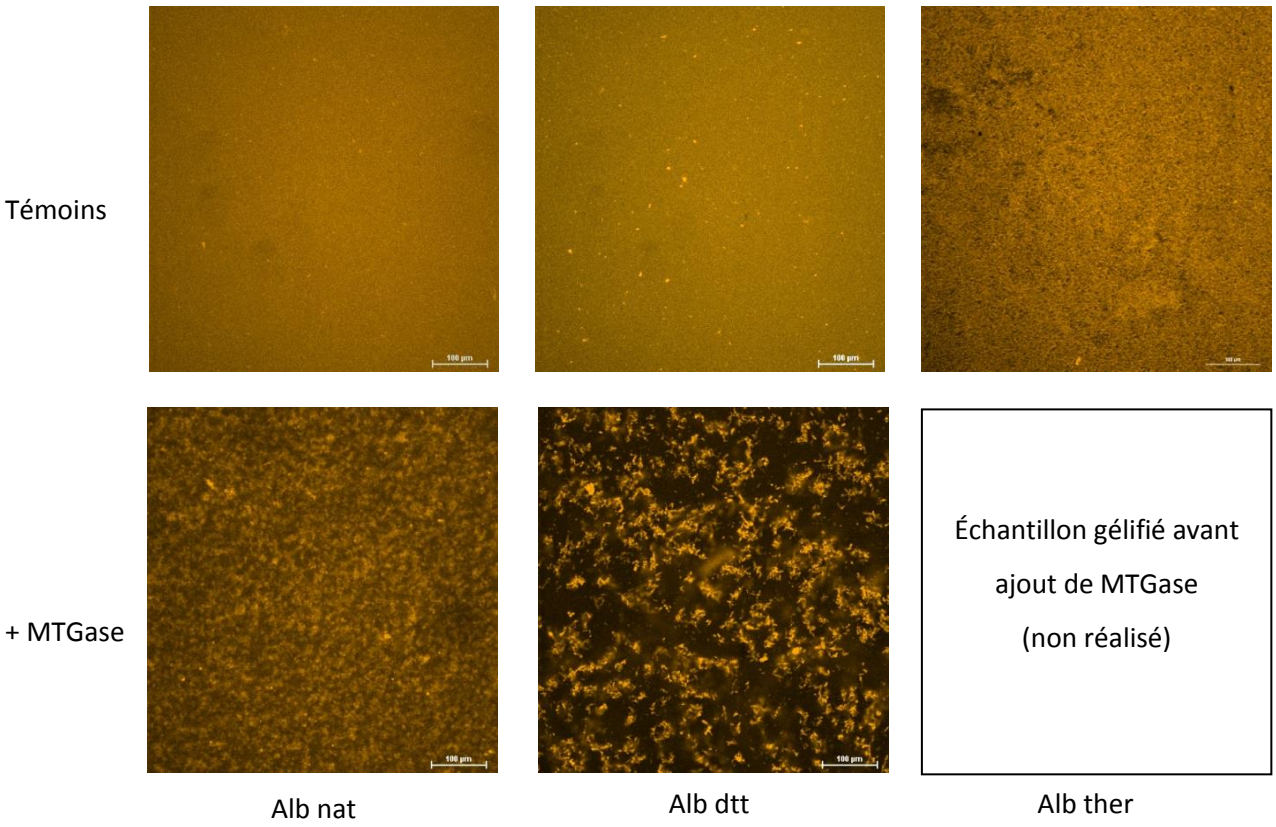


Figure. IV.17. Observations microscopiques par MCBL des fractions Alb nat, Alb dtt et Alb ther traitées et non traitées avec 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à 40 °C (Barre d'échelle = 100 µm). La concentration protéique est de 10% (m/m) pour l'ensemble des échantillons.

Avant traitement enzymatique, les solutions protéiques d'Alb nat et Alb dtt (témoins) montrent une fluorescence uniformément répartie dans le milieu, aucun réseau n'est formé à ce stade **(Figure. IV.17)**. La pré-dénaturation thermique quant à elle, conduit à la formation d'un gel avec une structure lisse avec constitution d'un réseau très fin et homogène, ce qui a empêché la réaction enzymatique.

Après traitement enzymatique, la fraction Alb nat présente une distribution inhomogène de la fluorescence sous forme de fines particules ou agrégats. L'échantillon Alb dtt développe une structure discontinue plus granuleuse avec des agrégats de tailles plus importantes que Alb nat. Ce résultat montre que, même si aucun gel n'a été formé, il existe des liaisons intermoléculaires en plus des liaisons intramoléculaires.

Les solutions de Glob nat et Glob dtt (**Figure. IV.18)** présentent le même profil que celui de la fraction Alb en solution (**Figure. IV.17)**. Aucun réseau n'est formé avant traitement enzymatique. Par contre la dénaturation thermique de la fraction Glob montre un état agrégé et le début de la formation d'un réseau.

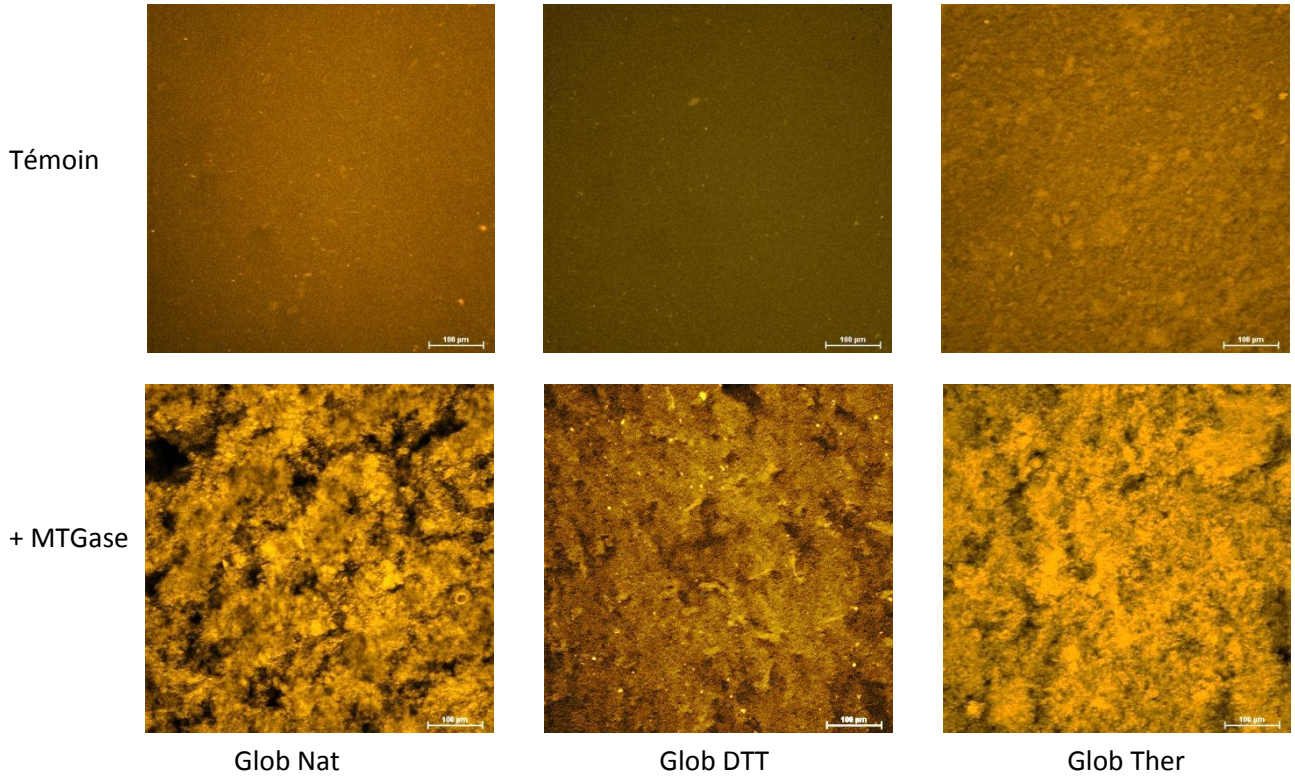


Figure. IV.18. Observations microscopiques par MCBL des fractions Glob nat, Glob dtt et Glob ther traitées et non traitées avec 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à 40 °C. (Barre d'échelle 100 µm). La concentration protéique est de 10% (m/m) pour l'ensemble des échantillons.

Le traitement enzymatique de la fraction Glob nat a conduit à la formation d'un gel avec une structure grossière, caractérisée par des zones sombres de tailles non homogènes.

La structure de la Glob dtt après réticulation a révélé de petits fragments protéiques compacts dispersés dans une phase continue relativement homogène avec un contraste réduit.

La fraction Glob ther après traitement enzymatique présente la structure la plus homogène des trois systèmes ; les zones sombres sont réduites et la connectivité entre les particules est améliorée.

III.2.3. Discussion

III.2.3.1. Effet de la pré-dénaturation chimique au DDT

Sur la fraction Alb :

Le DTT est un agent réducteur qui rompt les laisons S-S (pont disulfure) stabilisant les protéines. La dénaturation de l'albumine, protéine riche en soufre **(Croy et al., 1984)**, par le DTT conduisant à un dépliement de la structure et permettant une meilleure accessibilité de la MTGase aux résidus glutamine et lysine. Le rendement de réticulation est ainsi amélioré (220% par rapport à Alb nat) sans pour autant affecter le profil électrophorétique **(Figure. IV.9 et IV.10)**. Ceci est vrai dans le cas où une grande partie des liaisons entre les résidus glutamine et lysine sont de type intramoléculaire, c'est-à-dire que les résidus appartiennent à la même protéine **(Figure. IV.19)**. Dans ce cas, la protéine est visible dans le profil électrophorétique sous sa forme monomérique, ce qui explique le décalage enregistré entre le rendement de réticulation de la fraction Alb dtt et son profil SDS-PAGE. La capacité du polypeptide PA2 (26 kDa) à former des liaisons intramoléculaires a été montrée précédemment (Chapitre II). Par ailleurs, les images de MCBL de l'Alb dtt **(Figure. IV.17)** ont révélées la formation de petits agrégats mettant en évidence des liaisons intermoléculaires, mais elles restent minoritaires par rapport aux liaisons intramoléculaires du moment où aucun gel n'est formé. Ces résultats démontrent bien les limites et la complémentarité des méthodes de suivi de la réticulation (cf. chapitre III).

Sur la fraction Glob :

Dans le cas des globulines de pois, le traitement au DTT ne concerne que la légumine, les vicilines étants exemptes de soufre **(Croy et al., 1980b)**. A l'état natif, la légumine est une protéine plus grosse que la viciline avec une masse moléculaire entre 360 et 400 kDa contre 160 à 200 kDa pour la viciline **(Owusu-Ansah et Mc Curdy 1991)**. Elle est composée de 6

paires de sous unités hétérogènes, chaque sous unité comporte un polypeptide basique Lβ (20 kDa) et un polypeptide acide Lα (40 kDa) reliés entre eux par une liaison disulfure **(Croy et al., 1980a)**. La dénaturation de la légumine avec le DTT conduit donc à séparer les polypeptides acide (Lα 40 kDa) et basique (Lβ 20 kDa) modifiant sensiblement la structure native **(Figure. IV.20)**. Dans cette nouvelle conformation, les résidus glutamine et lysine de la Lα seraient mieux exposés à la MTGase et par consequent ce polypetide acide (40 kDa) disparait mieux dans le profil électrophorétique **(Figure. IV.10b)** et le rendement de réaction global de la fraction Glob dtt s'améliore par rapport à la fraction Glob nat **(Figure. IV.8)**. La légumine basique quant à elle reste toujours insensible même après sa libération. La liaison Gln-Lys se forme donc uniquement entre les polypeptides de la Lα (40 kDa) sans l'implication de la Lβ (20 kDa). La non participation du polypeptide Lβ à la gélification de la fraction Glob dtt fragilise le réseau formé (**Figure. IV.16**) et retarde sa cinétique de gélification (**Figure. IV.13 et IV.14**) par rapport à la fraction Glob nat où la légumine basique participe d'une façon indirecte au réseau grâce à sa liaison covalente S-S avec la légumine acide. Autrement dit, la légumine native participe à la réaction enzymatique avec un polypetide de 360 kDa, tandis que la légumine dénaturée avec DTT participe à la réaction avec un polypeptide de 40 kDa. Ceci explique la contradiction des résultats entre augmentation du rendement de réaction d'une part, et augmentation de la CMG_{enzy} et diminution de la force finale du gel d'autre part.

La déstabilisation de la structure oligomérique de la légumine par DTT conduit à la formation d'agrégats réticulés de plus petite tailles donnant un réseau de structure plus fine que pour la protéine native (**Figure. IV.18)** ; ce réseau serait moins continu et présenterait moins de points de jonction ; ceci est dû probablement à la légumine basique (Lβ 20 kDa) qui se trouve dispersée dans la phase interstitielle, émettant ainsi une fluorescence qui homogénéise le réseau et réduit son contraste.

L'effet de la pré-dénaturation chimique par le DTT sur la réticulation enzymatique a été étudié sur la β-lactoglobuline par **Eissa et Khan (2006)**. Ces auteurs ont observé une amélioration des propriétés rhéologiques de cette protéine pré-dénaturée au DTT par rapport à son état natif, ce qui n'était pas le cas avec la fraction Glob dtt. Cette différence est liée à la structure des deux protéines. En effet, la β-lactoglobuline est une protéine globulaire dont la structure est stabilisée par deux ponts disulfures **(Nicolai et al., 2001)**. La destruction de ces ponts par le DTT déplie la protéine, sans pour autant modifier la structure monomérique (18

kDa), permettant une meilleure accessibilité de la MTGase aux résidus glutamine et lysine qui se traduit par une amélioration de la réticulation enzymatique. Par contre, la pré-dénaturation de la fraction Glob dtt libère les polypeptides de la légumine, Lα (40 kDa) et Lβ (20 kDa), modifiant ainsi la conformation hexamèrique à l'état natif (360 kDa) à une conformation monomérique à l'état dénaturé (40 kDa) ce qui modifie la structure des gels formés et affectent leurs propriétés rhéologiques comme déjà expliqué.

III.2.3.2. Effet de la pré-dénaturation thermique

La prédénaturation thermique est l'une des stratégies d'amélioration de la susceptibilité des protéines au traitement enzymatique par la transglutaminase **(Eissa et Khan, 2005 ; Gauche et al., 2010)**. Le principe repose sur le dépliment de la protéine par l'effet de la température pour permettre une meilleure accessibilité de la MTGase aux résidus glutamine et lysine afin de catalyser la formation de la laison Gln-Lys.

Sur la fraction Alb :

A une concentration de 1% (m/m), Le prétraitement thermique de la fraction Alb a conduit à l'amélioration du rendement de réticulation de 320% par rapport à l'Alb nat **(Figure. IV.10)**. Cependant, le polypeptide PA2 (26 kDa) reste toujours peu sensible à la MTGase **(Figure. IV.9)**. Ce rendement de réticulation, calculé pour la fraction Alb, est un rendement apparent (total) et non pas spécifique à l'albumine puisque cette fraction contient quelques polypeptides de la globuline qui participe à la réaction enzymatique. La gélification enzymatique n'a pu être étudiée pour l'Alb ther faute de gélification thermique (CMG_{ther}=4% m/m).

Sur la fraction Glob :

La dénaturation thermique de la fraction Glob (Glob ther) a montré un état agrégé et le début de la formation d'un réseau **(Figure. IV.18).** Ceci est dû aux interactions non covalentes engendrées par l'exposition des groupements hydrophobes suite au dépliement de la protéine par effet de la chaleur. A ce stade, la Glob ther était une solution très visqueuse et la rhéologie dynamique n'a pas montrée la formation d'un gel **(Figure. IV.13).**

Le traitement enzymatique de la Glob ther a conduit à une accélération de la cinétique de gélification avec un gel 3 fois plus fort que celui obtenu pour Glob nat. D'ailleurs, le point

gel (Gp) n'a pas pu être observé sur le rhéogramme **(Figure. IV.14)**. En effet, dès la première mesure, G' était supérieur à G'' ce qui n'était pas observé pour le témoin. Ceci indique qu'un réseau tridimensionnel est formé pendant le temps de préparation de l'échantillon (dispersion de la MTGase et centrifugation au total 3 min), avant son dépôt sur le plateau du rhéomètre et le lancement de la mesure. De même, la pente de la courbe était plus grande et le plateau a été atteint après 4 h avec une force finale de 3000 Pa contre 6 h et 1000 Pa pour l'échantillon Glob nat. De ce fait, le rendement de réticulation a augmenté de 200% par rapport à Glob nat **(Figure. IV.8)** et la CMG_{enzy} a diminuée de 6% pour la Glob nat à 3% pour la Glob ther **(Figure. IV.11)**.

Cette amélioration de la réticulation enzymatique donnant des gels plus rigides et plus faciles à former, a été attribuée principalement aux polypeptides de viciline (30, 35 et 50 kDa), qui après dénaturation thermique, participent activement au réseau formé **(Figure. IV.7)**. Les vicilines étant très sensibles à la température. Le dépliement des protéines, principalement les vicilines (30, 35 et 35 kDa), par effet thermique permet une meilleure exposition des résidus glutamine et lysine, et donc une meilleure connectivité entre agrégats, via la liaison Gln-Lys, conduisant à une structure compacte et homogène **(Figure. IV.18).**

La Lα 40 kDa semble moins affectée par le pré-traitement thermique que les vicilines **(Figure. IV.7)**. Il se pourrait que l'agrégation thermique de ce polypeptide, Lα 40 kDa, limite l'accessibilité de l'enzyme aux résidus glutamine et lysine. Cependant, l'effet global de la pré-dénaturation thermique reste dominé par les vicilines qui représentent 65% de la composition totale de la fraction Glob contre 25 % pour les légumines.

Il est à noter que la Lβ (20kDa) n'est pas affectée par le traitement enzymatique et ce dans toutes les conditions native et dénaturantes. Sur cette base **Larré et al 1993**, ont supposé que l'unité acide de la légumine (Lα 40 kDa) se situe au niveau de la surface de la protéine ce qui la rend plus accessible à la MTGase. Tandis que, l'unité basique de la légumine (Lβ 20 kDa) se trouve enfouie à l'intérieur de la protéine ce qui détermine leur comportement vis-à-vis du traitement enzymatique à la MTGase. Cela serait vrai uniquement pour l'état natif. Or, la libération de la Lβ par l'action du DTT a révélé le même comportement qu'à l'état natif. Il semble que ce comportement est plutôt lié à la nature hydrophobe de ce polypeptide **(Gueguen et al,. 1988)** que de son emplacement dans la protéine.

L'effet de la prédénaturation thermique de la β-lactoglobuline sur la réaction enzymatique a été étudié par **Eissa et Khan, 2005** ainsi que **Gauche et al., 2010.** Ces auteurs ont observés une amélioration de la réaction enzymatique tout comme dans le cas de la Glob ther.

Dans les Figures **IV.19 et IV.20** nous avons représenté schématiquement les mécanismes de réticulation enzymatique attribués aux fractions Alb et Glob en fonction de la dénaturation thermique et chimique.

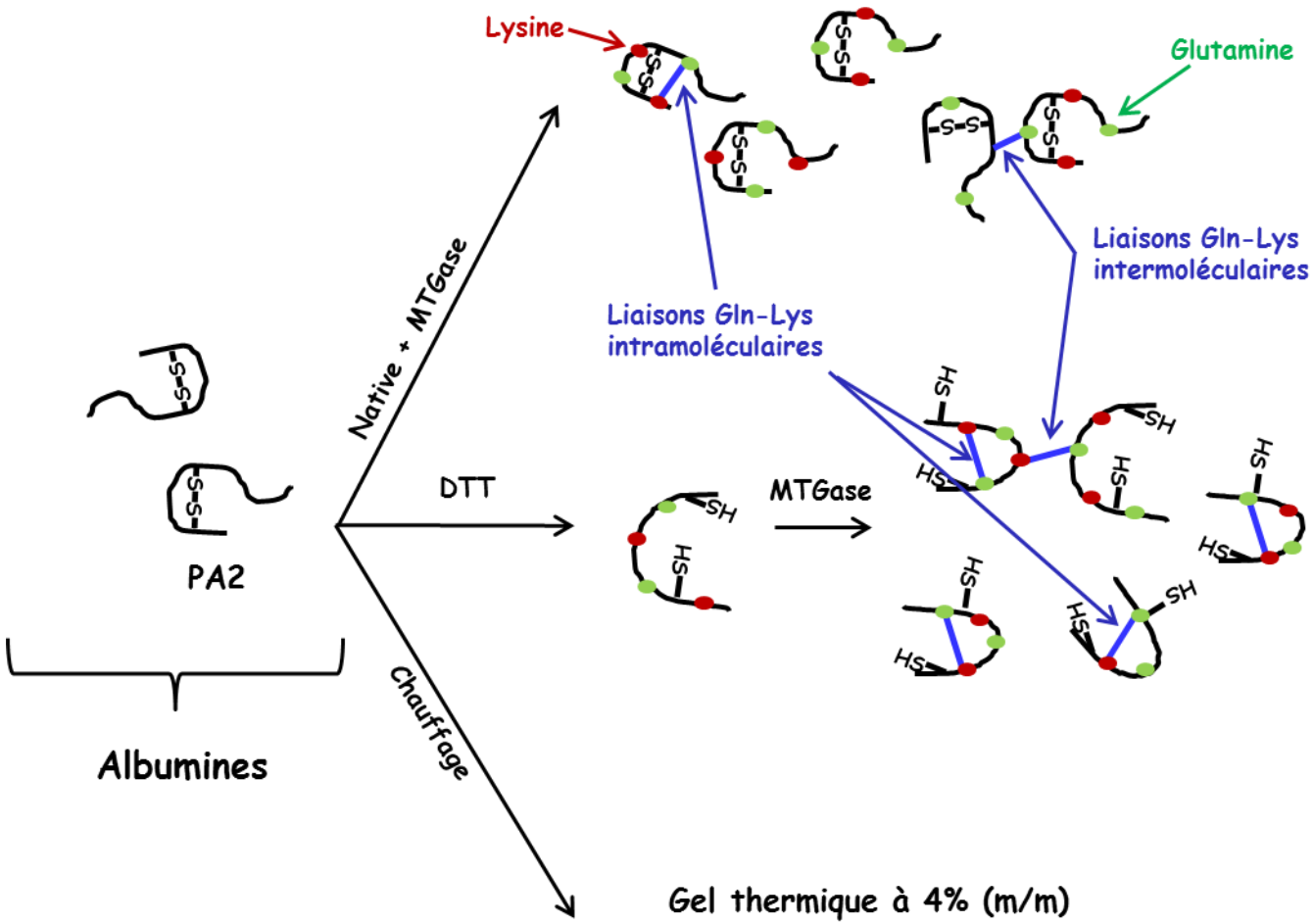


Figure. IV.19. Schéma simplifié des mécanismes de réaction enzymatique des fractions Alb native et dénaturées.

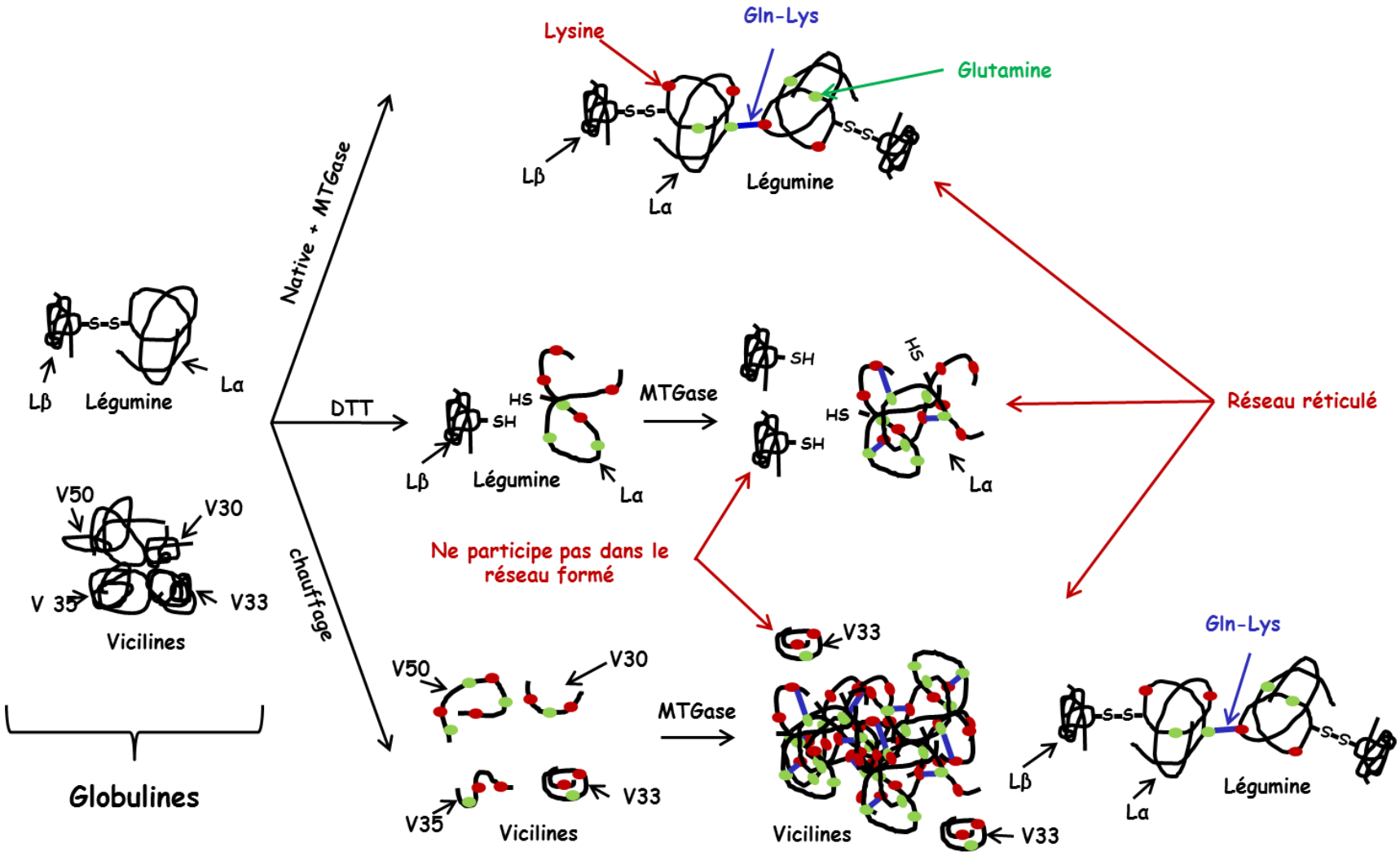


Figure. IV.20. Schéma simplifié des mécanismes de réaction enzymatique des fractions Glob native et dénaturées

III.2.4. Conclusion

La fraction albumine de pois, malgré sa riche composition en lysine et glutamine, est un mauvais substrat pour la transglutaminase et ce même avec une pré-dénaturation thermique ou chimique.

Le traitement enzymatique de la fraction globuline native conduit à la formation d'un gel fort et élastique qui s'améliore avec la pré-dénaturation thermique. Tandis que la pré-dénaturation chimique, malgré l'amélioration du rendement de réaction, affaiblit le gel et augmente la concentration minimale de gélification.

La structure et la conformation de la protéine joue un rôle important pour cette réaction enzymatique et la dénaturation n'est pas un moyen toujours efficace pour améliorer cette voie de gélification. Chaque protéine est un cas à part.

L'électrophorèse a montré que le comportement de la légumine acide (40 kDa) dans la fraction Glob seule, n'est pas le même quand elle était présente, en tant que contaminant, dans la fraction albumine. Le mélange des deux fractions semble donc intéressant à étudier comme substrat à la MTGase.

III.3. Comportement des albumines et des globulines en mélange vis-à-vis de la réticulation enzymatique

III.3.1. Introduction

Jusqu'à présent, il a été montré que la fraction Alb, native et dénaturées, est un mauvais substrat pour la MTGase qui par conséquent ne peut faire l'objet d'un support encapsulant. La fraction Glob se comporte mieux avec la MTGase surtout dans le cas d'une pré-dénaturation thermique. Cependant, ce mode de pré-dénaturation est limitant en termes de concentration protéique (maximum 10% m/m) et de faisabilité technologique (viscosité très élevée).

Dans cette étude, une nouvelle stratégie d'amélioration de la réticulation enzymatique de la fraction Glob de pois a été explorée sans faire recours aux procédés de pré-dénaturation chimique ou thermique, évitant ainsi les limites rencontrées. Il s'agit d'associer la fraction Glob native à celle des albumines natives.

III.3.2. Résultats et discussion

L'idée d'étudier le comportement du mélange des deux fractions Alb et Glob vis-à-vis de la réaction enzymatique résulte des observations relevées lors de l'étude de l'effet de la pré-dénaturation chimique et thermique des deux fractions sur la réticulation enzymatique, où il a été constaté que le polypeptide légumine acide (Lα 40 kDa), présent en tant que contaminant dans la fraction Alb, disparait complètement dès 10 min d'incubation enzymatique. Ceci n'était pas le cas pour la fraction Glob, en absence des polypeptides de la fraction d'Alb. Par ailleurs, un tel mélange existe à l'état natif dans l'extrait protéique brut et pourrait être exploité directement.

Dans ce cadre, nous avons comparé d'abord le comportement de la fraction Glob native (Glob nat), déjà étudiée, avec celui d'un mélange de protéines de pois (PPM) composé de 80% de fraction Glob et 20% de fraction Alb, ce qui reste proche du ratio natif entre ces fractions protéiques.

III.3.2.1. Profils SDS-PAGE

Les profils électrophorétiques des fractions Glob nat et PPM traités avec 20 unités de MTGase / g de protéine à 40 °C et pH 7 sont montrés dans la **Figure.IV.21.**

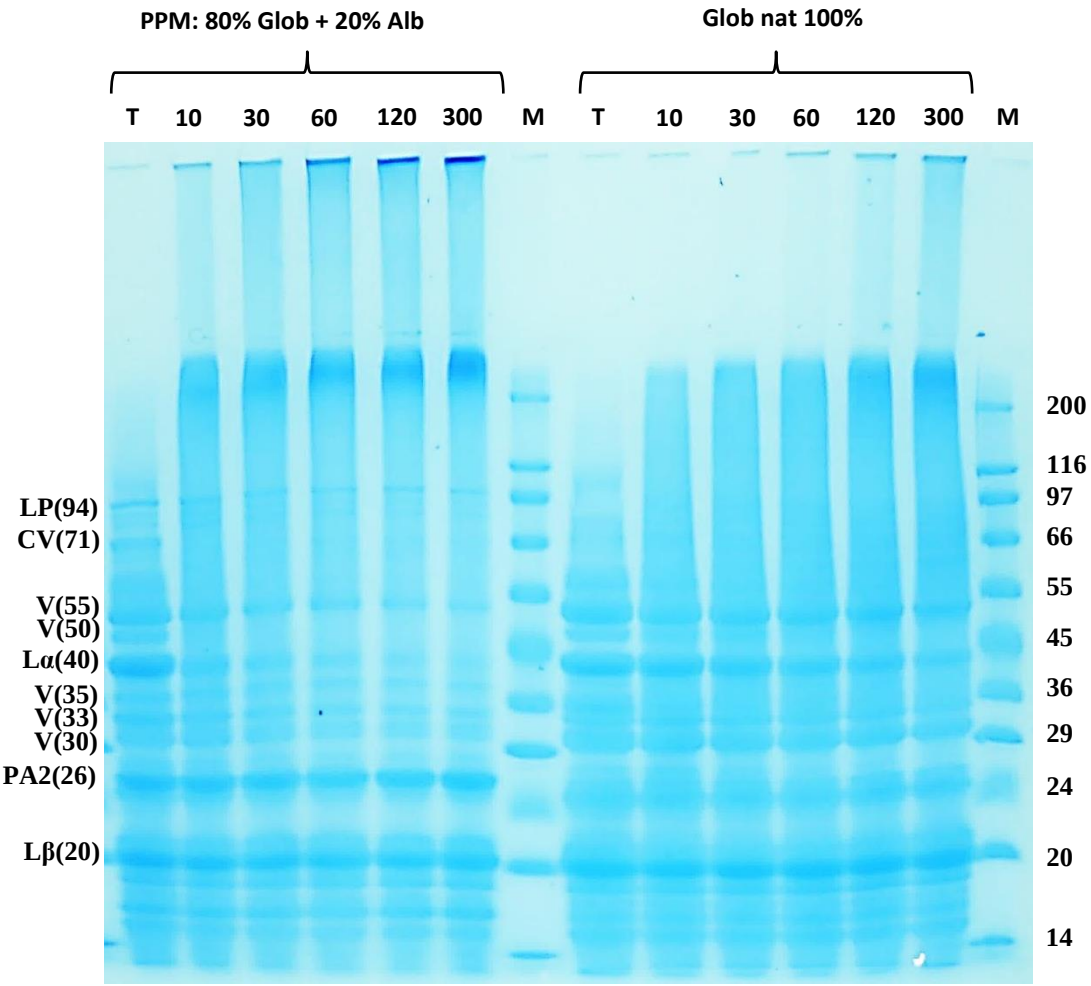


Figure.IV.21. Profils SDS-PAGE des fractions PPM (1% m/m) et Glob nat (1% m/m) incubées avec 20 unités MTGase/g de protéines à 40 °C et pH 7. Gel de concentration et de séparation sont respectivement 4 et 12%. M: Marqueurs de masse molaire (kDa) ; T : témoin ; les pistes 10-300 min: durées d'incubation ; LP : lipoxygénase ; CV : conviciline ; V : polypeptide de la viciline ; Lα : polypeptide acide de la légumine ; PA2 : polypeptide albumine majoritaire ; Lβ : polypeptide basique de la légumine.

Le témoin de la fraction Glob nat, échantillon incubé 300 min à 40°C en absence de MTGase, présente un profil caractéristique de cette fraction. Il est composé de légumines (11S) et vicilines (7S). Dans le témoin du mélange (PPM), on retrouve, en plus du profil de la fraction Glob nat, les polypeptides constituant la fraction Alb (principalement PA2 26 kDa).

Tous les échantillons traités avec la MTGase (pistes 10 à 300 min), en comparaison des échantillons témoins (pistes T), présentent une trainée en haut du gel de séparation qui s'intensifie proportionnellement avec la durée du traitement. Ceci est dû à la formation d'agrégats de haut poids moléculaire engendrés par les liaisons intermoléculaires catalysées par la MTGase. Cette trainée est plus intense pour la PPM que pour la fraction Glob nat. D'ailleurs, dès les dix premières minutes de traitement, une partie des polymères de PPM formés reste accrochés aux fonds des puits et ne peuvent même pas pénétrer dans le gel de concentration. Tandis que dans le cas de la fraction Glob nat, ce phénomène est observé qu'après 120 min de traitement indiquant un meilleur rendement de réticulation pour le mélange PPM.

Au cours du traitement enzymatique, les polypeptides des deux profils évoluent de la même manière à l'exception des polypeptides de la légumine acide (Lα 40 kDa), ainsi que de la viciline 55 kDa du mélange (PPM) qui disparaissent plus rapidement (totalement pour la Lα) que ceux de la fraction Glob nat. La disparition totale du polypeptide Lα n'a pas été observée précédemment dans les cas de pré-dénaturations thermique et chimique. Ceci est probablement dû à la présence de l'albumine qui ne participe pas dans la réaction mais permet de booster la réaction enzymatique, notamment pour la Lα 40 kDa qui disparait totalement après 60 min de traitement.

Basman et al., (2002) ont étudié le comportement des protéines de soja et de blé seules et en mélange. Il a été constaté que, d'une part, la réticulation des polypeptides α et α' de la β-conglycinine (7S) des protéines de soja a été accélérée et leur disparition, du profil SDS-PAGE, a été réduite de 240 min dans le cas des protéines de soja seule à 60 min dans le cas du mélange des deux protéines. D'autre part, les polypeptides des protéines de blé supérieur à 97 kDa, les plus affectées par le traitement enzymatique dans le cas de la protéine seule, deviennent insensibles à la MTGase en présence des protéines de soja.

De même, **Han et Damodaran (1996)** ont observé le même phénomène avec un système binaire composé de β-caséine et β-lactoglobuline et ce au détriment de cette dernière.

Sur cette base, ces auteurs ont suggéré que la réticulation de deux protéines différentes par la MTGase dépend probablement de la compatibilité thermodynamique des deux protéines au site actif de l'enzyme, affectant ainsi la réticulation entre les protéines de même nature (homopolymères) et de nature différente (hétéropolymères). Cette interprétation est peut être vraie dans le cas de la formation des hétéropolymères comme c'est le cas ici entre β-caséine et β-lactoglobuline, et dans notre cas entre Glob et Alb. Mais dans le cas de la formation des homopolymères dans un mélange, pourquoi la réticulation enzymatique est-elle en faveur de l'une des protéines généralement la plus sensible à la MTG en solo (i.e. la Glob), au détriment de l'autre (i.e. l'Alb) même si cette dernière est partiellement sensible (seule) à la MTGase ?

Au vu de ces résultats une question se pose sur la compatibilité thermodynamique entre la protéine et l'enzyme et non pas entre les deux protéines (**De Jong et al., 2001**). En effet, dans le cas d'un système composé d'une seule protéine contenant suffisamment de résidus glutamine et lysine accessibles, la réaction enzymatique dépend fortement du degré de compatibilité de la protéine avec la MTGase. Dans le cas d'un mélange de deux protéines distinctes, la réaction enzymatique sera en faveur de la protéine la plus compatible avec la MTGase. Ceci ne peut être que le résultat de l'incompatibilité d'une des protéines avec la MTGase qui pousse cette dernière de son environnement et la rend ainsi disponible préférentiellement pour l'autre protéine, améliorant ainsi la réticulation de la protéine la plus compatible au détriment de la protéine la moins compatible avec la MTGase.

Sur la base de cette logique, l'incompatibilité thermodynamique peut être exploitée comme une nouvelle stratégie d'amélioration de la réticulation enzymatique des substrats moyennement compatibles avec la MTGase juste en ajoutant un substrat moins compatible avec cette enzyme.

Dans notre étude, l'ajout de la fraction Alb, fraction incompatible avec la MTGase, à la fraction Glob a priori améliore la réticulation de cette dernière. La proportion de chaque fraction dans le mélange étudié (PPM), 20% Alb et 80% Glob, est analogue à celle existant dans la fraction protéique de pois totale (PPT). Dans ce qui suit nous allons comparer le comportement du mélange (PPM, 20% Alb : 80% Glob) avec celui de la fraction totale de protéines de pois (PPT).

La **Figure. IV.22** montre les profils SDS-PAGE des fractions PPM et PPT traitées avec 20 unités de MTGase/g de protéine à 40 °C et pH 7. Les deux profils sont pratiquement

identiques et principalement marqué par la disparition de la légume acide (Lα 40kDa). Le comportement de la fraction protéique totale (PPT) vis-à-vis la réticulation enzymatique est le même que celui de la fraction reconstituée (PPM), ce qui confirme que le changement de comportement de la Lα (40 kDa) est induit par la présence des albumines.

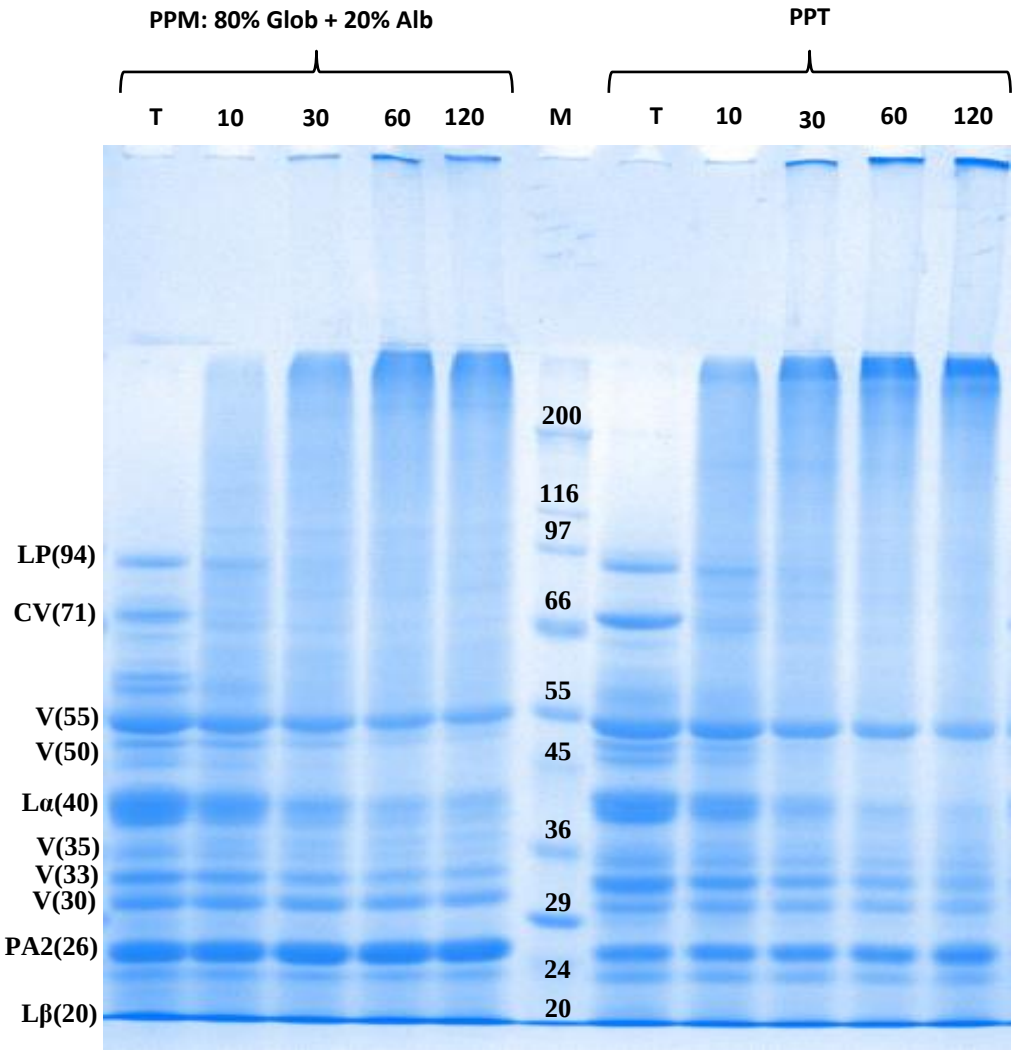


Figure. IV.22. Profils SDS-PAGE des fractions PPM (1% m/m) et PPT (1% m/m) incubées avec 20 unités MTGase/g de protéines à 40 °C et pH 7. Gel de concentration et de séparation sont respectivement 4 et 10%. M: Marqueurs de masse molaire (kDa) ; T : témoin ; les pistes 10-120 min: durées d'incubation ; LP : lipoxygénase ; CV : conviciline ; V : polypeptide de la viciline ; Lα : polypeptide acide de la légumine ; PA2 : polypeptide albumine majoritaire ; Lβ : polypeptide basique de la légumine.

III.3.2.2. Rendement de réticulation et concentration minimale de gélification enzymatique

Dans un premier temps, l'amélioration de la réticulation enzymatique de la fraction Glob par la présence des albumines a été évaluée par le calcul du rendement de réticulation (méthode spectrophotométrique à l'OPA) et par la détermination de la concentration minimale de gélification enzymatique (CMG_{enzy}), appliqués à la fraction PPT native (PPT nat) et comparés à la fraction Glob nat.

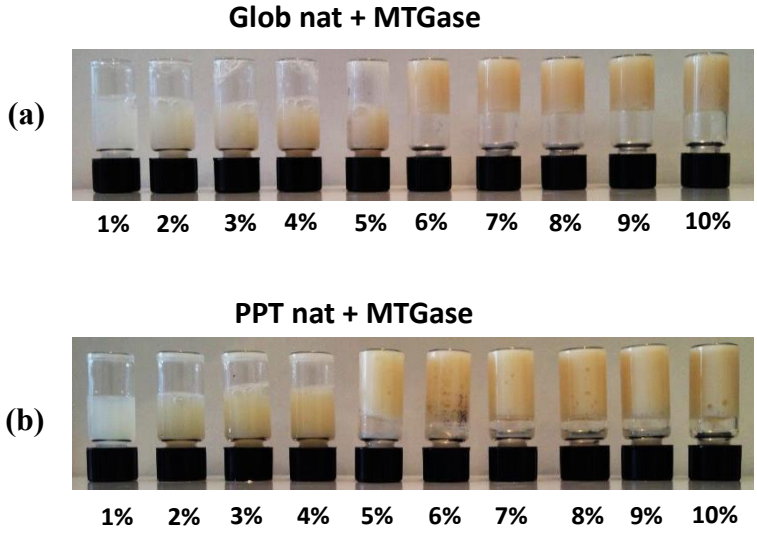


Figure.IV.23. Concentration minimale de gélification enzymatique de (a) : globuline native (Glon nat), (b) : fraction protéique totale native (PPT nat) traitées avec 20 unités MTGase/g protéine à 40°C et pH 7.

Le rendement de réticulation après 300 min de traitement enzymatique ainsi que la (CMG_{enzy}) sont respectivement 25% et 6% pour la fraction Glob nat, et 45% et 5% pour la fraction PPT nat **(Figure.IV.23)**. Ces résultats semble logique et en parfaite adéquation avec les profils électrophorétiques correspondants. Ceci est principalement dû au comportement de la Lα 40 kDa qui en présence des albumines disparait totalement après 60 min de traitement enzymatique (**Figure.IV.21 et IV.22)**.

III.3.2.4. Rhéologie des gels

La **Figure.IV.24** montre l'évolution de G' et de tan δ au cours de l'incubation enzymatique (20 unités MTGase/g protéine, pH7 à 40 °C) d'une solution à 10% (m/m) des fractions Glob nat et PPT nat.

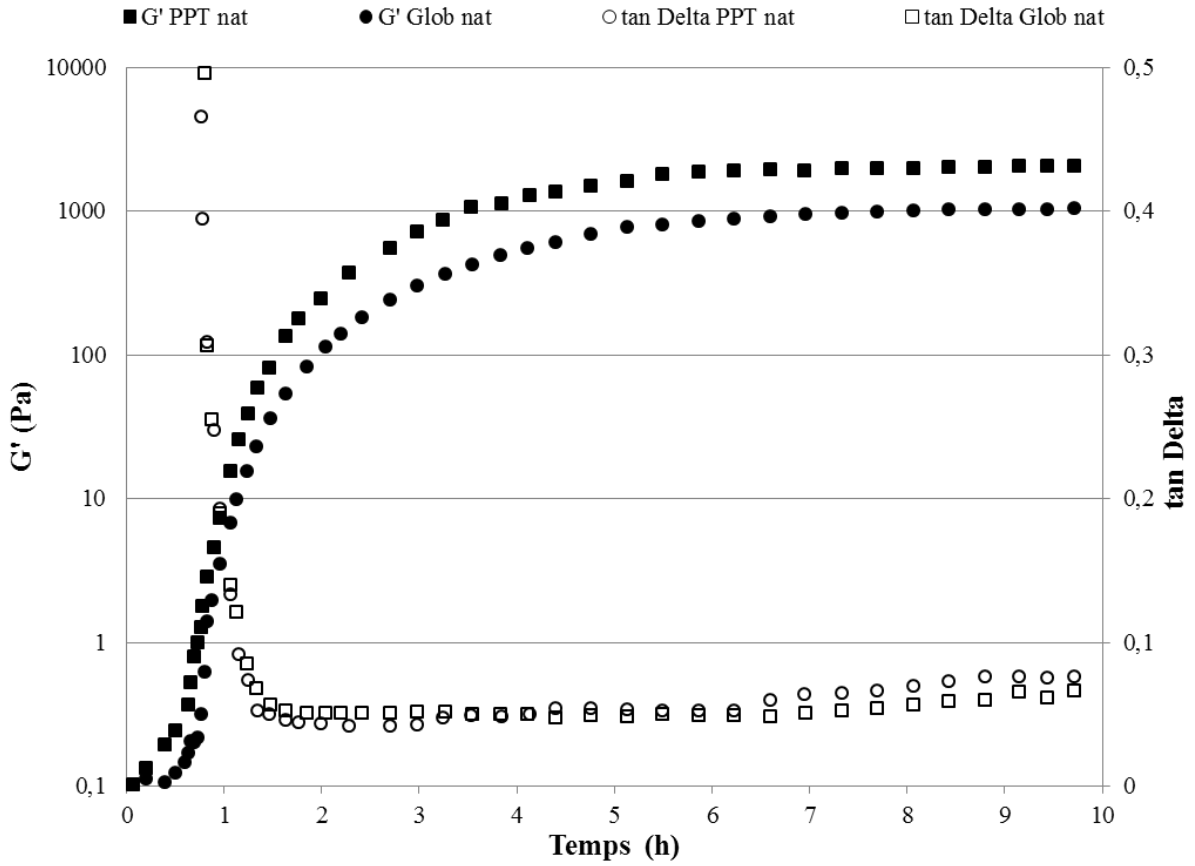


Figure. IV.24. Evolution du module élastique G' et de tang δ en fonction du temps des fractions Glob nat et PPT nat incubées en présence de 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à 40 °C. La concentration protéique des deux fractions est de 10% (m/m).

Les deux fractions ont montré un profil de formation d'un gel. Les modules de conservation G' évoluent très rapidement pour se stabiliser, après 6 h d'incubation enzymatique, à des valeurs respectivement de 1000 et 2000 Pa pour les fractions Glob nat et PPT nat. La présence des Albumines dans la fraction PPT nat conduit à un gel deux fois plus fort que celui obtenu à partir de la fraction Glob nat. Comme décrit précédemment (Chap IV. § III.2), cet effet de synergie vis-à-vis de la réaction enzymatique peut être attribué

principalement à la participation accrue de la légumine dans sa forme oligomérique (360 kDa), au réseau formé.

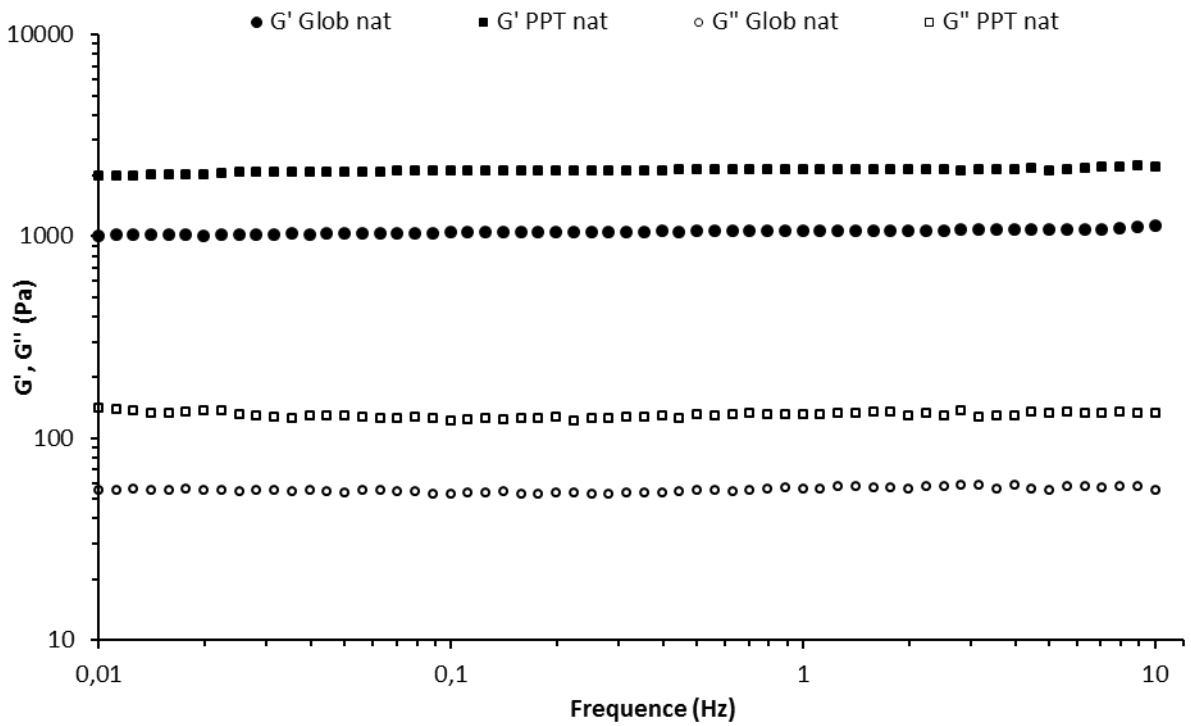


Figure.IV.25. Spectre mécanique (G' et G'' en fonction de la fréquence) des gels (10% m/m) des fractions Glob nat et PPT nat en fin de cinétique de gélification (10 h) à 20 °C.

Les valeurs moyennes de tang δ après 2h d'incubation sont respectivement 0.05 et 0.06 pour les fractions Glob nat et PPT nat. Les spectres mécanique montrent que les modules G' et G'' des deux fractions sont indépendant de la fréquence **Figure. IV.25.** En s'appuyant sur la définition de **Clark et Ross-Murphy (1987)**, on peut qualifier les gels obtenus à partir des fractions Glob nat et PPT nat de gels forts avec comportement quasiment élastique. Cependant, bien que le gel de PPT nat soit 2 fois plus fort que celui de la Glob nat, les valeurs de tan δ de la fraction PTT nat sont légèrement supérieures et instables par rapport à celles de la fraction Glob nat **(Figure. IV.24)**. Ceci est peut-être dû aux protéines d'albumines non gélifiées par la MTGase, qui se trouvent dispersées dans le réseau sous forme de micro-domaines à l'état liquide, conférant au final une plus grande composante visqueuse au gel.

III.3.2.5. Microstructure des gels par microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Les microstructures des gels observées au cours du traitement enzymatique par MCBL des fractions Glob nat et PPT nat sont respectivement présentées dans les **Figure. IV.26.** La protéine étant marquée avec la RITC.

Avant traitement enzymatique, les solutions protéiques des fractions Glob nat et PPT nat montrent une fluorescence uniformément répartie dans le milieu ; aucun réseau n'est formé à ce stade.

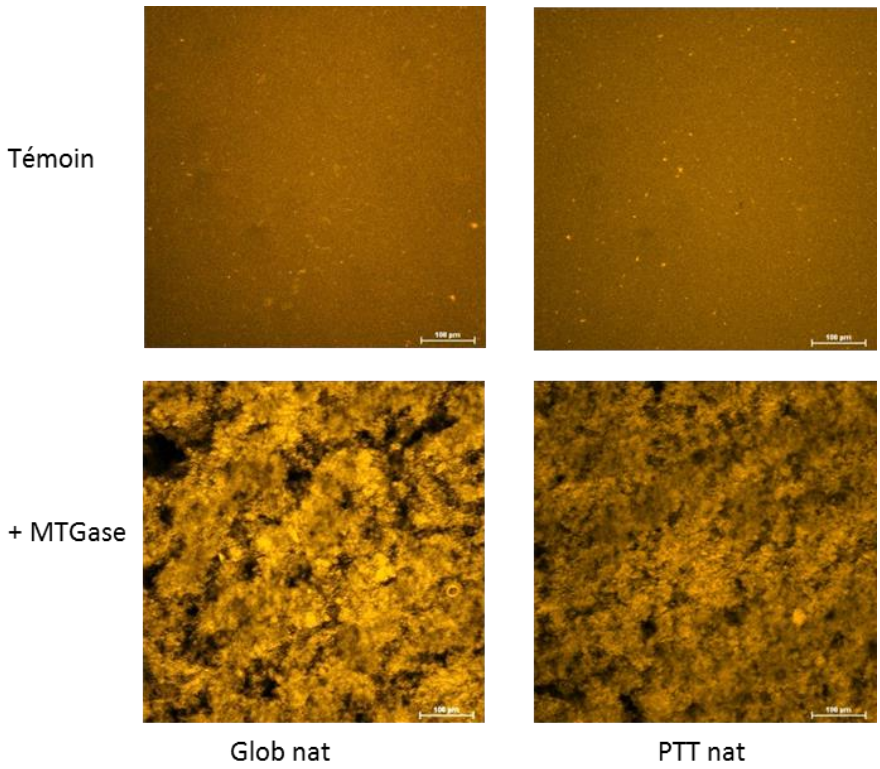


Figure. IV.26. Observations microscopiques par MCBL des fractions Golb nat et PPT nat à 10% (m/m) traitées et non traitées avec 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à 40 °C (Barre d'échelle 100 µm).

Le traitement enzymatique de la fraction Glob nat a conduit à la formation d'un gel avec une structure grossière, caractérisée par des zones sombres de tailles non homogènes. La fraction PPT nat présente une structure plus homogène que celle de la fraction Glob nat, les zones sombres sont réduites et la connectivité entre les particules est améliorée. Cependant, le

contraste est réduit. Ceci est peut-être dû aux protéines d'albumines qui se trouvent dispersées, à l'état liquide, dans le réseau, émettant ainsi une fluorescence qui réduit son contraste.

III.3.3. Conclusion

Le comportement de la fraction Glob nat seule et en mélange vis-à-vis du traitement enzymatique est très différent. En mélange, la réticulation enzymatique des globulines est améliorée, principalement pour la légumine acide, au détriment des albumines. Le mécanisme semble être basé sur un phénomène d'affinité sélective, où le substrat le moins affecté en solo par la réaction enzymatique, dans notre cas l'albumine, repousse la MTGase qui se trouve concentrée dans les micro-domaines du substrat le plus affecté en solo par cette réaction, les globulines, accélérant ainsi la cinétique de réaction et améliorant le rendement de réticulation.

En outre, cette stratégie d'utilisation des albumines de pois, en tant que « booster » et non pas substrat, permet : (i) une meilleure valorisation de cette fraction, pratiquement inexploitée ; (ii) de réduire le protocole d'extraction en une seule étape (extraction alcaline) dans une fraction totale (PPT) contenant les albumines et les globulines ; (iii) de gagner 20 % de globulines qui ont été remplacées par les albumines ; (iiii) d'accélérer la cinétique de la réaction enzymatique et d'améliorer les propriétés du gel formé.

Si ce phénomène d'affinité sélective est applicable sur d'autres substrats, il pourrait faire l'objet d'une stratégie innovante d'amélioration de l'affinité des protéines envers la réticulation enzymatique.

IV. Conclusion du chapitre

La fraction Alb, native et dénaturée, est un mauvais substrat pour la MTGase qui par conséquent ne peut faire l'objet d'un support encapsulant.

Le traitement enzymatique de la fraction Glob native conduit à la formation d'un gel fort qui se renforce avec la pré-dénaturation thermique. Tandis que la pré-dénaturation chimique de cette fraction, malgré l'amélioration du rendement de réticulation, affaiblit le gel et augmente la concentration minimale de gélification. La structure et la conformation de la protéine joue un rôle important pour cette réaction enzymatique et la dénaturation n'est pas un moyen toujours efficace pour améliorer cette voie de gélification. Chaque protéine est un cas à part.

La présence des albumines améliore la réticulation des globulines sans aucun traitement préalable. C'est une stratégie innovante d'amélioration de l'affinité des protéines envers le traitement enzymatique.

La fraction protéique de pois totale constitue à priori une bonne source protéique afin d'élaborer un support encapsulant préparé par vois enzymatique.

Chapitre V : Application à l’encapsulation de la riboflavine

Article 5: Application à l'encapsulation de la riboflavine

Encapsulation of riboflavin in pea proteins microparticles prepared by subsequent emulsion-enzymatic gelation process.

Attaf Djoullah, Soufyane Meraimi, Florence Husson*, Rémi Saurel*.

Journal of Food Engineering (in preparation).

Abstract

In this work, riboflavin was encapsulated in pea proteins microparticles prepared by subsequent emulsion-enzymatic gelation process. Total pea proteins fraction containing 20% albumins and 80% globulins was prepared from pea flour by alkaline extraction (pH8) and ultrafiltration process. Treatment of 15% (w/w) pea proteins by transglutaminase (20 Units/g of protein) at pH 7 and 45°C led to the formation of strong gel (G'= 2000 Pa) with a good water holding capacity (95%). These gel properties were exploited to form microparticles (150 µm) from a water-in-oil emulsion followed by enzymatic gelation. Because of low emulsifying property of pea proteins, addition of surfactant was required to form individual spherical microparticles. The produced microparticles were practically insoluble in gastrointestinal media in the absence of enzymes and slowly degradable in the presence of enzymes. The encapsulation yields were satisfactory and depending on the microparticles size and the amount of charged riboflavin. The release mechanisms of riboflavin in digestive environments are governed by a diffusion phenomenon in the absence of enzymes and by a support degradation phenomenon in the presence of enzymes. This study indicates that pea proteins microparticles prepared by subsequent emulsion-enzymatic gelation process can be used as nutraceutical delivery systems.

Résumé

Dans ce travail, la riboflavine a été encapsulée dans des microparticules à base de protéines de pois préparées par émulsion suivi d'une gélification enzymatique. La fraction protéique totale de pois composée de 20% albumines et 80% globulines a été extraite dans des conditions alcalines et purifiée par ultrafiltration. Le traitement d'une solution protéique de pois (15% m/m) avec de la transglutaminase (20 unités/g de protéine) à pH 7 et 45 °C conduit à la formation d'un gel fort (2000 Pa) avec une bonne capacité de rétention d'eau (95%). Ces propriétés ont été exploitées pour former des microparticules (150µm) à partir d'une émulsion suivie d'une gélification enzymatique. L'ajout d'un agent émulsifiant a été nécessaire pour pouvoir former des microparticules sphériques individualisées. Les microparticules ont été pratiquement insolubles dans les milieux gastro-intestinaux en absence d'enzymes et lentement dégradées en présence d'enzymes. Le rendement d'encapsulation a été satisfaisant et dépendait de la taille des microparticules et de la quantité de riboflavine chargée. Les mécanismes de libération de la riboflavine sont gouvernés par un phénomène de diffusion en absence d'enzymes et un phénomène de dégradation de support en présence d'enzymes. Cette étude montre que les microparticules à base de protéines de pois préparées par émulsion suivie par gélification enzymatique peuvent être utilisées comme un système de libération contrôlée pour des applications nutraceutiques.

I. Introduction

L'encapsulation de substances actives fait l'objet d'un grand nombre de travaux scientifiques et constitue l'un des enjeux majeurs d'innovation dans les secteurs pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire. Pour des raisons d'instabilités chimique et physique, de goût, d'insolubilité mais surtout de biodisponibilité, un grand nombre de molécules (antioxydants, vitamines, probiotiques, minéraux…) est concerné par cette technologie, qui vise principalement à protéger, isoler ou contrôler la libération des substances encapsulées. Il s'agit de créer une barrière entre l'environnement et la substance incluse dans la matrice **(Gouin, 2004 ; Fang et Bhandari, 2010 ; Nedovic et al., 2011)**. L'efficacité de l'encapsulation dépend principalement de la composition et de la structure de la barrière constituée, mais aussi des conditions de traitement et d'utilisation de cette matrice (température, pH, humidité..).

Les systèmes d'encapsulation les plus représentés sont soit des hydrogels sous formes de microsphères (microparticules, billes) où la substance active est dispersée dans la matrice **(Chen et al., 2006)**, soit des microcapsules (système réservoir) où la substance active est emprisonnée au cœur de la microcapsule à l'aide d'une membrane solide **(Grigoriev et al., 2009)**. Des systèmes polyphasés ou multicouches semblent particulièrement prometteurs et adaptés à la problématique de la libération contrôlée **(Gharsallaoui et al., 2012 b; Gharsallaoui et al., 2012 a; McClements et al., 2010)**.

Une des stratégies d'encapsulation est la formation d'hydrogels de protéine à l'état de microparticules. Il s'agit de maîtriser la formation de microparticules par une dispersion de la protéine sous forme d'émulsion suivie d'une gélification. La gélification des protéines est généralement obtenue par voie thermique **(Lee et al., 2000)** ou par l'utilisation d'agents réticulant tel que le glutaraldéhyde **(Lee et al., 1999)**. Cependant, l'instabilité thermique des substances actives ainsi que la toxicité des agents et solvants chimiques limitent leur utilisation. Des méthodes de gélification à froid, par ajout de sel et /ou de variation du pH à des protéines pré-dénaturées en agrégats solubles, se sont donc développées **(Chen et al., 2009; Maltais et al., 2005)**. Une autre méthode qui peut faire l'objet d'une gélification est la réticulation par voie enzymatique (transglutaminase) **(Shand et al., 2008)**. La réticulation enzymatique est largement utilisée pour améliorer la texture des aliments **(Yokoyama et al.,**

2004) mais rarement pour encapsuler des substances actives **(Cho et al., 2003; Heidebach et al., 2009)**.

Par ailleurs, peu de travaux s'intéressent à l'utilisation de protéines végétales comme support encapsulant et peu d'études ont montré l'efficacité d'encapsulation d'un hydrogel formé par réticulation enzymatique.

L'objectif du travail est d'étudier l'efficacité d'encapsulation de microparticules à base d'hydrogel de protéines de pois totale (PPT) formées à partir d'une émulsion inverse Eau/Huile (E/H) suivie d'une gélification par voie enzymatique (transglutaminase).

Le travail consistera dans un premier temps à préparer des microparticules par la dispersion de la protéine sous forme d'émulsion E/H suivie d'une gélification par voie enzymatique. Il s'agira d'abord d'optimiser le procédé d'émulsification (émulsifiant, type d'agitation…), et par la suite de caractériser les microparticules formées (morphologie, taille, dégradation…)

La seconde étape consistera à étudier les performances d'encapsulation de ces microparticules appliquée à la riboflavine. Il s'agira d'étudier *in vitro* la cinétique et les mécanismes de libération de la riboflavine dans des milieux gastrique et intestinal simulés en présence et en absence d'enzymes digestives.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

La farine de pois utilisée a été fournie par la société Roquette Frères (Lestrem France). C'est une farine issue d'un mélange de plusieurs variétés.

La transglutaminase microbienne (MTGase) a été fournie par la société Ajinomoto Foods Europe SAS, France (Activia® WM). Son activité enzymatique a été estimée, par la méthode à l'hydroxamate, à 100 unités d'enzyme/g de préparation enzymatique. L'unité enzymatique est définie par la quantité d'enzyme (poudre) nécessaire pour catalyser la formation de 1 µmol d'hydroxamate par minute à 37 °C et pH 6 **(Folk, 1970)**.

La phase huileuse (Miglyol 812 N) et l'agent émulsifiant (PGPR, E 476) ont été fournis par Sasol Germany Gmbh (Allemagne). Le Miglyol est une huile alimentaire neutre, incolore, inodore et sans goût. Elle présente une stabilité élevée à l'oxydation et reste liquide à 0 °C. Le PGPR (polyricinoléate de polyglycérol) est un émulsifiant hydrophobe (HLB 1.5 ± 0.5) utilisé pour la stabilisation des émulsions type Eau/Huile.

La riboflavine, vitamine B2, a été fournie par Sigma Aldrich® (France). C'est une poudre orange hydrosoluble (10mg/ml). Les réactifs chimiques utilisés pour les différentes analyses sont commercialisés par la société Sigma Aldrich® (France) et VWR (France).

II.2. Méthodes

II.2.1. Propriétés des gels protéiques induits par réaction enzymatique

II.2.1.1. Extraction des protéines

L'extraction de la fraction protéique de pois totale (PPT) a été réalisée dans des conditions alcalines en présence de sel (0.1 M Na_3HPO_4, pH 8 et 1% K_2SO_4) comme décrit précédemment dans le chapitre IV (§ II.2.1). L'extrait protéique PPT est composé d'environ 20% albumines et 80% globulines.

II.2.1.2. Capacité de rétention d'eau

La capacité de rétention d'eau (CRE) des gels réticulés par MTGase a été déterminée par centrifugation **(Kuhn et al., 2011)**. Environ 2 g de solution protéique à la concentration désirée ont été introduits dans des tubes hermétiques puis incubés pendant 10 h à 40° C, pH7 en présence de 20 unités MTGase/g protéine. Après 24 h, les gels formés ont été centrifugés (1500 x g, 5 min, 20 °C) et l'eau libérée a été pesée. La CRE a été calculée par l'équation (V.1) :

$$\mathbf{CRE = 100 * [1- (Eau_{libérée}/ Eau_{gel})]} \quad \text{……..(V.1)}$$

où:

$Eau_{libérée}$ est la masse en g de l'eau libérée après centrifugation ;

Eau_{gel} est la masse en g de l'eau contenue dans le gel avant centrifugation.

II.2.1.3. Rhéologie des gels

L'évolution des propriétés rhéologiques des solutions de PPT (15% m/m) en cours de traitement enzymatique (20 unités MTGase/g protéine, pH 7) a été réalisée dans le but d'étudier l'effet de la température d'incubation sur la cinétique de gélification. Le protocole est décrit dans le chapitre IV (§ II.2.5).

II.2.2. Préparation et caractérisation des microparticules

II.2.2.1. Préparation

Les microparticules de protéines de pois ont été préparées par une émulsion eau dans huile (E/H) suivie d'une gélification par voie enzymatique **(Heidebach et al., 2009)**. Une dispersion protéique à 15% (m/m) a été préparée dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7). Après 2 h d'agitation, l'enzyme a été ajoutée à la solution protéique à raison de 20 unités MTGase/g protéine et l'ensemble (20g) a été rapidement introduit sous agitation (barreau magnétique ~ 900 rpm) dans des flacons contiennant 100 g d'huile (Miglyol® 812 N) préalablement chauffée à 45 °C en présence ou en absence d'émulsifiant (PGPR). Après 2 h d'incubation, sous l'action de la MTGase, les globules de PPT dispersées ont été gélifiés et transformés en microparticules. Les microparticules ont été séparées de l'huile par une centrifugation douce (1000 x g, 5 min), lavées deux fois avec de l'eau en présence de 2% de tween 80, puis récupérées sur un papier filtre et lyophilisées. Dans certain cas, dans le but de

réduire la taille des microparticules, un Ultra-Turrax (IKA T25) a été utilisé au début du process d'agitation (5 min, 10000 rpm).

II.2.2.2. Distribution de taille des microparticules

La distribution de taille des microparticules obtenues a été réalisée par un granulomètre laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Southborough, MA). Toutes les mesures ont été réalisées avec un angle de diffusion de 90° à 25 °C.

II.2.2.3. Morphologie des microparticules

La morphologie et la structure externe des microparticules ont été visualisées par un microscope optique (Nikon TE2000) équipé d'une caméra (EMCCO Andor iXon +885).

II.2.2.4. Solubilité des microparticules

La solubilité des microparticules a été réalisée dans des milieux gastriques synthétiques (solution HCl à pH 1.2) en présence et en absence de 0.1% de pepsine, et intestinal (tampon phosphate à pH 7.4) en présence et en absence de 1 % de pancréatine **(Chen et Subirade, 2009)**. Deux cent mg de microparticules lyophilisées ont été dispersés dans les quatre milieux digestifs (30 ml) sous une agitation continue (~ 100 rpm) à 37 °C. Deux ml de surnageant n'incluant pas de particule ont été prélevés à des intervalles de temps réguliers et la quantité de protéine a été dosée par Kjeldahl. Pour chaque milieu étudié, un volume de milieu digestif équivalent à celui prélevé a été rajouté pour maintenir un volume constant. Le pourcentage de protéines solubles pour chaque point a été calculé à partir de l'équation (V.2).

$$\% \text{ protéines soluble} = (Q_{Pi}/Q_{PT}) * 100 \quad \text{(V.2)}$$

Q_{Pi} : quantité des protéines dissoutes (cumulée) à l' instant i ;
Q_{PT} : quantité des protéines après dissolution totale des microparticules (10h).

II.2.3. Encapsulation de la riboflavine

II.2.3.1. Procédé d'encapsulation :

Le procédé d'encapsulation de la riboflavine a été réalisé comme décrit précédemment pour l'élaboration des microparticules. La riboflavine a été introduite dans la solution protéique avant l'ajout de la MTGase.

II.2.3.2. Capacité et rendement d'encapsulation

Deux cent mg de microparticules encapsulant la riboflavine ont été dissoutes dans 25 ml d'un milieu intestinal (pH 7.4) en présence de 1% de pancréatine à 37°C sous une forte agitation pendant 6 h **(Chen et Subirade, 2009)**. Le mélange a été centrifugé et la riboflavine a été dosée dans le surnageant par un spectrophotomètre UV (Spectronic BioMate 3) à une longueur d'onde de 445 nm en se référant à une courbe d'étalonnage. Le rendement (RE) ainsi que la capacité d'encapsulation (CE) ont été calculées par les équations (V.3 et V.4) :

$$RE = A/B * 100 \quad \text{(V.3)}$$

$$CE = A/C * 100 \quad \text{(V.4)}$$

A : la quantité de riboflavine encapsulée dans la prise d'essai ;
B : la quantité de riboflavine introduite initialement pour l'encapsulation correspondante à la prise d'essai (théorique) ;
C : la masse de la prise d'essai (microparticules).

II.2.3.3. Cinétique de libération dans un milieu gastrique et intestinal

La cinétique de libération de la riboflavine a été étudiée dans les milieux gastrique et intestinal en présence et en absence des enzymes digestives. 200 mg de microparticules lyophilisées ont été suspendues dans 30 ml de chacun des milieux digestifs sous une faible agitation (100 rpm) à 37 °C. Deux millilitres de surnageant n'incluant pas de particule ont été prélevés à des intervalles de temps réguliers puis centrifugés (12000 x g, 10 min) et la quantité de riboflavine dans le surnageant a été dosée à 445 nm. Pour chaque milieu étudié, un volume de milieu équivalent à celui prélevé a été rajouté pour maintenir les mêmes conditions. Le pourcentage de riboflavine libérée pour chaque point a été calculé à partir de l'équation (V.5).

$$\textbf{\% riboflavine libérée} = (Q_{Ri}/Q_{RT}) * 100 \text{……..(V.5)}$$

Q_{Ri} : quantité de la riboflavine libérée à l'instant i ;
Q_{RT} : quantité de la riboflavine totale encapsulée dans la prise d'essai. Elle est calculée après dissolution totale des microparticules (6h).

II.2.4. Analyse statistique

Tous les essais ont été répétés au minimum trois fois. L'analyse de variance (ANOVA) des résultats a été réalisée par le logiciel XLSTAT Pro version 2013. Le test Fisher's a été appliqué avec un intervalle de confiance de 95%.

III. Résultats et discussion

Rappelons qu'une des finalités de l'étude est d'élaborer des microparticules pour encapsuler des molécules actives afin de les protéger et contrôler leur libération dans le tractus gastro-intestinal. Les microparticules doivent être suffisamment fortes pour résister aux stress mécaniques pendant le process d'encapsulation jusqu'à la conservation ; elles doivent avoir une bonne capacité de rétention d'eau ainsi qu'une dégradation lente dans les milieux digestifs pour contrôler la libération des molécules encapsulées.

III.1. Capacité de rétention d'eau

Pour un gel, la synérèse, relargage d'eau, est un facteur indésirable mal perçu par le consommateur et, dans le cas précis d'un système d'encapsulation, n'est pas favorable à la rétention d'une molécule active hydrophile qui y serait incluse. La capacité de rétention d'eau est fonction des paramètres qui déterminent la nature et la stabilité des interactions biopolymères-biopolymères et biopolymères-eau, tels que: le degré de réticulation, le pH, la force ionique mais surtout la concentration en protéines **(Nunes et al., 2006).**

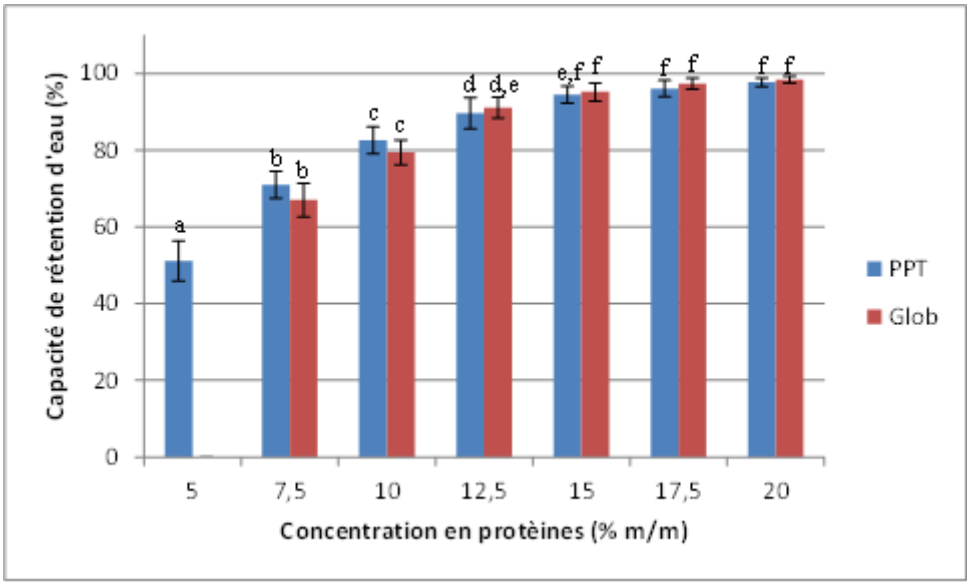


Figure. V.1. La capacité de rétention d'eau des gels protéiques des fractions Glob et PPT obtenus par voix enzymatique (20 unités MTGase/g protéine, pH 7, 40 °C, incubation 10 h) à différentes concentrations.

La **Figure. V.I** montre la capacité de rétention d'eau des gels des fractions Glob et PPT obtenues par voix enzymatique à différentes concentration en protéines. A une

concentration protéique de 5%, la fraction PPT est la seule capable de former un gel avec une capacité de rétention d'eau de 50 %, la fraction Glob n'a pas encore atteint la concentration critique de gélification (6%). A partir d'une concentration protéique de 7.5%, les deux fractions forment des gels dont la capacité de rétention d'eau s'améliore proportionnellement avec la concentration protéique pour atteindre une valeur maximale de 95 % pour un gel à 15% de protéines. Une concentration de 15 % en protéine est maintenue pour la suite de l'étude.

Cette augmentation de la rétention d'eau semble cohérente avec l'augmentation de la densité du réseau protéique stabilisé par la liaison covalente (Gln-Lys). Par exemple, **Faergemand et Qvist (1997)** ont montré que la perméabilité d'un gel laitier obtenu par acidification est améliorée de 3 fois avec un échantillon préalablement traité avec la MTGase. Ils ont conclu que la réticulation enzymatique conduit à la formation d'un gel avec des mailles plus fines qui probablement possède une meilleure capacité de rétention d'eau.

III.2. Rhéologie des gels

Dans le cas de la fraction PPT , la présence des albumines a amélioré la réticulation enzymatique des globulines par l'obtention d'un gel deux fois plus fort **(Chapitre IV, Figure. IV.24)**. Cependant, la cinétique de la réaction peut s'avérer lente pour un procédé d'encapsulation. En effet, la force du gel ne se stabilise qu'après 6 h de réaction. Il est possible d'améliorer cette cinétique en optimisant la température d'incubation.

La **Figure. V.2** présente l'évolution du module de conservation (G') d'une solution de PPT (15%) incubées avec 20 unités MTGase/g protéine, pH 7 à différentes températures en fonction du temps.

Toute la gamme de température étudiée, conduit à la formation de gels dont la vitesse et la force finale sont respectivement proportionnelle et inversement proportionnelle aux températures étudiées. L'incubation de la fraction PPT avec la MTGase pendant 10 h à 55 °C conduit à la formation du gel le plus faible (950 Pa) par rapport aux autres températures. Bien que le gel soit plus rapide à se former à 55°C, cette température est écartée de notre étude. De même, la température 40°C est écartée pour son comportement inverse de celui de 55°C. Le choix est porté donc sur la température 45°C qui semble un bon compromis (par rapport à 50°C) à la fois en termes de cinétique et de force de gel élevées

Concernant la durée d'incubation, elle peut être fixée à 2h étant donné que l'évolution de G' est très lente après cette durée (plateau). Dans une étude similaire, **Heidebach et al. (2009)**, ont utilisé les caséinates comme substrat à la transglutaminase pour encapsuler des probiotiques. Les paramètres de traitement étaient 30°C (3h) et 40°C (2h) dû à l'excellente compatibilité des caséinates avec la MTGase ainsi que la thermo-sensibilité des probiotiques.

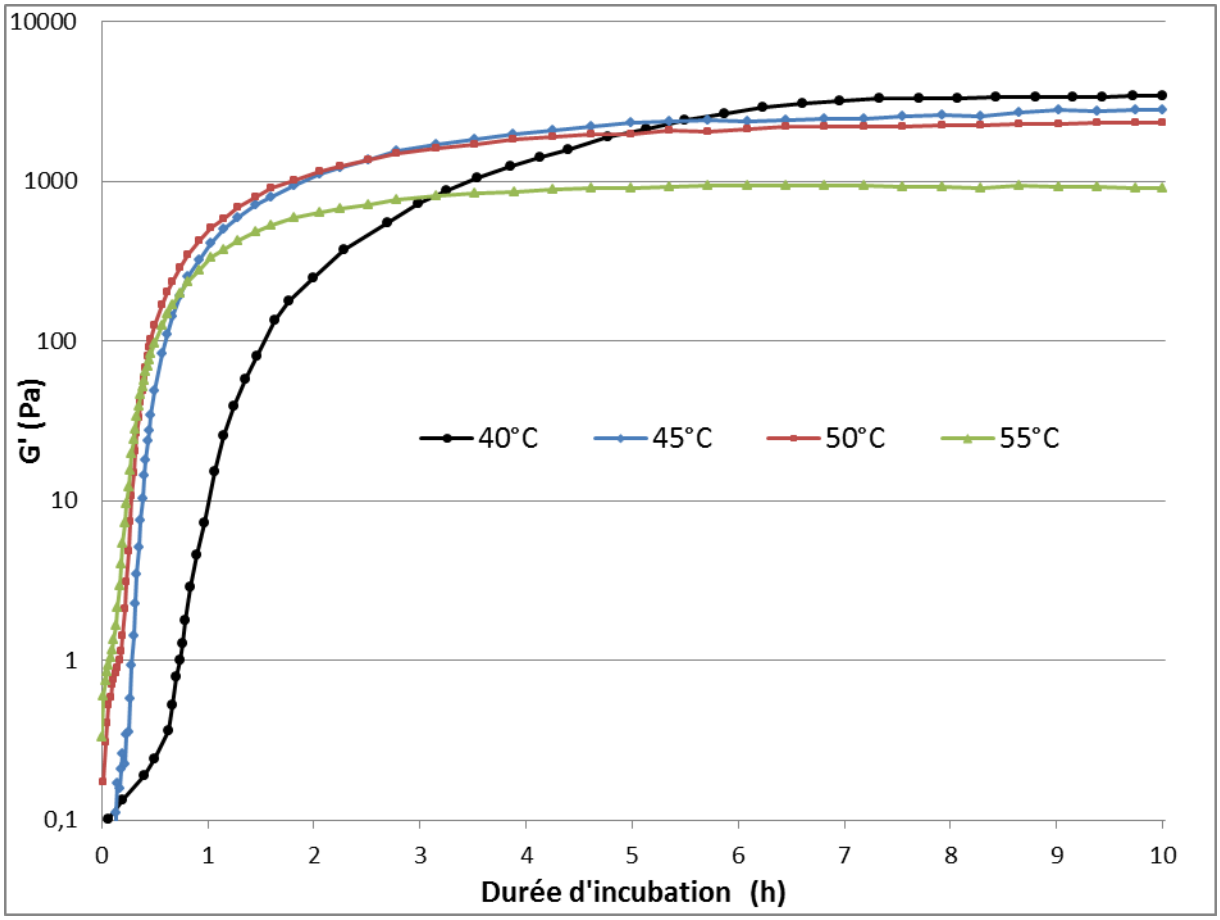


Figure. V.2. Evolution du module de conservation G' en fonction du temps d'une solution de protéines de pois totales (PPT, 15% m/m) incubée en présence de 20 unités MTGase/g protéine, pH7 à différentes températures.

III.3. L'élaboration des microparticules

Afin de pouvoir produire des microparticules individualisées, notre stratégie a consisté à former une émulsion suivie d'une gélification enzymatique. Il est évident que la phase protéique soit la phase dispersée de l'émulsion. Sinon, un bloc de gel sera formé et non pas des particules individuelles. L'émulsion doit être donc de type eau dans huile (E/H). Le

procédé consiste à disperser une solution de PPT (15%) contenant la MTGase dans le Miglyol® 812 N puis d'incuber à 45°C pendant 2h (paramètres préalablement optimisés).

Les premiers essais réalisés ont conduit, après la gélification de la protéine sous l'action de la transglutaminase, à la formation d'un réseau protéique continu de faible densité et non pas des particules individualisées. Ceci est dû aux faibles forces répulsives, dues au faible pouvoir émulsifiant de la PPT, qui n'arrivent pas à empêcher l'association des globules de PPT entre elles. La stabilisation de cette émulsion inverse nécessitait d'utiliser un agent émulsifiant (le PGPR). La **Figure.V.3** montre des images de la fraction PPT gélifiée en présence et en absence de PGPR.

Figure.V.3. Images par microscopie optique de PPT gélifiée en présence et en absence d'émulsifiant : (a) PPT sans PGPR; (b) PPT avec 1% PGPR; (c) PPT avec 2% PGPR.

En absence d'agent émulsifiant (**Figure.V.3a**), la protéine de PPT est gélifiée sous forme d'un réseau semi-continu composé de blocs interconnectés de formes irrégulières. En présence de 1 % de PGPR (**Figure.V.3b**), le gel formé se présente sous forme d'une agrégation de microparticules de forme sphérique. L'agent émulsifiant se trouvant à l'interface H/E a pu donner une forme régulière aux globules protéiques grâce à la tension superficielle mise en jeux. Cependant, ces forces ne sont pas suffisantes pour empêcher totalement la floculation des microparticules. Une quantité supérieure de PGPR est nécessaire pour pouvoir séparer ces petits groupes. En effet, l'utilisation de 2 % de PGPR (**Figure.V.3c**) conduit à la formation de microparticules individuelles de forme sphérique.

III.4. La taille des microparticules

Dans le cas des applications alimentaires, la taille des microcapsules est un facteur très important. Alors que les grandes microparticules peuvent modifier la perception sensorielle, les petites microparticules sont incapables d'offrir une capacité d'encapsulation satisfaisante.

La distribution de taille des microparticules élaborées dans différentes conditions est présentée dans la **Figure.V.4.**

Les microparticules élaborées en présence de 1% de PGPR sous une agitation 900 rpm présentent une distribution non gaussienne et relativement large avec un diamètre moyen de 320 µm, rendant compte d'une distribution multimodale (plusieurs populations). Ce résultat est en parfaite adéquation avec celui observé par microscopie (**Figure.3.1b**) où les microparticules sont rassemblés en petits groupes.

La distribution de tailles des systèmes avec 2% et 3% de PGPR présente des profils gaussiens et étroits avec un diamètre moyen de 153 et 149 µm respectivement. Ces tailles couvrent la majorité des applications alimentaires (**Heidebach et al., 2009)**.

Pour produire des microparticules plus petites, l'émulsion a été d'abord homogénéisée avec un Ultra-Turrax (5 min, 10000 rpm) en présence de 2% PGPR. Le diamètre moyen obtenu est de 28 µm, taille trop petite pour encapsuler la riboflavine. En effet, la libération des molécules encapsulées est gérée par des phénomènes de diffusion et/ou de dégradation de la matrice, qui sont généralement inversement proportionnels à la taille des microparticules **(Berkland et al., 2002)**.

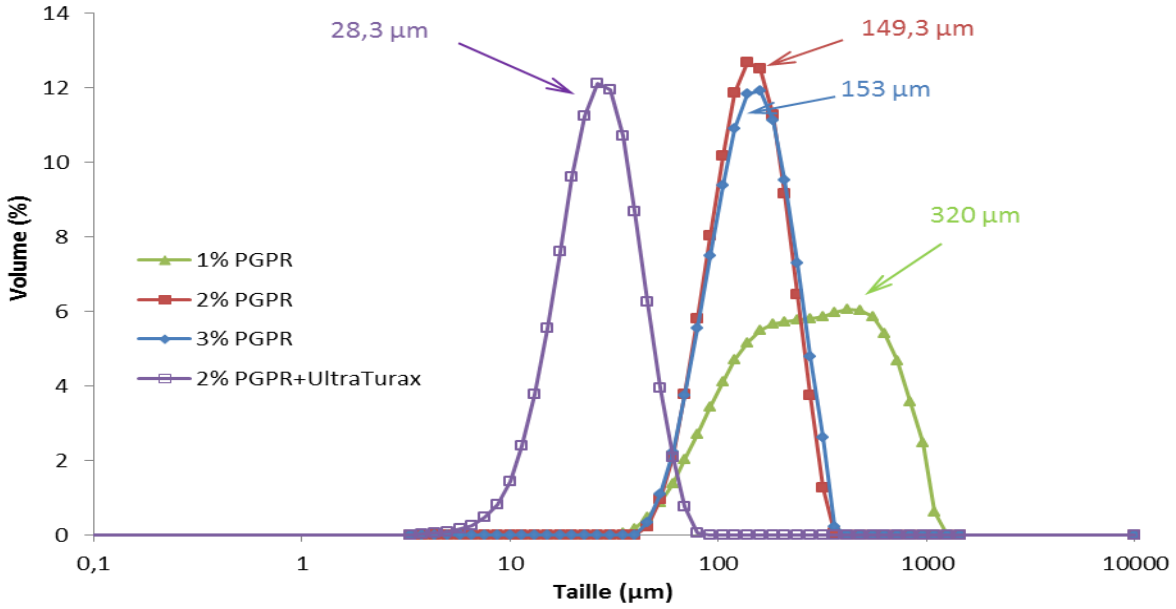


Figure. V.4. Distribution de taille des microparticules de PPT préparées avec différentes concentrations d'émulsifiant (PGPR) et d'agitation.

III.5. Solubilité des microparticules

La dégradation des microparticules de PPT a été étudiée dans des milieux gastrique et intestinal en présence et en absence d'enzymes digestives à 37 °C. Les profils de dégradation sont présentés dans la **Figure.V.5.**

En absence d'enzyme, les microparticules présentent une très faible solubilité (<10%) pour les deux milieux étudiés (pH 1.2 et pH 7.4) et ce même après 48 h (résultats non présentés). Cette insolubilité est une fonctionnalité très demandée pour contrôler la libération des molécules encapsulées. **Cho et al. (2003)** ont montré qu'un gel de soja préparé par voie thermique est 5 fois plus soluble qu'un gel préparé par voie enzymatique. Ceci est dû à la nature des liaisons qui stabilisent le réseau formé, covalentes dans le cas de la réticulation enzymatique (Gln-Lys) et principalement non covalentes dans le cas du gel thermique.

Par contre la présence d'enzymes accélère la dégradation des microparticules. La dégradation étant plus rapide dans le milieu intestinal que dans le milieu gastrique. Elle atteint 80% contre 32% et 90% contre 52% respectivement après 90 et 120 min de contact. Ce comportement de solubilité semble bien adapté pour protéger les molécules actives du milieu gastrique et les libérer dans le milieu intestinal.

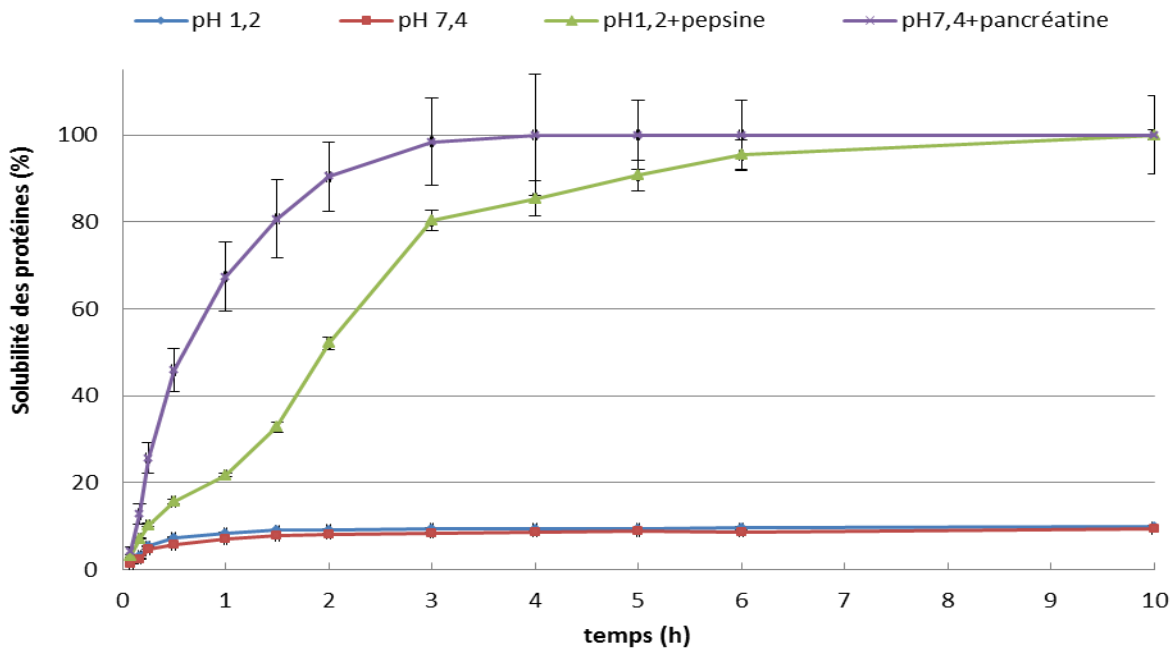


Figure.V.5. Dégradation des microparticules de PPT dans les milieux gastrique pH 1.2 ; pH 1.2 + pepsine ; milieux intestinaux pH 7.4 et pH 7.4 + pancréatine à 37 °C.

III.6. Capacité et rendement d'encapsulation

Afin d'encapsuler la riboflavine dans les microparticules de PPT à l'état dispersé, la riboflavine a été solubilisée dans la solution protéique avant émulsification. Trois teneurs en riboflavine ont été étudiées pour évaluer la capacité de chargement des microparticules à savoir 0.1, 0.5 et 1.0% (m/m) de la solution protéique. Le rendement d'encapsulation ainsi que la capacité d'encapsulation sont présentés dans le **Tableau.V.1.**

Tableau.V.1. Taille, rendement d'encapsulation (RE) et capacité d'encapsulation (CE) des microparticules de PPT préparées sous différentes conditions.

Echantillon	C_{PPT} (%)	C_{Ribo} (%)	Agitation (rpm)	Taille (µm)	RE (%)	CE (%)
1	15	0.1	900	149.2 ± 1.8	84.1± 2.4	0.56
2	15	0.5	900	148.4 ±2.9	81.7± 2.6	2.72
3	15	1	900	151.6 ± 3.1	74.5± 3.4	4.97
4	15	0.1	10000 (Ultra-turax)	31.7 ± 1.2	56.5± 3.4	0.38

C_{PPT} : concentration protéine ; C_{Ribo} : concentration riboflavine.

Les rendements d'encapsulation d'une manière générale sont très satisfaisants (> 74%) à l'exception des microparticules préparées avec l'Ultra-Turax (56%). Cette diminution de rendement est liée principalement à la taille des microparticules et à la solubilité de la riboflavine. En effet, la solubilité de la riboflavine (10 mg/ml) est réduite par la présence des protéines (moins de solvant disponible), qui par conséquent se trouve partiellement cristallisée sous forme de paillettes de 5 à 10 µm rendant difficile leur inclusion dans des microparticules de 30µm. A cet effet, une partie des paillettes de riboflavine reste en dehors de la microparticule qui sera solubilisée et/ou entrainée par l'eau de lavage avant lyophilisation. Cette diminution de taille, de 150 à 30 µm, suite à l'utilisation de l'Ultra-Turrax, s'est traduite par une diminution de capacité d'encapsulation et du rendement d'encapsulation respectivement de 67.2% et 67.9% montrant une bonne cohérence entre les résultats. Ceci peut être observé sur les images de microparticules chargées en riboflavine prisent par microscopie optique (**Figure.V.6**). Il est clairement observé que les grosses microparticules (**Figure.V.6a**) préparées par agitation sont plus chargées en riboflavine que les petites microparticules (**Figure.V.6b**). Ces résultats sont en adéquation avec ceux trouvés par **(Chen et al., 2007)**.

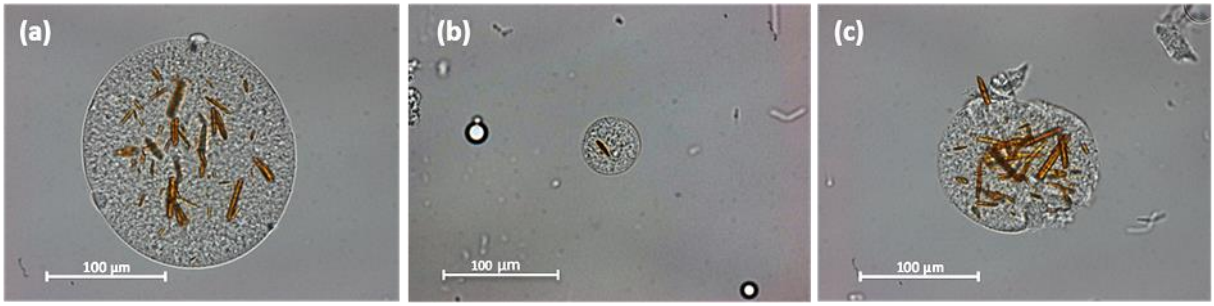


Figure.V.6. Images par microscopie optique de microparticules chargées en riboflavine: (a) préparée par agitation 900 rpm chargée avec 1% de riboflavine ; (b) préparée par ultra-turax chargée avec 0.1% riboflavine ; (c) microparticule en début de dégradation dans le milieu intestinal en présence de pancréatine.

III.7. Libération de la riboflavine

La cinétique de libération de la riboflavine depuis les microparticules de PPT a été réalisée à 37°C dans 4 milieux à savoir : pH 1.2 ; pH 1.2 + pepsine ; pH 7.4 et pH 7.4 + pancréatine. Les résultats de cette étude sont présentés dans la **Figure.V.7.**

En présence d'enzymes, la libération de la riboflavine est rapide et elle est plus importante dans le milieu intestinal (pancréatine pH 7.4) que gastrique (pepsine pH 1.2). Ce sont des profils similaires à ceux de la solubilité des protéines dans les mêmes conditions (**Figure.V.5**) avec une légère différence en faveur de la libération de la riboflavine.

En absence d'enzyme, la libération de la riboflavine est très lente. Elle n'est pas influencée par le pH et atteint une valeur de 40% après 6 h de contact. Ces profils de libération sont différents de ceux observés dans les mêmes conditions pour la solubilité des microparticules (**Figure.V.3**).

Dans tous les cas la libération de la riboflavine est plus importante que la solubilité des microparticules. Ce phénomène est plus visible pour les milieux en absence d'enzyme où les microparticules présentaient une faible solubilité (10% après 10h) avec une libération de riboflavine de 40% après 6 h.

Le mécanisme de libération des molécules actives est basé sur deux principaux phénomènes ; la dégradation (solubilité, érosion…) du support encapsulant et la diffusion de la molécule active à travers le support **(Lee et al., 2002)**.

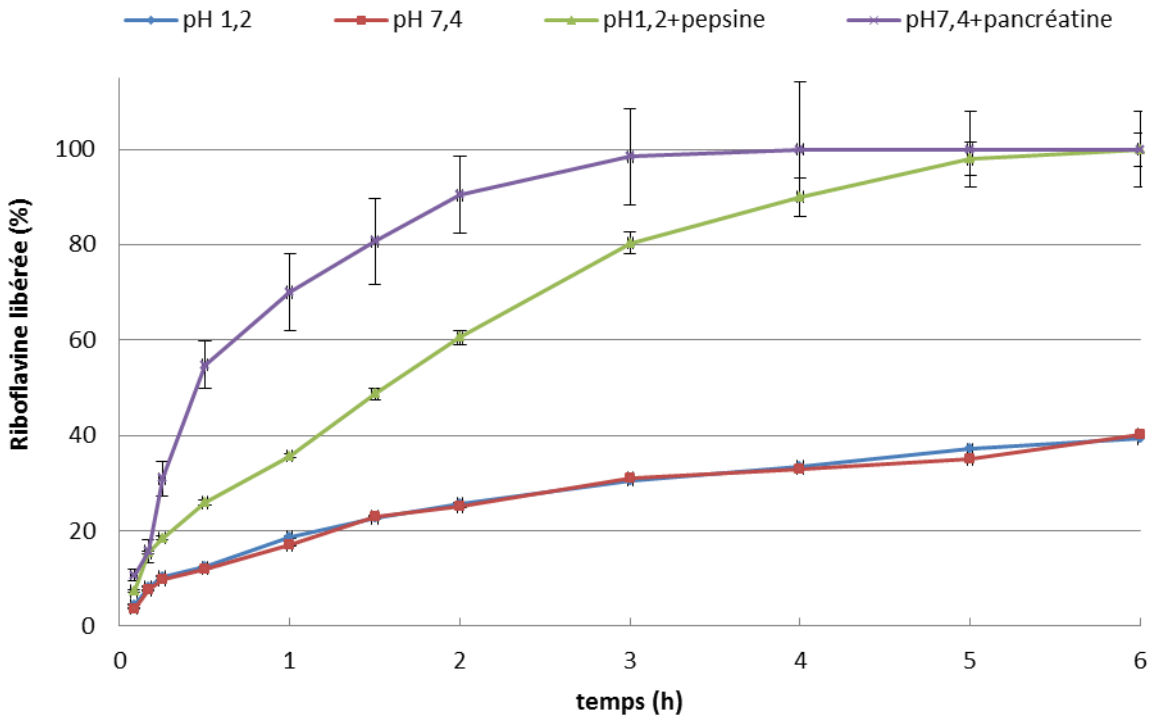


Figure.V.7. Libération de la riboflavine des microparticules de PPT dans différents milieux digestifs à 37 °C.

Selon le modèle de libération des molécules actives à partir d'une matrice sphérique développé par **(Baker et al., 1974)**, la libération est gérée par un phénomène de diffusion, si la courbe $3/2*[1-(1-Q)^{2/3}]-Q$ en fonction du temps est une droite, où Q est le pourcentage de la molécule active libérée.

Les coefficients de régression linéaire de ces courbes (modèle de Baker) pour le milieu gastrique sans pepsine et le milieu intestinal sans pancréatine sont respectivement 0.9895 et 0.9805. Donc la libération de la riboflavine en absence d'enzymes est contrôlée par un phénomène de diffusion. Ce qui explique la différence entre les profils de libération de la riboflavine (40%) et la solubilité des microparticules (10%) dans ces milieux après 6h de contact.

Par contre, le modèle de Baker ne s'applique pas sur les profils de libération de la riboflavine dans les milieux gastrique et intestinal en présence d'enzymes. Le mécanisme de libération dans ces cas, en présence d'enzymes, est basé principalement sur le phénomène de solubilité des microparticules avec une faible contribution du phénomène de diffusion puisque la libération de la riboflavine est supérieure à la dissolution des microparticules.

La **Figure.V.6c** montre une microparticule de PPT en cours de dissolution dans un milieu intestinal en présence de pancréatine. On peut observer clairement la déformation de la microparticule suite à l'action de la pancréatine ainsi qu'une libération d'un cristal de riboflavine à partir de la partie supérieure de la microparticule.

IV. Conclusion du chapitre

La capacité de rétention d'eau importante ainsi que les propriétés gélifiantes de la fraction totale des protéines de pois ont été exploitées pour former des microparticules à partir d'une émulsion eau dans huile suivie d'une gélification enzymatique.

L'ajout d'agent émulsifiant permet d'augmenter les forces répulsives entre gouttelettes de protéines et d'individualiser ainsi les microparticules.

Grâce à la liaison covalente glutamine-lysine qui stabilise le réseau, les microparticules élaborées sont pratiquement insolubles dans les milieux digestifs en absence d'enzymes et se dégradent lentement en présence d'enzymes.

Les rendements d'encapsulation sont satisfaisants et varient en fonction de la taille et de la quantité de riboflavine chargée.

Les mécanismes de libération de la riboflavine dans les milieux digestifs étudiés sont gouvernés par un phénomène de diffusion en absence d'enzymes et par un phénomène de dégradation du support en présence d'enzymes.

Les microparticules préparées par le procédé émulsion-gélification enzymatique à partir de la fraction protéique de pois totale constituent un bon support encapsulant. Cependant, l'application de ce type de microparticules se limite aux composés actifs hydrophiles. Il est intéressant donc de développer aussi un système qui peut encapsuler des composés hydrophobes. L'émulsion double Huile /Eau /Huile suivie d'une gélification enzymatique semble un procédé adéquat pour élargir l'application. Ce système permettrait à la fois d'encapsuler des molécules hydrophobes et hydrophiles dans la même microparticule.

Conclusion générale et perspectives

I. Conclusion générale

L'objet de cette Thèse a été la compréhension des mécanismes gouvernant la formation d'hydrogels à base de protéines de pois réticulés par voie enzymatique avec pour objectif une application à l'encapsulation de la riboflavine. La formation des microparticules a été réalisée par la dispersion de la protéine sous forme d'émulsion suivie d'une gélification par la transglutaminase. Ce choix stratégique reposait sur la valorisation des protéines de pois comme alternative aux protéines de soja ainsi que l'extension des applications d'un mode de gélification non conventionnel aux protéines végétales.

Le premier enjeu de ce projet a été l'obtention de la matière première. Il a fallu mettre au point un procédé d'extraction permettant d'obtenir des fractions protéiques séparées avec une qualité supérieure et une quantité suffisante pour cette étude. Les albumines et les globulines ont été extraites, à partir d'une farine de pois, successivement dans un tampon acétate (pH 4.9) et dans un tampon phosphate (pH 8) selon leur solubilité. Afin d'affecter le moins possible les structures natives des protéines, les fractions protéiques ont été concentrées par ultrafiltration, purifiées par diafiltration et finalement séchées par lyophilisation. La qualité des isolats préparés (pureté, solubilité, niveau de dénaturation…) ainsi que les rendements d'extraction ont été jugés très satisfaisants.

L'analogie des protéines de pois avec les protéines de soja, connues comme étant un bon substrat pour la MTGase, notamment de par leur teneur élevée en résidus glutamine et lysine, a conforté leur utilisation en tant que substrats pour la MTGase. La combinaison des propriétés physico-chimiques des fractions protéiques (solubilité) avec les propriétés enzymatiques (activité et stabilité) ont permis, dans un premier temps, d'optimiser les paramètres de la réaction enzymatique qui est fortement liée à la température, au pH ainsi qu'à la durée d'incubation. Ce dernier point, souvent négligé dans la littérature, a fait l'objet d'une caractérisation approfondie : activité et stabilité enzymatique en fonction de la température et du pH et ce pour des durées d'incubation de 5 heures au lieu de 10 min habituellement étudiées.

La mise en place des méthodes classiques permettant le suivi de la réaction enzymatique a mis en évidence la complexité de la réaction enzymatique. La complémentarité et les limites de ces méthodes ont conduit à l'élargissement des objectifs initialement tracés en développant deux nouvelles approches pour le suivi de la réticulation. La première, basée sur la RMN et

des substrats modèles, a permis la détermination simultanée de la quantité du fragment Glu-Lys formée et du degré de réticulation, et ce au bout de 2 h au lieu de 7 jours avec la combinaison de deux méthodes classiques (HPLC-MS et la méthode spectrophotométrique à l'OPA). Il est à signaler que, dans une logique de simplification, cette méthode a été développée sur des substrats modèles et, par conséquent, devra être validée sur des substrats protéiques réels. Cependant, la méthode RMN nouvellement développée, reste toujours incapable de distinguer les liaisons intra-moléculaires des liaisons inter-moléculaires. A cet effet, une deuxième approche a été développée en se focalisant sur le changement de la taille des protéines avant et après traitement enzymatique. La migration électrophorétique (SDS-PAGE) ainsi que le changement du diamètre moyen des particules (DLS) ont pu mettre en évidence la différence entre les liaisons intra- et inter-moléculaires et ce par la maîtrise de la concentration protéique.

Le deuxième enjeu de la thèse était l'étude du comportement des protéines de pois vis-à-vis du traitement enzymatique. A l'état natif, malgré leur riche composition en résidus Gln et Lys, les fractions Alb et Glob ont montré respectivement une très faible et une moyenne affinité envers le traitement enzymatique. Une limite d'accessibilité de ces deux résidus au site actif de la MTGase, conformément à ce qui peut être observé pour d'autres protéines globulaires (i.e. les protéines sériques), a été mis en évidence ; ce comportement a été attribué aux structures compactes de ces protéines. La solution envisageable pour améliorer cette réaction enzymatique était donc le dépliement de la structure des protéines par dénaturations thermique ou chimique (DTT).

Cependant, à une concentration de 10% (m/m), la fraction Alb n'a pas permis de former un gel induit par réaction enzymatique et ce quelque soit le mode d'affectation des structures protéiques par les deux types de dénaturation ; cette fraction a été classée mauvais substrat pour la MTGase. Il semble que la fraction Alb est capable de former beaucoup plus de liaisons intramoléculaires que de liaisons intermoléculaires empêchant ainsi la formation de gel.

La pré-dénaturation thermique de la fraction Glob a sensiblement amélioré le rendement de réticulation et a conduit au renforcement du réseau réticulé formé, essentiellement par la participation active au réseau protéique de certains polypeptides de vicilines ; ceci s'est traduit par un gel trois fois plus fort que celui obtenu à partir de la fraction Glob native.

Cependant, la pré-dénaturation au DTT, qui paradoxalement améliore le rendement de réticulation en favorisant les liaisons entre certaines sous-unités de globulines, a pour effet de diminuer la force du gel formé. La déstabilisation de la structure oligomérique de la légumine par DTT conduit à la formation d'agrégats réticulés de plus petite taille donnant un réseau de structure plus fine que pour la protéine native. Ces résultats, a priori jamais décrit jusqu'à présent, montrent la complexité de la réaction enzymatique qui est étroitement liée à la structure et à la conformation des protéines. Chaque substrat a un comportement particulier et nécessite préalablement un ajustement spécifique des conditions de prétraitement et de réaction enzymatique, comme par exemple le contrôle du degré de la pré-dénaturation thermique.

Le traitement enzymatique de la fraction totale des protéines de pois natives, composée de 80% Glob et 20% Alb, a montré un comportement particulier par rapport aux fractions pures natives. La réticulation enzymatique des globulines est améliorée, principalement pour les globulines, au détriment des albumines, conduisant à la formation d'un gel plus fort comparativement aux fractions natives seules. Le mécanisme semble être basé sur un phénomène d'affinité sélective, interprété d'une autre façon pour d'autres substrats (incompatibilité thermodynamique), où le substrat le moins affecté en solo par la réaction enzymatique, dans notre cas l'albumine, repousse la MTGase qui se trouve concentrée dans les micro-domaines du substrat le plus affecté en solo par cette réaction, les globulines, accélérant ainsi la cinétique de réaction et améliorant le rendement de réticulation. Si ce phénomène d'affinité sélective est applicable sur d'autres substrats, il pourrait faire l'objet d'une stratégie innovante d'amélioration de la susceptibilité des protéines envers la réticulation enzymatique.

La dispersion d'une solution de protéines de pois totale natives sous forme d'émulsion en présence de la MTGase a permis la formation de microparticules pratiquement insolubles dans les milieux digestifs en absence d'enzymes et qui se dégradent lentement en présence d'enzymes. Les rendements d'encapsulation sont satisfaisants (> 75%) et varient en fonction de la taille des particules et de la quantité de riboflavine chargée. Les mécanismes de libération de la riboflavine dans les milieux digestifs étudiés sont gouvernés par un phénomène de diffusion en absence d'enzymes et par un phénomène de dégradation du support en présence d'enzymes.

II. Perspectives

La nouvelle méthode de la détermination simultanée du degré de réticulation ainsi que la quantité du fragment Glu-Lys formé basé sur l'analyse RMN a été développée sur des petits substrats modèles pour éviter, d'une part, les problèmes liés à la réaction enzymatique (encombrement stérique, accessibilité aux résidus Gln et Lys ainsi que leur rapprochement), et d'autre part, la complexité des signaux RMN des protéines qui rend difficile leur interprétation. La technique nécessite donc un ajustement sur des substrats réels qui n'a pas été abordé par faute de temps. Dans ces conditions, la durée d'analyse pourra être réduite de 7 jours à 2 heures.

Le suivi des liaisons intramoléculaires pourrait être réalisé par HPLC-SEC-MALLS dans le but d'éliminer les étapes de purification sur colonne. En effet, la séparation des protéines traitées avec la MTGase par exclusion stérique, sous forme de monomères, dimères et polymères, permet d'analyser, par un détecteur MALLS, des populations homogènes et ainsi mettre en évidence le rétrécissement de la taille des protéines dû aux liaisons intramoléculaires.

En matière de mise en œuvre des protéines de pois avec la MTGase, on peut imaginer plusieurs combinaisons. Par exemple, traiter les protéines de pois natives ou dénaturées avec la MTGase puis appliquer un traitement thermique ou une acidification, de manière à modifier la structure des gels correspondants (thermique ou à froid) et par la même occasion désactiver l'enzyme. Il est possible d'étudier l'association de protéines de nature différente de type végétal/végétal ou végétal/animal. Il serait également intéressant d'associer les protéines de pois en milieux complexe (protéines/polysaccharides) en vue de préparer des gels mixte avec de nouvelles fonctionnalités.

La nouvelle stratégie d'amélioration de la susceptibilité des protéines vis-à-vis du traitement enzymatique, basée sur le phénomène de l'affinité sélective, doit maintenant être vérifiée avec d'autres substrats pour confirmer notre hypothèse.

Au plan applicatif, les microparticules préparées par le procédé d'émulsion-gélification enzymatique à partir de la fraction protéique de pois totale constitue un bon support encapsulant. Cependant, l'application de ce type de microparticules se limite aux composés actifs hydrophiles. Il est donc intéressant de développer aussi un système qui peut encapsuler

des composés hydrophobes. L'émulsion double Huile /Eau /Huile suivie d'une gélification enzymatique semble un procédé adéquat pour élargir l'application. Ce système permettrait à la fois d'encapsuler des molécules hydrophobes et hydrophiles dans la même microparticule. Un autre verrou pour rendre le système applicable concernera la désactivation de l'enzyme pour ce type de système préparé à froid.

Dans le domaine des biomatériaux, il serait intéressant d'élaborer des films alimentaires comestibles ou biodégradables à base de protéines de pois réticulées par voie enzymatique à fin de substituer ceux qui ont pu être générés à partir de protéines animales (gélatine, lait, œufs…) évitant ainsi des problèmes d'allergie et d'éthique, et en limitant les coûts et l'impact environnemental.

Enfin, il semble possible de développer une multitude d'applications alimentaires visant à améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines végétales telles que la texture, la capacité de rétention d'eau ou la stabilité des mousses et des émulsions, compatibles avec l'évolution de la réglementation liée à l'usage de la transglutaminase..

Références bibliographiques

Aaltonen, T., Huumonen, I., Myllärinen, P., (2014). Controlled transglutaminase treatment in Edam cheese-making. International Dairy Journal 38(2), 179-182.

Abd-Rabo, F.H.R., Ei-Dieb, S.M., Abd-Ei-Fattah, A.M., Sakr, S.S., (2010). Natural state changes of cows' and buffaloes' milk proteins induced by microbial transglutaminase. J Am Sci 6(9), 612-620.

Adebiyi, A.P., Aluko, R.E., (2011). Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (Pisum sativum L.) seed protein isolate. Food Chemistry 128(4), 902-908.

Adler-Nissen, J., (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry 27(6), 1256-1262.

Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H., Motoki, M., (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. Agricultural and Biological Chemistry 53(10), 2613-2617.

Anuradha, S.N., Prakash, V., (2009). Altering functional attributes of proteins through cross linking by transglutaminase - A case study with whey and seed proteins. Food Research International 42(9), 1259-1265.

Babin, H., Dickinson, E., (2001). Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. Food Hydrocolloids 15(3), 271-276.

Baker, R. W., Lonsdale, H. K. (1974). Controlled release: mechanisms and rates. Controlled release of biologically active agents (pp. 15-71): Springer.

Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., Ristic, N., (2010). Profile and Functional Properties of Seed Proteins from Six Pea (Pisum sativum) Genotypes. International Journal of Molecular Sciences 11(12), 4973.

Basman, A., Köksel, H., Ng, P.K.W., (2002). Effects of Transglutaminase on SDS-PAGE Patterns of Wheat, Soy, and Barley Proteins and their Blends. Journal of Food Science 67(7), 2654-2658.

Berkland, C., King, M., Cox, A., Kim, K., Pack, D.W., (2002). Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. Journal of Controlled Release 82(1), 137-147.

Bérot, S., Le Goff, E., Foucault, A., Quillien, L., (2007). Centrifugal partition chromatography as a tool for preparative purification of pea albumin with enhanced yields. Journal of Chromatography B 845(2), 205-209.

Bhatty, R.S., (1982). Albumin proteins of eight edible grain legume species. Electrophoretic patterns and amino acid composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry 30(3), 620-622.

Bönisch, M.P., Huss, M., Weitl, K., Kulozik, U., (2007). Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. International Dairy Journal 17(11), 1360-1371

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

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 43(2), 537-546.

Bronts, H.M., Hendrickx, A.C.M., Mallee, L.F., (2002). Preparation de proteines. Google Patents.

Casey, R., (1982). The genetics of pea seed storage proteins. Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum) 31(3), 281-295.

Casey, R., Short, M.N., (1981). Variation in amino acid composition of legumin from Pisum. Phytochemistry 20(1), 21-23.

Chambi, H., Grosso, C., (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. Food Research International 39(4), 458-466.

Champagne, C.P., Fustier, P., (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Current Opinion in Biotechnology 18(2), 184-190.

Chang, Y.-H., Shiau, S.-Y., Chen, F.-B., Lin, F.-R., (2011). Effect of microbial transglutaminase on the rheological and textural characteristics of black soybean packed tofu coagulating with Agar. LWT - Food Science and Technology 44(4), 1107-1112.

Chen, L., Remondetto, G.E., Subirade, M., (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. Trends in Food Science & Technology 17(5), 272-283.

Chen, L., Subirade, M., (2009). Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery. Biomacromolecules 10(12), 3327-3334.

Cho, Y.H., Shim, H.K., Park, J., (2003). Encapsulation of Fish Oil by an Enzymatic Gelation Process Using Transglutaminase Cross-linked Proteins. Journal of Food Science 68(9), 2717-2723.

Cournarie, F., Savelli, M.-P., Rosilio, V.r., Bretez, F.o., Vauthier, C., Grossiord, J.-L., Seiller, M., (2004). Insulin-loaded W/O/W multiple emulsions: comparison of the

performances of systems prepared with medium-chain-triglycerides and fish oil. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 58(3), 477-482.

Crévieu, I., Berot, S., Guéguen, J., (1996). Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. Food/Nahrung 40(5), 237-244.

Croy, R.D., Gatehouse, J., Marta Evans, I., Boulter, D., (1980b). Characterisation of the storage protein subunits synthesised in vitro by polyribosomes and RNA from developing pea (Pisum sativum L.). II. Vicilin. Planta 148(1), 57-63.

Croy, R.R., Hoque, M.S., Gatehouse, J.A., Boulter, D., (1984). The major albumin proteins from pea (Pisum sativum L). Purification and some properties. Biochem. J. 218(3), 795-803.

Croy, R.R.D., Gatehouse, J.A., Evans, I.M., Boulter, D., (1980a). Characterisation of the storage protein subunits synthesised in vitro by polyribosomes and RNA from developing pea (Pisum sativum L.). I. Legumin. Planta 148(1), 49-56.

Cserhalmi, Z., Czukor, B., Gajzago-Schuster, I., (1998). Emulsifying properties, surface hydrophobicity and thermal denaturation of pea protein fractions. Acta alimentaria 27(4), 357-363.

Damodaran, S., (1996). Amino acids, peptides, and proteins : In Food Chemistry, Marcel Dekker Inc ed. O. R. Fennema, New York, pp. 321-429.

De Barros Soares, L.H., Assmann, F., Záchia Ayub, M.A., (2003). Purification and properties of a transglutaminase produced by a Bacillus circulans strain isolated from the Amazon environment. Biotechnology and Applied Biochemistry 37(3), 295-299.

De Jong, G.A.H., Koppelman, S.J., (2002). Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications. Journal of Food Science 67(8), 2798-2806.

De Jong, G.A.H., Wijngaards, G., Boumans, H., Koppelman, S.J., Hessing, M., (2001). Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and Streptoverticillium mobaraense. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(7), 3389-3393.

Deng, Q., Wang, L., Wei, F., Xie, B., Huang, F., Huang, W., Shi, J., Huang, Q., Tian, B., Xue, S., (2011). Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from Ginkgo biloba seeds. Food Chemistry 124(4), 1458-1465.

Derbyshire, E., Wright, D.J., Boulter, D., (1976). Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry 15(1), 3-24.

Ding, Y., Veeman, M.M., Adamowicz, W.L., (2015). Functional food choices: Impacts of trust and health control beliefs on Canadian consumer's choices of canola oil. Food Policy 52(0), 92-98.

Dinnella, C., Gargaro, M.T., Rossano, R., Monteleone, E., (2002). Spectrophotometric assay using o-phtaldialdehyde for the determination of transglutaminase activity on casein. Food Chemistry 78(3), 363-368.

Dube, M., Schäfer, C., Neidhart, S., Carle, R., (2007). Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. European Food Research and Technology 225(2), 287-299.

Eissa, A.S., Bisram, S., Khan, S.A., (2004). Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(14), 4456-4464.

Eissa, A.S., Bisram, S., Khan, S.A., (2004). Polymerization and gelation of whey protein isolates at low pH using transglutaminase enzyme. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(14), 4456-4464.

Eissa, A.S., Khan, S.A., (2005). Acid-induced gelation of enzymatically modified, preheated whey proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(12), 5010-5017.

Eissa, A.S., Khan, S.A., (2006). Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. Food Hydrocolloids 20(4), 543-547.

Eissa, A.S., Khan, S.A., (2006). Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. Food Hydrocolloids 20(4), 543-547.

Elzoghby, A.O., El-Fotoh, W.S.A., Elgindy, N.A., (2011). Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. Journal of Controlled Release 153(3), 206-216.

Emmert, J.L., Baker, D.H., (1995). Protein quality assessment of soy products. Nutrition Research 15(11), 1647-1656.

Faergemand, M., Qvist, K.B., (1997). Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. Food Hydrocolloids 11(3), 287-292.

Fang, Z., Bhandari, B., (2010). Encapsulation of polyphenols a review. Trends in Food Science & Technology 21(10), 510-523.

Flanagan, J., FitzGerald, R.J., (2003). Characterisation and quantification of the reaction(s) catalysed by transglutaminase using the o-phthaldialdehyde reagent. Food / Nahrung 47(3), 207-212.

Folk, J.E., (1970). Transglutaminase (guinea pig liver), in: Tabor H and Tabor WC (Ed.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, pp. 889-894.

Folk, J.E., Chung, S.I., (1985). Transglutaminases. Methods Enzymology 113:358-375.

Fuhrmeister, H., Meuser, F., (2003). Impact of processing on functional properties of protein products from wrinkled peas. Journal of Food Engineering 56(2), 119-129.

Gan, C.Y., Cheng, L.H., Easa, A.M., (2009). Assessment of crosslinking in combined crosslinked soy protein isolate gels by microbial transglutaminase and maillard reaction. Journal of Food Science 74(2), C141-C146.

Gaspar, A.L.C., de Goes-Favoni, S.P., (2015). Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. Food Chemistry 171(0), 315-322.

Gatehouse, J.A., Gilroy, J., Hoque, M.S., Croy, R.R., (1985). Purification, properties and amino acid sequence of a low-Mr abundant seed protein from pea (Pisum sativum L.). Biochemical Journal 225, 239-247.

Gatehouse, J.A., Lycett, G.W., Croy, R.R., Boulter, D., (1982). The post-translational proteolysis of the subunits of vicilin from pea (Pisum sativum L.). Biochem. J 207, 629-632.

Gauche, C., Barreto, P.L.M., Bordignon-Luiz, M.T., (2010). Effect of thermal treatment on whey protein polymerization by transglutaminase: implications for functionality in processed dairy foods. LWT-Food Science and Technology 43(2), 214-219.

Gerrard, J.A., Fayle, S.E., Brown, P.A., Sutton, K.H., Simmons, L., Rasiah, I., (2001). Effects of microbial transglutaminase on the wheat proteins of bread and croissant dough. Journal of Food Science 66(6), 782-786.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G.l., Beney, L., Chambin, O., Voilley, A.e., Saurel, R.m., (2012b). Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. Food Chemistry 132(4), 1713-1720.

Gharsallaoui, A., Saurel, R.m., Chambin, O., Voilley, A.e., (2012a). Pea (Pisum sativum, L.) Protein Isolate Stabilized Emulsions: A Novel System for Microencapsulation of Lipophilic Ingredients by Spray Drying. Food and Bioprocess Technology 5(6), 2211-2221.

Goämez-Alonso, S., Hermosiän-Gutieärrez, I., Garciäa-Romero, E., (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(3), 608-613.

Gouin, S., (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. Trends in Food Science & Technology 15(7-8), 330-347.

Griffin, M., Casadio, R., Bergamini, C., (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. Biochem. J 368, 377-396.

Grigoriev, D.O., Miller, R., (2009). Mono- and multilayer covered drops as carriers. Current Opinion in Colloid & Interface Science 14(1), 48-59.

Gueguen, J., (1983). Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics. Plant Foods for Human Nutrition 32(3-4), 267-303.

Gueguen, J., Barbot, J., (1988). Quantitative and qualitative variability of pea (Pisum sativum L.) protein composition. Journal of the Science of Food and Agriculture 42(3), 209-224.

Gueguen, J., Chevalier, M., Barbot, J., Schaeffer, F., (1988). Dissociation and aggregation of pea legumin induced by pH and ionic strength. Journal of the Science of Food and Agriculture 44(2), 167-182.

Heidebach, T., Forst, P., Kulozik, U., (2009). Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. International Dairy Journal 19(2), 77-84.

Ho, M.L., Leu, S.Z., Hsieh, J.F., Jiang, S.T., (2000). Technical Approach to Simplify the Purification Method and Characterization of Microbial Transglutaminase Produced from Streptoverticillium ladakanum. Journal of Food Science 65(1), 76-80.

Jackson, P., Boulter, D., Thurman, D.A., (1969). A comparison of some properties of vicilin and legumin isolated from seeds of Pisum sativum, Vicia faba and Cicer arietinum. New Phytologist 68(1), 25-33.

Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T., Rohm, H., (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. Journal of texture studies 37(2), 113-155.

Jouvensal, L., Quillien, L., Ferrasson, E., Rahbé, Y., Guéguen, J., Vovelle, F., (2003). PA1b, an insecticidal protein extracted from pea seeds (Pisum sativum): 1H-2-D NMR study and molecular modeling. Biochemistry 42(41), 11915-11923.

Karr-Lilienthal, L.K., Grieshop, C.M., Spears, J.K., Fahey, G.C., (2005). Amino Acid, Carbohydrate, and Fat Composition of Soybean Meals Prepared at 55 Commercial U.S. Soybean Processing Plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(6), 2146-2150.

Kieliszek, M., Misiewicz, A., (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. Folia microbiologica 59(3), 241-250.

Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., Utsumi, S., (2008). Comparison of Physicochemical Properties of 7S and 11S Globulins from Pea, Fava Bean, Cowpea, and French Bean with Those of Soybean. French Bean 7S Globulin Exhibits Excellent Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(21), 10273-10279.

Kinsella, J., (1979). Functional properties of soy proteins. Journal of the American Oil Chemists Society 56(3), 242-258.

Kobayashi, K., Suzuki, S.-i., Izawa, Y., Yokozeki, K., Miwa, K., Yamanaka, S., (1998). Transglutaminase in sporulating cells of Bacillus subtilis. The Journal of General and Applied Microbiology 44(1), 85-91.

Kuhn, K.R., Cavallieri, A.L.F., da Cunha, R.L., (2011). Cold-set whey protein flaxseed gum gels induced by mono or divalent salt addition. Food Hydrocolloids 25(5), 1302-1310.

Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., Soeda, T., (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. Journal of Food Science 62(3), 488-490.

Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259), 680-685.

Lakemond, C.M.M., de Jongh, H.H.J., Hessing, M., Gruppen, H., Voragen, A.G.J., (2000). Soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(6), 1985-1990.

Lam, P.L., Gambari, R., (2014). Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. Journal of Controlled Release 178, 25-45.

Lawal, O.S., Adebowale, K.O., Ogunsanwo, B.M., Sosanwo, O.A., Bankole, S.A., (2005). On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flours of African locust bean (Parkia biglobossa). Food Chemistry 92(4), 681-691.

Le Gall, M., Gueguen, J., Seve, B., Quillien, L., (2005). Effects of grinding and thermal treatments on hydrolysis susceptibility of pea proteins (Pisum sativum L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(8), 3057-3064.

Le Gall, M., Quillien, L., Sève, B., Guéguen, J., Lallès, J.P., (2007). Weaned piglets display low gastrointestinal digestion of pea (Pisum sativum L.) lectin and pea albumin 2. Journal of Animal Science 85(11), 2972-2981.

Lee, S.J., Rosenberg, M., (1999). Preparation and properties of glutaraldehyde cross-linked whey protein-based microcapsules containing theophylline. Journal of Controlled Release 61(1-2), 123-136.

Lee, S.J., Rosenberg, M., (2000). Whey Protein-based Microcapsules Prepared by Double Emulsification and Heat Gelation. LWT - Food Science and Technology 33(2), 80-88.

Lu, S.Y., Zhou, N.D., Tian, Y.P., Li, H.Z., Chen, J., (2003). Purification and properties of transglutaminase from streptoverticillium mobaraense. Journal of Food Biochemistry 27(2), 109-125.

Luciano, F.B., Arntfield, S., (2012). Use of transglutaminases in foods and potential utilization of plants as a transglutaminase sourceâ€“Review. Biotemas 25(4), 1-11.

Marcone, M.F., Kakuda, Y., Yada, R.Y., (1998a). Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous and monocotyledonous globulin seed storage proteins. Food Chemistry 63(1), 85-95.

Marcone, M.F., Kakuda, Y., Yada, R.Y., (1998b). Salt-soluble seed globulins of dicotyledonous and monocotyledonous plants II. Structural characterization. Food Chemistry 63(2), 265-274.

Matta, N.K., Gatehouse, J.A., Boulter, D., (1981). Molecular and subunit heterogeneity of legumin of Pisum sativum L.(garden pea)- a multi-dimensional gel electrophoretic study. Journal of Experimental Botany 32(6), 1295-1307.

McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J., (2007). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. Journal of Food Science 72(8), R109-R124.

McClements, D.J., Li, Y., (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. Advances in Colloid and Interface Science 159(2), 213-228.

Mession, J.L., Assifaoui, A., Cayot, P., Saurel, R., (2012). Effect of pea proteins extraction and vicilin/legumin fractionation on the phase behavior in admixture with alginate. Food Hydrocolloids 29(2), 335-346.

Mosse, J., (1990). Nitrogen-to-protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38(1), 18-24.

Motoki, M., Aso, H., Seguro, K., Nio, N., (1987a). αs1-Casein film prepared using transglutaminase. Agricultural and Biological Chemistry 51(4), 993-996.

Motoki, M., Kumazawa, Y., (2000). Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. Food Science and Technology Research 6(3), 151-160.

Motoki, M., Nio, N., (1983). Crosslinking between different food proteins by transglutaminase. Journal of Food Science 48(2), 561-566.

Motoki, M., Nio, N., Takinami, K., (1984). Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. Agricultural and Biological Chemistry 48(5), 1257-1261.

Motoki, M., Nio, N., Takinami, K., (1987b). Functional properties of heterologous polymer prepared by transglutaminase between milk casein and soybean globulin. Agricultural and Biological Chemistry 51(1), 237-239.

Motoki, M., Seguro, K., Nio, N., Takinami, K., (1986). Glutamine-specific Deamidation of αs1-Casein by Transglutaminase. Agricultural and Biological Chemistry 50(12), 3025-3030.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B., (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Science 1(0), 1806-1815.

Nesterenko, A., Alric, I., Violleau, F., Silvestre, F., Durrieu, V., (2014). The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. Food Hydrocolloids 41(0), 95-102.

Nicolai, T., Britten, M., Schmitt, C., (2011). B-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. Food Hydrocolloids 25(8), 1945-1962.

Nio, N., Motoki, M., Takinami, K., (1985). Gelation of casein and soybean globulins by transglutaminase. Agricultural and Biological Chemistry 49(8), 2283-2286.

Nio, N., Motoki, M., Takinami, K., (1986a). Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase. Agricultural and Biological Chemistry 50(4), 851-855.

Nio, N., Motoki, M., Takinami, K., (1986b). Gelation of protein emulsion by transglutaminase. Agricultural and Biological Chemistry 50(6), 1409-1412.

Nonaka, M., Matsuura, Y., Motoki, M., (1996). Incorporation of lysine-and lysine dipeptides into αs1-casein by Ca2+-independent microbial transglutaminase. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 60(1), 131-133.

Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K., Matsuura, A., (1989). Polymerization of several proteins by Ca2+-independent transglutaminase derived from microorganisms. Agricultural and Biological Chemistry 53(10), 2619-2623.

Ohtsuka, T., Ota, M., Nio, N., Motoki, M., (2000a). Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 64(12), 2608-2613.

Ohtsuka, T., Sawa, A., Kawabata, R., Nio, N., Motoki, M., (2000b). Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(12), 6230-6233.

O'Kane, F.E., Happe, R.P., Vereijken, J.M., Gruppen, H., van Boekel, M.A.J.S., (2004). Heat-induced gelation of pea legumin: Comparison with soybean glycinin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(16), 5071-5078.

O'Kane, F.E., Vereijken, J.M., Gruppen, H., Van Boekel, M.A.J.S., (2005). Gelation Behavior of Protein Isolates Extracted from 5 Cultivars of Pisum sativum L. Journal of Food Science 70(2), C132-C137.

Osborne, T.B., (1924). The Vegetable Proteins. Longmans, Green, London.

Owusu • Ansah, Y.J., McCurdy, S.M., (1991). Pea proteins: A review of chemistry, technology of production, and utilization. Food Reviews International 7(1), 103-134.

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(2), 337-343.

Pérez, S.G., Vereijken, J.M., van Koningsveld, G.A., Gruppen, H., Voragen, A.G.J., (2005). Physicochemical Properties osf 2S Albumins and the Corresponding Protein Isolate from Sunflower (Helianthus annuus). Journal of Food Science 70(1), C98-C103.

Plietz, P., Damaschun, G., MÜLler, J.J., Schwenke, K.-D., (1983). The Structure of 11-S Globulins from Sunflower and Rape Seed. European Journal of Biochemistry 130(2), 315-320.

Rangel, A., Domont, G.B., Pedrosa, C., Ferreira, S.r.T., (2003). Functional properties of purified vicilins from cowpea (Vigna unguiculata) and pea (Pisum sativum) and cowpea protein isolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(19), 5792-5797.

Riblett, A.L., Herald, T.J., Schmidt, K.A., Tilley, K.A., (2001). Characterization of B-conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(10), 4983-4989.

Rossa, P.N., De Sà, E.M.F., Burin, V.M., Bordignon-Luiz, M.T., (2011). Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. LWT - Food Science and Technology 44(1), 29-34.

Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Kawajiri, H., Motoki, M., (1995). ε-(γ-Glutamyl)lysine crosslink distribution in foods as determined by improved method. Journal of Food Science 60(2), 416-420.

Sathe, S.K., Sze-Tao, K.W.C., Wolf, W.J., Hamaker, B.R., (1997). Biochemical characterization and in vitro digestibility of the major globulin in cashew nut (Anacardium occidentale). Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(8), 2854-2860.

Savage, G.P., Deo, S., (1989). The nutritional value of peas (Pisum sativum). A literature review. Nutr. Abst. Rev 59, 66-83.

Schafer, C., Schott, M., Brandl, F., Neidhart, S., Carle, R., (2005). Identification and quantification of ε-(γ-glutamyl)-lysine in digests of enzymatically cross-linked leguminous proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(8), 2830-2837.

Schafer, C., Zacherl, C., Engel, K.-H., Neidhart, S., Carle, R., (2007). Comparative study of gelation and cross-link formation during enzymatic texturisation of leguminous proteins. Innovative Food Science & Emerging Technologies 8(2), 269-278.

Serafini-Fracassini, D., Del Duca, S., (2008). Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants. Annals of botany 102(2), 145-152.

Shand, P.J., Ya, H., Pietrasik, Z., Wanasundara, P., (2007). Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. Food Chemistry 102(4), 1119-1130.

Shand, P.J., Ya, H., Pietrasik, Z., Wanasundara, P.K.J.P.D., (2008). Transglutaminase treatment of pea proteins: Effect on physicochemical and rheological properties of heat-induced protein gels. Food Chemistry 107(2), 692-699.

Sharma, R., Lorenzen, P.C., Qvist, K.B., (2001). Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of γ-(ε-glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. International Dairy Journal 11(10), 785-793.

Silvestre, M.P.C., (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. Food Chemistry 60(2), 263-271.

Stangierski, J., Rezler, R., Lesnierowski, G., (2014). Analysis of the effect of heating on rheological attributes of washed mechanically recovered chicken meat modified with transglutaminase. Journal of Food Engineering 141(0), 13-19.

Sun, X.D., Arntfield, S.D., (2010). Gelation properties of salt-extracted pea protein induced by heat treatment. Food Research International 43(2), 509-515.

Sun, X.D., Arntfield, S.D., (2011). Gelation properties of salt-extracted pea protein isolate catalyzed by microbial transglutaminase cross-linking. Food Hydrocolloids 25(1), 25-31.

Suzuki, S.i., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K., Yokozeki, K., (2000). Purification and Characterization of Novel Transglutaminase from Bacillus subtilis Spores. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 64(11), 2344-2351.

Tian, S., Kyle, W.S.A., Small, D.M., (1999). Pilot scale isolation of proteins from field peas (Pisum sativum L.) for use as food ingredients. International Journal of Food Science & Technology 34(1), 33-39.

Tsai, G.-J., Lin, S.-M., Jiang, S.-T., (1996). Transglutaminase from Streptoverticillium ladakanum and application to minced fish product. Journal of Food Science 61(6), 1234-1238.

Tzitzikas, E.N., Vincken, J.-P., de Groot, J., Gruppen, H., Visser, R.G.F., (2006). Genetic variation in pea seed globulin composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(2), 425-433.

Umezawa, Y., Ohtsuka, T., Yokoyama, K., Nio, N., (2002). Comparison of Enzymatic Properties of Microbial Transglutaminase from Streptomyces sp. Food Science and Technology Research 8(2), 113-118.

Walsh, D.J., Cleary, D., McCarthy, E., Murphy, S., FitzGerald, R.J., (2003). Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking. Food Research International 36(7), 677-683.

Yasueda, H., Kumazawa, Y., Motoki, M., (1994). Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (Pagrus major). Bioscience, biotechnology, and biochemistry 58(11), 2041-2045.

Yokoyama, K., Nio, N., Kikuchi, Y., (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. Applied Microbiology and Biotechnology 64(4), 447-454.