



**HAL**  
open science

# effet de l'extraction des protéines de tourteaux de chanvre sur leurs fonctionnalités

François Potin

► **To cite this version:**

François Potin. effet de l'extraction des protéines de tourteaux de chanvre sur leurs fonctionnalités. Biotechnologies. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCK076 . tel-03119877

**HAL Id: tel-03119877**

**<https://theses.hal.science/tel-03119877>**

Submitted on 25 Jan 2021

**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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE  
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A AGROSUP DIJON (UMR PAM)**

**Ecole Doctorale Environnements - Santé**

Doctorat de Biotechnologies Agro-Alimentaires

---

**Effet de l'extraction des protéines de tourteaux de chanvre sur  
leurs fonctionnalités**

---

Par

**François POTIN**

Thèse présentée et soutenue publiquement à Dijon, le 13/12/2019

Composition du Jury :

Pr. DESOBRY-BANON, Sylvie	(ENSAIA, Nancy)	Présidente et Examinatrice
Dr. ANTON, Marc	(INRA, Nantes)	Rapporteur
Dr. GHARSALLAOUI, Adem	(Université Lyon 1)	Rapporteur
Pr. SAUREL, Rémi	(Agrosup Dijon)	Directeur de thèse
Dr. HUSSON, Florence	(Agrosup Dijon)	Codirectrice de thèse
Dr. LUBBERS, Samuel	(Agrosup Dijon)	Codirecteur de thèse







## Résumé

Les protéines végétales sont une option cohérente pour nourrir la planète tout en limitant le réchauffement climatique. Les protéines courantes (blé, soja et maïs) ne seront bientôt plus suffisantes pour répondre à l'augmentation de la demande en protéines. Cette thèse porte sur la valorisation d'une nouvelle source de protéine végétale pour l'alimentation humaine, à partir d'un coproduit de l'huilerie : les protéines de chanvre issues de tourteau de presse. Pour répondre à cet objectif, les trois axes suivis sont : la définition des conditions d'extraction, l'étude des propriétés physicochimiques des isolats extraits selon les conditions définies et l'étude de leurs propriétés émulsifiantes. Les données de la littérature relatives à l'extraction des protéines de chanvre sont peu nombreuses et peu détaillées. Les protéines y sont généralement extraites à partir de tourteau délipidé au solvant, par solubilisation alcaline (pH 10), précipitation isoélectrique (pH 5), neutralisation (pH 7) et lyophilisation. Ces isolats protéiques semblent posséder de faibles solubilités sur une large gamme de pH, probablement à cause de fortes interactions entre les protéines au point isoélectrique qui en insolubilise une partie. L'extraction souhaitée dans notre étude, est une extraction à partir de tourteau brut (sans solvant), sans précipitation isoélectrique et permettant d'extraire simultanément les globulines et les albumines. L'impact de conditions d'extraction sur la qualité et la quantité de protéines extraites, est déterminé. Les conditions d'hydratation étudiées sont différents pH (2 à 12), forces ioniques (0 à 500 mM de NaCl) et ratios massiques tourteau/eau (2 à 22%). Les impacts d'une étape de purification par ultrafiltration et du mode de séchage (atomisation ou lyophilisation) sont également étudiés. Seuls des pH alcalins  $\geq 10$  permettent l'extraction simultanée des globulines et des albumines avec des rendements  $\geq 40\%$ . En revanche, de tels pH solubilisent également des composés phénoliques qui peuvent se complexer aux protéines. Une étape de diafiltration par ultrafiltration est nécessaire pour augmenter la pureté protéique à plus de 80% et l'atomisation ne semble pas dénaturante. L'extraction à pH 10 permet d'obtenir des protéines natives. A l'état brut, elles montrent de bonnes aptitudes émulsifiantes. Une dénaturation thermique réduit fortement leurs propriétés émulsifiantes. L'extraction à pH 12 dénature les protéines, certainement suite à une charge de surface élevée qui induit leur dépliement. Des agrégats impliquant probablement des phénols via des liaisons covalentes sont formés. Cependant, la solubilité de ces protéines de même que leurs propriétés émulsifiantes, sont meilleures que celles des protéines extraites à pH 10. A travers ce manuscrit, nous discutons et tentons de comprendre les différences observées entre les protéines extraites à pH 10 et à pH 12.

## Abstract

Plant proteins are a coherent option to feed the planet while limiting global warming. Common proteins (wheat, soya and maize) will soon no longer be sufficient to meet the increased demand for proteins. This thesis focuses on the development of a new source of plant protein for human consumption, based on a co-product of the oil mill: hemp proteins from press-cake. To meet this objective, the three main lines of action are: the definition of extraction conditions, the study of the physico-chemical properties of the isolates extracted under the defined conditions and the study of their emulsifying properties. The data in the literature on the extraction of hemp proteins are limited and not very detailed. Proteins are generally extracted from solvent-delipidated press-cake by alkaline solubilization (pH 10), isoelectric precipitation (pH 5), neutralization (pH 7) and freeze-drying. These protein isolates appear to have low solubilities over a wide pH range, probably due to strong interactions between proteins at the isoelectric point that insolubilize some of them. The extraction desired in our study is an extraction from raw press-cake (without solvent), without isoelectric precipitation and allowing globulins and albumins to be extracted simultaneously. The impact of extraction conditions on the quality and quantity of extracted proteins is determined. The hydration conditions studied are different pH (2 to 12), ionic strengths (0 to 500 mM NaCl) and weight ratios of press-cake/water (2 to 22%). The effects of an ultrafiltration purification step and the drying method (spray or freeze-drying) are also studied. Only alkaline pH  $\geq 10$  allows the simultaneous extraction of globulins and albumins with yields  $\geq 40\%$ . On the other hand, such pH values also solubilize phenolic compounds that can form complexes with proteins. A diafiltration step by ultrafiltration is necessary to increase protein purity to more than 80% and spray-drying does not seem to be denaturing. Extraction at pH 10 produces native proteins. In their raw state, they show good emulsifying properties. Thermal denaturation greatly reduces their emulsifying properties. Extraction at pH 12 denatures proteins, certainly due to a high surface charge that induces their unfolding. Aggregates probably involving phenols via covalent bonds are formed. However, the solubility of these proteins as well as their emulsifying properties are better than those of proteins extracted at pH 10. Through this manuscript we discussed and tried to understand the differences observed between the proteins extracted at pH 10 and pH 12.

# Valorisations scientifiques

## Sur la base des travaux de doctorat

### Publications

#### Article accepté dans des revues internationales à comité de lecture

Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (2019). Hemp (*Cannabis sativa* L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality. *Journal of Food Science*, 84(12), 3682-3690.

#### Chapitre d'ouvrage collectif

Potin, F., & Saurel, R. Hemp seed as a source of food proteins: a review. In HEMP – Production, Characterization and Applications, *Sustainable Agriculture Reviews*, Crini G. and Lichtfouse E. Eds, Springer Nature. A paraître in 2020.

#### Article en préparation

Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. Hempseed (*Cannabis sativa* L.) protein structure, extraction and functionality. En préparation dans *Environmental Chemistry Letters*.

### Communications orales

#### Poster

Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (June 15<sup>th</sup>, 2018). Definition and optimization of the hemp protein extraction process. Forum des jeunes chercheurs. Besançon, France.

Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (November 6-8<sup>th</sup>, 2018). Definition and optimization of the hemp protein extraction process. 32nd EFFoST International Conference. Elsevier. Nantes, France.

#### Présentation orale

Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (November 23<sup>th</sup>, 2017). Extraction and techno-functional properties of hemp proteins. Meetings in research and development of the *Cannabis sativa* L. on the academic and industry fields. Student Association: IAAS, University of Teramo, Teramo, Italy.

## Sur la base des travaux de master

### Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture

Oliete, B., Potin, F., Cases, E., & Saurel, R. (2019). Microfluidization as Homogenization Technique in Pea Globulin-Based Emulsions. *Food and Bioprocess Technology*, 12(5), 877-882.

Oliete, B., Potin, F., Cases, E., & Saurel, R. (2018). Modulation of the emulsifying properties of pea globulin soluble aggregates by dynamic high-pressure fluidization. *Innovative food science & emerging technologies*, 47, 292-300.

## Préambule

Cette thèse est financée par la région Bourgogne Franche-Comté, en partie par le Fond Européen de Développement Régional (FEDER) (n° de conventions : 2016-9205AAO033S03076 et BG0009561). Elle est de type « Jeunes Chercheurs Entrepreneurs » (JCE). Comme son nom l'indique, elle vise à former des auto-entrepreneurs dans l'optique de valoriser l'innovation issue de la recherche publique. Dans ce cadre, elle permet en parallèle des 3 années de doctorat, de suivre un master 2 en management et administration des entreprises au sein de l'Institut d'Administration des Entreprises (IAE) de l'université de Bourgogne. Elle offre ainsi l'opportunité d'obtenir une double compétence. Je remercie la région pour m'avoir donné la chance de réaliser mon doctorat via ce dispositif enrichissant. L'entreprise régionale l'Atelier du Fruit parraine cette thèse. Je remercie l'intérêt porté au sujet par son directeur Monsieur Alain ETIEVANT.

Les sujets de thèse, ainsi que les candidats, sont sélectionnés par la région, par rapport à la plus-value potentielle future qu'elle peut lui apporter et par rapport aux retombées potentielles à l'échelle nationale et/ou internationale. Le chanvre est fortement cultivé dans la région Bourgogne Franche Comté. La filière chanvre dans la région, implique un certain nombre d'acteurs tels que Eurochanvre, Tradical, Géochanvre F, ou Vieille Matériaux pour la transformation des tiges (fibres et chénevottes) ou encore La Goutte d'Or du Plateau et BioBourgogne Vitrine pour la valorisation de l'huile de chanvre.

## Remerciements

Cette thèse a été réalisée à Agrosup Dijon, au sein de l'équipe PCAV (physico chimie des aliments et du vin) appartenant à l'UMR PAM (unité mixte de recherche procédés alimentaires et microbiologiques), dont je remercie les directeurs respectifs Messieurs Laurent BENEY et Thomas KARBOWIAK.

Bien entendu, je remercie, en priorité, Monsieur Rémi SAUREL, directeur de cette thèse, pour avoir cru en mes capacités à sa réalisation et pour m'avoir accompagné tout au long de cette dernière. Je remercie également mes co-encadrants, Madame Florence HUSSON et Monsieur Samuel LUBBERS pour leur suivi et leurs conseils. Merci pour les précieuses recommandations du membre du comité de thèse, Monsieur Romain KAPEL.

Mes remerciements à ceux qui me font l'honneur d'avoir accepté la responsabilité de jury de thèse : à Madame Sylvie DESOBRY-BANON en tant qu'examinatrice et à Messieurs Adem GHARSALLAOUI et Marc ANTON en tant que rapporteurs.

Merci à tous les membres de l'équipe PCAV et de l'UMR PAM pour les petits gestes du quotidien, particulièrement à Yanis, Bonastre, Bernadette et Alexandra. Un remerciement spécial à Elisa, étudiante de Master, pour sa contribution à l'avancement de cette thèse.

Enfin je remercie l'ensemble des mes amis et de ma famille, en particulier ma femme, qui ont contribué à maintenir ma motivation et ma bonne humeur.

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>Valorisations scientifiques .....</b>	<b>3</b>
Sur la base des travaux de doctorat .....	3
Publications.....	3
Article accepté dans des revues internationales à comité de lecture.....	3
Chapitre d’ouvrage collectif.....	3
Article en préparation.....	3
Communications orales.....	3
Poster.....	3
Présentation orale .....	3
Sur la base des travaux de master.....	4
Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture .....	4
<b>Préambule .....</b>	<b>5</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>6</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>12</b>
<b>Liste des figures et annexes .....</b>	<b>14</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>Chapitre I : Etude bibliographique .....</b>	<b>25</b>
I.1. Oléagineux .....	27
I.1.1. Protéines .....	27
I.1.1.1. Globulines 11S et albumines 2S .....	28
I.1.1.2. Protéines de colza.....	28
I.1.1.3. Protéines de sésame .....	29
I.1.1.4. Protéines de tournesol .....	29
I.1.1.5. Protéines de lin.....	30
I.1.1.6. Extraction des protéines d’oléagineux .....	30
I.1.1.6.1. Présentation générale.....	30
I.1.1.6.2. Optimisation de l’extraction.....	33
I.1.1.6.2.1. Optimisation de l’extraction des protéines de colza .....	33
I.1.1.6.2.2. Optimisation de l’extraction des protéines de sésame.....	34
I.1.1.6.2.3. Optimisation de l’extraction des protéines de tournesol .....	35
I.1.1.7. Solubilité .....	35
I.1.1.7.1. Effet du pH sur la solubilité .....	36
I.1.1.7.2. Effet de la force ionique sur la solubilité .....	37
I.1.1.7.3. Effet des conditions opératoires sur la solubilité .....	38
I.1.1.7.4. Solubilité des protéines de colza .....	38
I.1.1.7.5. Solubilité des protéines de tournesol.....	39
I.1.1.7.6. Solubilité des protéines de sésame .....	40
I.1.1.7.7. Solubilité des protéines de soja .....	40
I.1.1.8. Emulsions.....	40
I.1.1.8.1. Définition .....	40

I.1.1.8.2. Formation des films protéiques interfaciaux .....	41
I.1.1.8.3. Mécanismes de déstabilisation .....	42
I.1.2. Composés phénoliques .....	44
I.2. Le chanvre .....	46
I.2.1. Review: « Hemp seed as a source of food proteins: a review » .....	46
I.2.1.1. Abstract .....	46
I.2.1.2. Introduction .....	47
I.2.1.3. Hemp Seed Composition .....	49
I.2.1.3.1. Hemp Proteins .....	50
I.2.1.3.1.1. Globulins .....	51
I.2.1.3.1.2. Albumins .....	52
I.2.1.3.1.3. Amino Acid Composition and Nutritional Value .....	52
I.2.1.3.1.4. Extraction of Hemp Proteins .....	56
I.2.1.3.1.5. Physicochemical Properties and Functionality .....	57
I.2.1.3.1.5.1. Solubility .....	57
I.2.1.3.1.5.2. Water Holding Capacity and Oil Holding Capacity .....	61
I.2.1.3.1.5.3. Gelation .....	61
I.2.1.3.1.5.4. Emulsion .....	63
I.2.1.3.1.5.5. Foam .....	67
I.2.1.3.1.6. Biological Activity .....	68
I.2.1.3.1.6.1. Antioxidant Property .....	68
I.2.1.3.1.6.2. Renal Disease Prevention .....	69
I.2.1.3.1.6.3. Antihypertensive Activity .....	70
I.2.1.3.1.6.4. Hyperglycemia and Inhibition of $\alpha$ -Glucosidase .....	71
I.2.1.3.1.6.5. Degenerative Brain Disease and Inhibition of Acetylcholinesterase .....	71
I.2.1.4. Conclusion .....	72
I.2.2. Extra review .....	73
I.2.2.1. Autres composants des graines de chanvre .....	73
I.2.2.1.1. Huile de chanvre .....	73
I.2.2.1.2. Composés phénoliques .....	74
I.2.2.1.3. Minéraux, vitamines et oligoéléments .....	74
I.2.2.1.4. Facteurs antinutritionnels .....	75
<b>Chapitre II : Stratégie de l'étude .....</b>	<b>77</b>
<b>Chapitre III : Matériel et méthodes .....</b>	<b>83</b>
III.1. Réactifs chimiques et matières premières .....	85
III.2. Préparation des échantillons .....	85
III.2.1. Préparation des matières premières .....	85
III.2.2. Extraction des protéines .....	85
III.2.2.1. Hydratation .....	85
III.2.2.2. Dia-filtration par ultrafiltration .....	86
III.2.2.3. Filtration frontale .....	87
III.2.2.4. Séchage .....	87
III.2.2.5. Récapitulatif des paramètres d'extraction définis pour la constitution des pools d'isolats .....	88
III.2.3. Agrégation thermique .....	88
III.2.4. Préparation des émulsions .....	89
III.3. Caractérisation des matières premières .....	89
III.3.1. Matière sèche .....	89

III.3.2. Taux de cendre .....	90
III.3.3. Teneur en lipide par Soxhlet .....	90
III.3.4. Teneur en azote et en protéine par Kjeldahl .....	91
III.3.4.1. Azote total .....	91
III.3.4.2. Azote non protéique .....	91
III.3.4.3. Solubilité des protéines .....	92
III.3.5. Composition polypeptidique par électrophorèse .....	92
III.3.6. Quantité de phénols totaux.....	93
III.3.7. Mesures calorimétriques par DSC .....	94
III.3.8. Hydrophobicité de surface à l'ANS .....	94
III.3.9. Charge de surface par mesure de potentiel zêta.....	94
III.3.10. Taille des particules par granulométrie laser .....	95
III.3.11. Digestibilité <i>in vitro</i> .....	95
III.3.11.1. Mesure de l'activité enzymatique de la trypsine présente dans la pancréatine .....	95
III.3.11.2. Digestion gastro-intestinale.....	96
III.4. Caractérisation des émulsions .....	97
III.4.1. Taille des gouttelettes lipidiques, floculation et coalescence par granulométrie..	97
III.4.2. Indice de stabilité du crémage.....	98
III.4.3. Viscosité dynamique .....	98
III.4.4. Stabilité des émulsions « modèles » par évolution de la rétrodiffusion .....	98
III.5. Analyses statistiques.....	99
<b>Chapitre IV : Caractérisation de la matière première et mise en place du procédé d'extraction .....</b>	<b>101</b>
IV.1. Introduction du chapitre .....	103
IV.2. Impact des conditions d'hydratation .....	103
IV.2.1. Article : « Hemp ( <i>Cannabis sativa</i> L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality » .....	103
IV.2.1.1. Abstract .....	103
IV.2.1.2. Practical application .....	104
IV.2.1.3. Introduction .....	104
IV.2.1.4. Results and discussion .....	106
IV.2.1.4.1. Whole seed and press-cake composition.....	106
IV.2.1.4.2. Effect of pH on protein solubilization.....	107
IV.2.1.4.3. Effect of ionic strength on protein solubilization.....	110
IV.2.1.4.4. Effect of press-cake/liquid ratio on protein extraction yield.....	112
IV.2.1.4.5. Phenol observation and quantification in aqueous extracts.....	113
IV.2.1.5. Conclusion .....	116
IV.2.2. Extra article.....	117
IV.2.2.1. Essais et comparaisons additionnels .....	117
IV.2.2.1.1. Coloration des surnageants de graines entières vs décortiquées .....	117
IV.2.2.1.2. Impact d'une diminution du pH post hydratation, sur le rendement d'extraction des protéines.....	117
IV.2.2.1.3. Comparaison des profils électrophorétiques de divers extraits de protéines de chanvre.....	119
IV.3. Des extraits protéiques aux poudres protéiques .....	120
IV.3.1. Impact d'une étape de diafiltration et du mode de séchage.....	120
IV.3.1.1. Pureté protéique des poudres .....	120
IV.3.1.1.1. Taux de protéine .....	120

IV.3.1.1.2. Taux de cendre .....	122
IV.3.1.1.3. Phénols totaux .....	123
IV.3.1.2. Profil électrophorétique.....	124
IV.3.1.3. Optimisation du procédé d’ultrafiltration : diavolumes et seuils de coupure des membranes .....	125
IV.3.1.3.1. Taux de protéine .....	125
IV.3.1.3.2. Profil polypeptidique.....	126
IV.3.1.4. Impact d’une étape additionnelle de filtration frontale.....	127
IV.3.1.4.1. Concentration en azote total en fonction du seuil de filtration.....	128
IV.3.1.4.2. Phénols totaux et concentration en azote total en fonction du temps de filtration .....	129
IV.3.1.5. DSC.....	130
IV.3.1.6. Solubilité .....	132
IV.3.2. Rendement d’extraction.....	134
IV.4. Conclusion partielle.....	135
<b>Chapitre V : Caractérisations physico-chimiques et nutritionnelles des isolats protéiques bruts et fonctionnalisés par agrégation thermique .....</b>	<b>139</b>
V.1. Introduction du chapitre.....	141
V.2. Caractérisation des poudres protéiques .....	141
V.2.1. Composition des isolats protéiques.....	141
V.2.2. Caractérisations physico-chimiques et nutritionnelles des protéines brutes et agrégées.....	143
V.2.2.1. DSC .....	143
V.2.2.2. Taille des particules.....	144
V.2.2.3. Hydrophobicité de surface.....	146
V.2.2.4. Charge de surface .....	148
V.2.2.5. Solubilité .....	150
V.2.2.6. Digestibilité <i>in vitro</i> .....	152
V.3. Conclusion partielle .....	154
<b>Chapitre VI : Propriétés émulsifiantes des protéines de chanvre brutes et traitées thermiquement .....</b>	<b>155</b>
VI.1. Introduction du chapitre .....	157
VI.2. Emulsions « témoins » : protéines brutes vs traitées thermiquement.....	157
VI.2.1. Granulométrie des émulsions « témoins ».....	157
VI.2.1.1. Emulsions formées à partir d’isolat obtenu à pH 10 (B10S3, B10S7,5 et A10S7,5) .....	159
VI.2.1.2. Emulsions formées à partir d’isolat obtenu à pH 12 (B12S3, B12S7,5 et A12S7,5) .....	161
VI.2.2. Stabilité au crémage.....	162
VI.3. Emulsions « modèles ».....	163
VI.3.1. Granulométrie des émulsions « modèles » .....	163
VI.3.1.1. Emulsions formées à partir d’isolat obtenue à pH 10 (A10).....	165
VI.3.1.2. Emulsions formées à partir d’isolat obtenu à pH 12 (A12) .....	166
VI.3.2. Viscosité dynamique des émulsions « modèles ».....	167
VI.3.3. Evolution de la rétrodiffusion .....	168
VI.3.3.1. Emulsions formées à partir d’isolat obtenu à pH 10 (A10) .....	168
VI.3.3.2. Emulsions formées à partir d’isolat obtenu à pH 12 (A12) .....	169
VI.4. Conclusion partielle.....	170

<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>173</b>
Conclusion générale .....	175
Perspectives de recherche .....	180
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>183</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>201</b>

## Liste des tableaux

**Table 1: Composition of hemp seed and derived products.** SD: standard deviation. n: number of references. .... 49

**Table 2: *In vivo* and *in vitro* digestibility values of hemp proteins and other plant and animal proteins in percentage.** a: House et al. (2010); b: Malomo & Aluko (2015b); c: X.-S. Wang et al. (2008); d: Schaafsma (2000); e: Sarwar & Peace (1986); f: FAO/WHO & UNU (2007); g: Sarwar (1997); h: Hsu et al. (1977); i: Rutherford et al. (2015); j: Ahrens, Venkatachalam, Mistry, Lapsley, & Sathe (2005); k: Angulo-Bejarano et al. (2008). HPI and SPI, hemp and soy protein isolates respectively. PPC, rice PC and MPC, pea, rice and milk protein concentrates respectively. .... 54

**Table 3: Amino acid composition of proteins from hemp seed and derived products.** Tot AA: total amino acids. Y/O: years old. HPI: hemp protein isolate obtained by isoelectric precipitation. HMI: hemp protein isolate obtained by micellization. Glb: globulins. Alb: albumins. Asx = aspartic acid + asparagine. Glx = glutamic acid + glutamine. Met: methionine. Cys: cysteine. Phe: phenylalanine. Tyr: tyrosine. Hydrophilic = arginine + Asx + cysteine + Glx + histidine + lysine + serine + threonine + tyrosine. Hydrophobic = alanine + glycine + isoleucine + leucine + methionine + phenylalanine + proline + tryptophan + valine. Phobic/Philic = hydrophobic / hydrophilic. Aromatic = phenylalanine + tryptophan + tyrosine. Grey background, limiting amino acids according to FAO recommendations for children aged from 1 to 2 Y/O. Underlined AA, essential amino acids. .... 55

**Table 4: Differential scanning calorimetry data for hemp proteins and other plant protein sources.** Td: denaturation temperature,  $\Delta H$ : denaturation enthalpy, Ton: onset temperature, HPI: hemp protein isolate obtained by isoelectric precipitation, HMI: hemp protein isolate obtained by micellization. a: Tang et al. (2006); b: X.-S. Wang et al. (2008); c: Hadnadev et al. (2018); d: Yin et al. (2008); e: Salgado et al. (2011); f: He et al. (2013); g: Colombo, Ribotta, & León (2010); h: Shen & Tang (2012); i: Liang & Tang (2013); j: Paredes - López, Ordorica - Falomir, & Olivares - Vázquez (1991) ..... 62

**Table 5: Summary of the functional properties studied in the scientific literature.** HPM: Hemp protein meal, HPI: Hemp protein isolate obtained by isoelectric precipitation. HEC: Hemp protein concentrate obtained by enzymatic digestion of press-cake by cellulase, hemicellulase, xylanase and phytase. SPI: Soy protein isolate obtained by isoelectric precipitation. HMI: Hemp isolate obtained by micellization. HPH: Hemp protein hydrolysates. Glb: Hemp globulins. Alb: Hemp albumins. OHC: Oil holding capacity. WHC: Water holding capacity. LGC: Least gelation concentration. ES(I): Emulsifying stability (index). EA(I): Emulsifying activity (index). CS: Creaming stability. FI: Flocculation index. CI: Coalescence index. FC: Foaming capacity. FS: Foaming stability..... 65

**Tableau 6 : Comparaison de composition en acides gras, de plusieurs graines.** Résultats en % massique. AL : acide linoléique. GLA : acide gamma linoléique. SDA : acide stéaridonique. %PUFA : % acides gras polyinsaturés. n6/n3 : ratio oméga 6/oméga 3. Source : repris de l'article de Callaway (2004). .... 73

**Tableau 7 : Préparation des simulants de fluides gastriques (SFG) et de fluides intestinaux (SFI).**..... 96

**Table 8: Composition of whole seeds and hemp press-cake.** All percentages are in w/w dry basis, except for the dry matter in w/w wet basis..... 106

**Tableau 9 : Composition des pools d'isolats protéiques.** pH 10 et 12, les pH d'hydratation du tourteau. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . ..... 141

**Tableau 10 : Hydrolyse, et digestibilité *in vitro* des protéines de chanvre par la pancréatine (en % m/m).** 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de solubilisation des protéines. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . ..... 152

**Tableau 11 : Données chiffrées fournies par granulométrie laser, des émulsions « témoins ».** t0 et t24, les données prises juste après formation des émulsions ou après 24 h à 4 °C. SDS-, les données en présence de SDS.  $d_{[4;3]}$ , les diamètres moyens en  $\mu\text{m}$ . Span la largeur de distribution de taille. IF et IC, les indices de floculation et de coalescence. 10 et 12, les émulsions formées à partir d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A, les émulsions formées à partir de protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5, les pH 3 et pH 7,5 de formation des émulsions. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . ..... 158

**Tableau 12 : Données chiffrées fournies par granulométrie laser des émulsions « modèles ».** t0 et t24, les données prises juste après formation des émulsions ou après 24 h à 4°C. SDS-, les données en absence de SDS.  $d_{[4;3]}$ , les diamètres moyens en  $\mu\text{m}$ . Span, la largeur de distribution de taille. IF et IC, les indices de floculation et de coalescence. A10 et A12, les émulsions formées d'agrégats issus d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 40, 80 et 120 MPa, les pressions d'homogénéisation des émulsions par microfluidisation. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . ..... 165

**Tableau 13 : Viscosité dynamique à 25 °C des émulsions « modèles ».** A10 et A12, les émulsions formées d'agrégats issus d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 40, 80 et 120 MPa, les pressions d'homogénéisation des émulsions par microfluidisation. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . ..... 167

## Liste des figures et annexes

<b>Figure 1 : Représentation de la structure quaternaire d'une globuline 11S d'après Marcone et al. (1998). <math>\alpha</math>, les sous unités acides hydrophiles et <math>\beta</math>, les sous unités basiques hydrophobes.</b> .....	28
<b>Figure 2 : Profil de solubilité, classique en « U », des globulines en fonction du pH. pI le point isoélectrique.</b> .....	36
<b>Figure 3 : Solubilité des protéines en fonction de la force ionique : « salting-in » et « salting-out ». Source : Koolman et Roehm (2011).</b> .....	37
<b>Figure 4 : Schéma d'une émulsion.</b> .....	41
<b>Figure 5 : Mécanismes de déstabilisation des émulsions. (a) émulsion initiale, stable. (b) floculation. (c) coalescence. (d) crémage.</b> .....	43
<b>Figure 6: Composition of different oleaginous and proteaginous seeds. a: Elleuch et al. (2007). b: Rodrigues et al. (2012). c: Callaway (2004); House et al. (2010); Aluko (2017); Sarv (2017); Mattila et al. (2018). d: Erbaş et al. (2005). e: Khattab et al. (2009).</b> .....	50
<b>Figure 7: General extraction procedure of proteins from hemp seed. pI: isoelectric point.</b> .....	56
<b>Figure 8: Solubility of hemp proteins as a function of pH. (A) Real nitrogen solubility of hemp protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (HPI), hemp protein hydrolysates (HPH), chemically modified HPI (succinylated or acetylated) and soy protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (SPI). (B) Relative nitrogen solubility of isolated hemp globulins (Glb) and albumins (Alb). (C) Relative nitrogen solubility of hemp protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (HPI) and hemp press cake. Results from a: Yin et al. (2008); b: Yin et al. (2009); c: Karki et al. (2009); d: Malomo &amp; Aluko (2015a); e: Malomo et al. (2014); f: Malomo &amp; Aluko (2015b); g: Kim &amp; Lee (2011a); h: Hadnađev et al (2018); i: Dapčević-Hadnađev et al. (2019); j: Tang et al. (2006); k: Q. Wang et al. (2018).</b> .....	59
<b>Figure 9 : Représentation schématique de la démarche scientifique.</b> .....	80
<b>Figure 10 : Schéma récapitulatif du procédé d'extraction appliqué pour la constitution des pools d'isolats. DV, le dia-volume.</b> .....	88
<b>Figure 11: Extraction yield of total and non-protein nitrogen, and aqueous extract color from hemp cake as a function of hydration pH. NTot: total nitrogen and NnP: non-protein nitrogen. The color of the supernatants is shown under the histogram. Different letters represent significant differences at <math>p &lt; 0.05</math>.</b> .....	107
<b>Figure 12: Electrophoretic profiles of the aqueous extracts obtained after hydration at different pHs. Electrophoresis gels under denaturing conditions (SDS), non-reducing (a) or reducing (b). MW: standard molecular weights; 2 to 12 as pH of hydration. 11S <math>\alpha\beta</math>: monomer of edestin; 11S <math>\alpha</math> and 11S <math>\beta</math>: <math>\alpha</math> and <math>\beta</math> edestin subunits; 7S: 7S globulin subunit and Alb: albumins.</b> .....	109
<b>Figure 13: Total nitrogen content in aqueous extracts as a function of ionic strength at pH 9 to 12. Different letters represent significant differences at <math>p &lt; 0.05</math>.</b> .....	110
<b>Figure 14: Electrophoretic profiles of aqueous extracts after hydration with or without NaCl. Electrophoresis gels under denaturing (SDS), non-reducing (a) and reducing (b) conditions. MW: standard molecular weights; 9 to 12: pH of hydration, with or without 200</b>	

mM NaCl (+ and - respectively). Total nitrogen amount standardized in all wells. 11S  $\alpha\beta$ : monomer of edestin; 11S  $\alpha$  and 11S  $\beta$ :  $\alpha$  and  $\beta$  edestin subunits; 7S: 7S globulin subunit and Alb: albumins. .... 112

**Figure 15: Total nitrogen extraction yield and total nitrogen content in aqueous extracts as a function of the press-cake/liquid hydration ratio.** Extra: extraction yield after hydration at pH 10 or 12 (left ordinate). %N: total nitrogen in aqueous extracts after hydration at pH 10 or 12 (right ordinate). Different letters represent significant differences at  $p < 0.05$ . .... 113

**Figure 16: Color observation of aqueous extracts under different pH conditions.** After extraction at pH 2 (a), 7 (b) and 12 (c) (left tubes), pHs of aqueous extracts were shifted to 12, 12 and 2 respectively (right tubes). .... 114

**Figure 17: Total phenolic content in aqueous extracts at different hydration pH.** GAE: gallic acid equivalent. Histograms with the left ordinate. Dotted curve with the right ordinate. Different letters represent significant differences at  $p < 0.05$ . .... 115

**Figure 18 : Coloration des surnageants résultants de l'hydratation à pH 12 de tourteau de graines entières (à gauche) ou de graines décortiquées (à droite).** .... 117

**Figure 19 : Rendements d'extraction, après hydratation à pH 10 ou 12, et après abaissement successif du pH à 10, du surnageant obtenu après hydratation à pH 12.** 10 et 12 les pH d'hydratation. 12>10 le surnageant obtenu suite à une hydratation à pH 12 et abaissement à pH 10. Ntot l'azote total. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 118

**Figure 20 : Profils électrophorétiques de divers extraits de protéines de chanvre.** Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS), réductrices ou non réductrices (avec ou sans DTT). Dans les puits : MT le marqueur de taille ; C 10 et C 12 l'isolat commercial hydraté à pH 10 ou 12 ; 10 et 12 les surnageants de protéines totales après hydratation des tourteaux à pH 10 ou 12 ; 12>10 le surnageant obtenu après hydratation du tourteau à pH 12, abaissé à pH 10 ; Glb et Alb les surnageants de globulines et albumines résultants d'une extraction fractionnée au point isoélectrique. Quantité d'azote total standardisée dans tous les puits. 11S  $\alpha$  et 11S  $\beta$  les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'édestine 11S, et 11S  $\alpha\beta$  le monomère résultant de leur liaison. 7S la bande de globuline 7S et Alb les bandes d'albumines. .... 119

**Figure 21 : Taux de protéine des différents isolats.** La quantité de protéine a été déterminée par Kjeldahl après multiplication de l'azote total par 6,25. A et L : les isolats séchés par atomisation ou lyophilisation respectivement. 10 et 12 : les isolats obtenus après hydratation à pH 10 ou 12 respectivement. UF : les isolats obtenus après une étape de diafiltration (ultrafiltration à 5 kDa). Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 121

**Figure 22 : Taux de cendre des différents isolats.** A : les isolats obtenus par séchage par atomisation. 10 et 12 : les isolats obtenus après hydratation à pH 10 ou 12. UF : les isolats obtenus après une étape de diafiltration à l'ultrafiltration. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 122

**Figure 23 : Impact du procédé de diafiltration par ultrafiltration sur la quantité de phénols totaux.** En ordonnée la quantité de phénols totaux en mg équivalent d'acide gallique par g de protéine. I10 et I12 : les isolats obtenus après hydratation des tourteaux à pH 10 ou 12. UF : les isolats obtenus après une étape de diafiltration. S3 et S10 : les surnageants de protéines solubles obtenus par solubilisation des isolats à pH 3 ou 10. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 123

**Figure 24 : Profil électrophorétique des différents isolats.** Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS), réductrices (R) ou non réductrices (NR) (avec ou sans DTT).

Dans les puits : MT le marqueur de taille ; 10 et 12 les isolats obtenus après hydratation à pH 10 ou 12 ; UF ceux obtenus après étape de diafiltration. Quantité d'azote total standardisée dans tous les puits. 11S  $\alpha$  et 11S  $\beta$  les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'édésine 11S, et 11S  $\alpha\beta$  le monomère résultant de leur liaison. 7S la bande de globuline 7S et Alb les bandes d'albumines. .... 124

**Figure 25 : Taux de protéines des isolats en fonction du seuil de coupure et du nombre de diavolume.** DV, le nombre de diavolumes d'eau distillée à pH 10. 5 et 10 kDa, les seuils de coupure utilisés. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 126

**Figure 26 : Profil électrophorétique en fonction du seuil de coupure et du nombre de diavolumes.** Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS), réductrices (R) ou non réductrices (NR) (avec ou sans DTT). (a) seuil de coupure de 5 kDa et (b) seuil de coupure à 10 kDa Dans les puits : MT le marqueur de taille et 0 à 5 le nombre de diavolume d'eau distillée à pH 10. 11S  $\alpha$  et 11S  $\beta$  les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'édésine 11S, et 11S  $\alpha\beta$  le monomère résultant de leur liaison. 7S la bande de globuline 7S et Alb les bandes d'albumines. Quantité d'azote total standardisée dans tous les puits. .... 127

**Figure 27 : Concentration en azote total en fonction du seuil de filtration frontale.** En ordonnée la concentration en azote total (N<sub>tot</sub>) des surnageants après filtration. Avant, le surnageant avant filtration. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . 128

**Figure 28 : Phénols totaux et concentrations en azote en fonction du nombre ou du temps de passage à la filtration frontale.** (a) phénols totaux dosé au Folin Ciocalteu sur les surnageants protéiques après filtration. En ordonnée la quantité de phénols totaux en mg équivalent d'acide gallique par g de protéine. (b) concentration en azote total (N<sub>tot</sub>) des surnageants après filtration. Avant, les surnageants avant filtration. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 129

**Figure 29 : Calorimétrie des différents isolats protéiques.** A, les isolats obtenus par atomisation et L, ceux obtenus par lyophilisation. 10 et 12, les isolats obtenus après hydratation des tourteaux à pH 10 ou 12. UF, les isolats obtenus après étape de diafiltration. (a) thermogrammes des isolats. (b) tableau des valeurs obtenues par DSC. Ton la température onset. Tof la température offset et Td la température de dénaturation.  $\Delta H$  l'enthalpie de dénaturation. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 130

**Figure 30 : Courbes de solubilité protéique en fonction du pH des différents isolats protéiques.** En ordonnée la solubilité de l'azote total (N<sub>tot</sub>) en g d'azote total récupéré dans le surnageant pour 100 g d'azote initial au cours de l'hydratation. 10 et 12, les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. UF, les isolats obtenus aux mêmes pH mais avec une étape de diafiltration additionnelle. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 132

**Figure 31 : Rendements protéiques aux différentes étapes d'extraction.** I10 et I12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. UF l'étape de diafiltration par ultrafiltration. .... 134

**Figure 32 : Calorimétrie des pools d'isolats protéiques.** (a) thermogrammes des différents isolats. (b) valeurs calorimétriques. I10 et I12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. Ton, Tof et Td, les températures de début, de fin et au maximum du pic de dénaturation, en °C, respectivement.  $\Delta H$  l'enthalpie de dénaturation en J/g. .... 143

**Figure 33 : Résultats de granulométrie laser, des protéines brutes et agrégées thermiquement, issues des différents pools d'isolats protéiques.** (a) distribution des tailles des particules. (b) diamètre moyen  $d_{[4;3]}$  ( $\mu\text{m}$ ) et span. 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement

issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de solubilisation des protéines. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ ..... 145

**Figure 34 : Hydrophobicité de surface ( $H_0$ ) des protéines brutes et agrégées thermiquement, provenant des différents pools d'isolats protéiques.** (a) hydrophobicité de surface des protéines en solution à pH 3 (S3). (b) hydrophobicité de surface des protéines en solution à pH 7,5 (S7,5). 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ ..... 146

**Figure 35 : Potentiel zêta (en mV), en valeur absolue, des protéines brutes et agrégées thermiquement, issues des différents pools d'isolats protéiques.** 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de solubilisation des protéines. (+) et (-), les signes du potentiel zêta. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ ..... 148

**Figure 36 : Solubilité réelle des différents pools d'isolats protéiques.** NTot l'azote total déterminé par Kjeldahl. 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de solubilisation des protéines. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ ..... 150

**Figure 37 : Distribution des tailles des gouttelettes lipidiques des différentes émulsions « témoins » à t0.** (a) et (b), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 10 (10). (c) et (d), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 12 (12). (a) et (c), distribution sans SDS. (b) et (d), distribution avec SDS. B et A, les émulsions formées de protéines brutes ou agrégées thermiquement. S3 et S7,5, les pH 3 et pH 7,5 de formation des émulsions. .... 158

**Figure 38 : Indice de stabilité au crémage (%), des émulsions « témoins ».** 10 et 12 les émulsions formées à partir d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B les émulsions formées à partir de protéines brutes issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de formation des émulsions. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ . .... 162

**Figure 39 : Distribution des tailles des gouttelettes lipidiques des différentes émulsions « modèles » à t0.** (a) et (b), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 10. (c) et (d), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 12. (a) et (c), distribution sans SDS. (b) et (d), distribution avec SDS. A10 et A12 les émulsions formées d'agrégats issus d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 40, 80 et 120 MPa, les pressions d'homogénéisation des émulsions par microfluidisation..... 164

**Figure 40 : Evolution de la rétrodiffusion des émulsions « modèles », après 24h à température ambiante.** (a), (b) et (c), les émulsions formés à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 10. (d), (e) et (f), les émulsions formés à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12. (a) et (d) les émulsions homogénéisées à 40 MPa, (b) et (e) à 80 MPa et (c) et (f), à 120 MPa. t0 et t24 les données prises juste après formation des émulsions ou après 24 h à température ambiante. .... 169

**Annexe 1 : Droite étalon à l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux au Folin Ciocalteu..... 202**

**Annexe 2 : Détermination du volume d'ANS et de la gamme de dilution protéique à utiliser pour mesurer l'hydrophobicité de surface ( $H_0$ ).** (a) droites et coefficients de régression linéaire, de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration protéique

(en % (m/m)), pour une quantité donnée d'ANS (en  $\mu\text{l}$ ). (b) intensité de fluorescence en fonction du volume d'ANS ( $\mu\text{l}$ ) pour une concentration protéique donnée (% m/m)..... 203

**Annexe 3 : Détermination de l'activité enzymatique de la trypsine contenue dans la pancréatine.** (a) droites de régression linéaire de la diminution d'absorbance due à la digestion de la TAME, en fonction du temps (en min), à différentes concentrations en pancréatine (en  $\mu\text{g/ml}$ ). (b) résultats d'activité enzymatique de la trypsine (en unité/mg de pancréatine), en fonction de la concentration en pancréatine (en  $\mu\text{g/ml}$ ). Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ ..... 204

**Annexe 4 : Profil électrophorétique des pools d'isolats protéiques de chanvre.** Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS), réductrices (R) ou non réductrices (NR) (avec ou sans DTT). Dans les puits : MT le marqueur de taille. 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 11S  $\alpha$  et 11S  $\beta$  les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'édestine 11S, et 11S  $\alpha\beta$  le monomère résultant de leur liaison. 7S la bande de globuline 7S et Alb les bandes d'albumines. Quantité d'azote total standardisée dans tous les puits. .... 205

**Annexe 5 : Distribution des tailles des gouttelettes lipidiques des différentes émulsions « témoins » après 24 h à 4 °C.** (a) et (b), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 10 (10). (c) et (d), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 12 (12). (a) et (c), distribution sans SDS. (b) et (d), distribution avec SDS. B et A, les émulsions formées de protéines brutes ou agrégées thermiquement. S3 et S7,5, les pH 3 et pH 7,5 de formation des émulsions..... 206

**Annexe 6 : Distribution des tailles des gouttelettes lipidiques des différentes émulsions « modèles » après 24 h à 4 °C.** (a) et (b), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 10. (c) et (d), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 12. (a) et (c), distribution sans SDS. (b) et (d), distribution avec SDS. A10 et A12 les émulsions formées d'agrégats issus d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 40, 80 et 120 MPa, les pressions d'homogénéisation des émulsions par microfluidisation. .... 207

# Introduction



## Introduction

Selon les prévisions de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), la population mondiale devrait atteindre 9,1 milliards d'habitants d'ici 2050, ce qui nécessitera une augmentation de 70% de la production alimentaire mondiale. En 2017, 11% de la population mondiale était sous-alimentée et, en 2016, 13% des adultes étaient en situation d'obésité (FAO, 2018). Nourrir la planète en luttant contre le réchauffement climatique, sont les enjeux majeurs auxquels il faudra faire face, d'autant plus que le réchauffement climatique entraîne chaque année une baisse des rendements agricoles (FAO, s. d.). Il est connu que la production d'aliments ovo-végétariens nécessitent moins d'énergie, de terre, d'eau et de ressources, que la production d'aliments carnés (Pimentel & Pimentel, 2003). La consommation humaine d'une plus grande quantité de protéines végétales, au détriment des protéines animales, est une solution pour répondre à ces problématiques. Entre 2010 et 2030, l'augmentation de la demande mondiale en protéines est estimée à 40%. Cette augmentation devrait être plus importante pour la demande en protéines végétales, avec 43% d'augmentation, contre 33% pour la demande en protéines animales (Ozanne, 2014).

Les céréales et les oléagineux sont les deux principales sources de protéines végétales, incluant le blé, le soja et le maïs qui sont les plus répandus. Il est estimé que seulement 35% des protéines totales produites par le secteur agricole, sont utilisées pour la consommation humaine. Le reste est utilisé pour l'alimentation du bétail, pour des applications non alimentaires, ou tout simplement traité comme un déchet. Les protéines de soja, le maïs et le blé sont déjà largement étudiées et utilisées. En revanche, les sources « conventionnelles » de protéines ne devraient plus être suffisantes pour répondre à la demande mondiale en protéines dans les années à venir. Il est alors fortement recommandé de trouver d'autres sources de protéines et de préférence produites localement (Sari, Mulder, Sanders, & Bruins, 2015).

Le chanvre est une plante herbacée annuelle très cultivée dans le monde entier, principalement pour les fibres contenues dans ses tiges (Ash, 1948). L'Asie est le plus grand producteur de chanvre et cultive près de 75% du chanvre mondial. En Asie, la production est principalement partagée entre la Chine, qui produit 50% du chanvre mondial, et la Corée du Nord. L'Europe est le second continent, le plus cultivateur de chanvre. En 2004, elle a produit 14% du chanvre mondial, mais elle a connu un regain d'intérêt pour la culture du chanvre depuis 2011. La superficie cultivée est passée de 8 000 hectares en 2011 à 33 000 hectares en 2016. La France

est le leader européen et produit près de la moitié de la production européenne, ce qui la place au 3<sup>ème</sup> rang mondial derrière la Corée du Nord (Amaducci et al., 2015; Bouloc, 2006; Carus, Karst, Kauffmann, Hobson, & Bertucelli, 2013).

Le chanvre est une plante intéressante du point de vue écologique et économique pour de nombreuses raisons. Il a une croissance forte et rapide, puisqu'il est récolté 4 mois après l'ensemencement, et produit également une quantité importante de biomasse (Ash, 1948). Il a la capacité d'éradiquer les mauvaises herbes sans support chimique et sa culture ne souffre d'aucun ravageur ni d'aucune maladie qui justifierait une pulvérisation. C'est d'ailleurs l'un des rares produits agricoles à être cultivé sans produits phytosanitaires dans des fermes non biologiques (Carus et al., 2013). Il est utilisé en culture de rotation et augmente le rendement de la culture suivante de 10 à 15%. Il a la capacité d'éliminer de grandes quantités de métaux lourds du sol et son système racinaire long, aide à prévenir l'érosion. Il a également de faibles besoins en eau et en intrants (Ranalli & Venturi, 2004).

Un hectare de chanvre produit environ 5 tonnes de paille et 1 tonne de graines. Toutes les parties du chanvre sont valorisables. Les fibres (~30% de la paille) sont principalement utilisées pour les pâtes et papiers, ainsi que pour l'isolation. Le noyau ligneux des tiges (~50% de la paille), est surtout utilisé comme litière pour chevaux ou comme paillis de jardin et de culture. Les poussières (15% de la paille) sont granulées pour l'incinération ou utilisées comme compost. Les fleurs et les feuilles peuvent également être utilisées dans les produits pharmaceutiques ou les compléments alimentaires. Les graines sont encore sous-valorisées, puisqu'elles sont principalement utilisées pour l'alimentation du bétail, en oisellerie, en pisciculture ou consommées telles quelles ou sous forme décortiquée (Carus et al., 2013).

Pourtant, les graines de chanvre sont riches en protéines et en lipides (~25% et ~30% respectivement) de hautes qualités nutritionnelles. Les lipides sont riches en acides gras polyinsaturés et ont un ratio  $\omega 6/\omega 3$  considéré comme optimal pour l'alimentation humaine. L'huile de chanvre a des applications diverses, en cosmétique, comme vernis à bois, comme détergent... et est de plus en plus utilisée en alimentation humaine (Anwar, Latif, & Ashraf, 2006). Cette huile est extraite par pressage mécanique ; il en résulte des tourteaux résiduels concentrés à ~35% de protéines. Ces protéines sont riches en acides aminés essentiels et semblent fortement digestibles après purification (Aluko, 2017; Callaway, 2004; Malomo & Aluko, 2015a; Tang, Ten, Wang, & Yang, 2006).

Il semble y avoir deux principaux biais à l'utilisation de ces protéines en alimentation humaine. Le premier est leur faible extractabilité sur une gamme de pH de 3 à 9 (Malomo & Aluko, 2015b). Le second est la faible solubilité des isolats protéiques obtenus par voie classique d'extraction, i.e. par précipitation au point isoélectrique des globulines (pH 5) (Yin et al., 2008). Il y a peu de données dans la littérature scientifique sur l'étude des conditions d'extraction des protéines de chanvre, incluant les conditions d'hydratation, de purification et de séchage.

L'objectif général de cette thèse est d'étudier les conditions d'extraction des protéines de chanvre à partir de tourteau brut et de comprendre leurs effets sur les propriétés physico-chimiques et émulsifiantes des protéines extraites. Cet objectif vise à valoriser un coproduit de l'huilerie et s'inscrit alors dans un concept de bioraffinerie. Plus spécifiquement, le premier objectif de cette étude, est de définir les conditions d'extraction des protéines de chanvre à partir de tourteau en étudiant les impacts de différentes conditions d'hydratation (pH, ratio tourteau/liquide, NaCl), d'une étape de purification par ultrafiltration et du mode de séchage (lyophilisation ou atomisation) sur la qualité et la quantité des protéines extraites. Le second objectif est d'étudier la fonctionnalité des isolats protéiques obtenus en se focalisant sur leur solubilité et sur leurs propriétés émulsifiantes. L'impact d'une dénaturation des protéines par un traitement thermique sur ces propriétés, est également étudié. Cette partie se termine par l'étude des propriétés émulsifiantes des protéines de chanvre, dans des conditions se rapprochant de celles rencontrées dans des laits de soja. Cela est fait dans la perspective d'évaluer l'application finale que pourraient avoir les protéines de chanvre.

Ce travail commence par une étude bibliographique des connaissances actuelles sur les protéines d'oléagineux et sur celles de chanvre (**Chapitre I**), puis par la description de la stratégie de l'étude (**Chapitre II**) et enfin par une présentation du matériel et des méthodes employés (**Chapitre III**). Il s'en suit la partie dédiée aux résultats et aux discussions. Cette dernière est organisée en 3 chapitres qui portent sur la mise en place du procédé d'extraction (**Chapitre IV**), sur la caractérisation des isolats protéiques obtenus (**Chapitre V**), incluant l'étude de leurs propriétés physico-chimiques et nutritionnelles, et enfin sur l'étude de leurs propriétés émulsifiantes (**Chapitre VI**). Ce travail se termine par une conclusion générale portant sur l'impact des conditions d'extraction sur les propriétés physicochimiques et émulsifiantes des protéines de chanvre, et par une discussion sur les perspectives de recherche possibles pour approfondir la compréhension des comportements observés.



# **Chapitre I : Etude bibliographique**



## I.1. Oléagineux

Dans cette partie, nous faisons état des connaissances sur les oléagineux, en dehors du chanvre. Ce dernier est détaillé dans une partie dédiée. Le soja est un cas particulier car c'est également une légumineuse. Il est souvent classé dans la catégorie des oléo-protéagineux. Il ne sera donc pas traité en détail ici. Les connaissances scientifiques sur les protéines de soja sont très riches. Pour cette raison, nous aurons recours à ces connaissances pour interpréter et discuter les résultats tout au long de ce manuscrit.

### I.1.1. Protéines

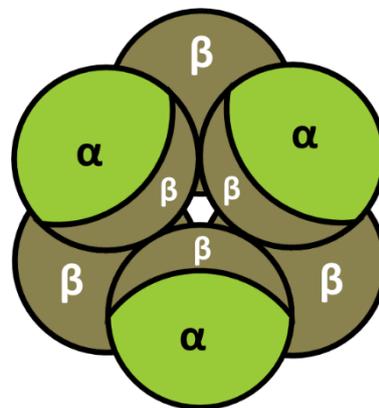
Les oléagineux sont des plantes dont les graines ou les fruits sont riches en matière grasse. Les teneurs en lipides des graines d'oléagineux varient fortement entre les espèces et se situent généralement entre 35 et 50% (Onsaard, 2012; Rabetafika, Remoortel, Danthine, Paquot, & Blecker, 2011; Rodrigues, Coelho, & Carvalho, 2012). Ces graines ont également une teneur en protéines non négligeable (20% à 40%), qui se retrouve concentrée dans les tourteaux obtenus après extraction de l'huile par pressage mécanique (30 à 50%) (González-Pérez, 2015; Namiki, 2007; Rabetafika et al., 2011; Schwenke, 1994).

Les protéines d'oléagineux sont majoritairement contenues dans les graines et plus particulièrement dans leur cotylédon. En général, la majorité de ces protéines sert de réserve d'azote, de soufre et de carbone à la plante. Ces protéines sont alors désignées comme étant des protéines de stockage (Aluko, 2017; González-Pérez, 2015; Rabetafika et al., 2011).

Osborne (1909) a établi une classification des protéines en fonction de leur solubilité, encore largement utilisée aujourd'hui. Il classe ainsi les protéines en 4 familles : les globulines solubles en solutions salines diluées, les albumines solubles dans l'eau, les prolamines solubles en mélanges alcool/eau et les glutélines partiellement solubles seulement en solution acide ou alcaline diluées. Les protéines d'oléagineux sont majoritairement constituées de globulines (~30% à 80%) et d'albumines (~20% à 40%) (Aluko, 2017; González-Pérez, 2015; Onsaard, 2012; Raab, Leman, Schwenke, & Kozłowska, 1992; Rabetafika et al., 2011). Ces protéines sont ensuite généralement classées selon leur coefficient de sédimentation de Svedberg (S). Les globulines d'oléagineux sont ainsi, majoritairement, des globulines 11S, et les albumines sont majoritairement, des albumines 2S. Ces protéines conservent des structures et des propriétés relativement proches entre les différentes espèces.

### I.1.1.1. Globulines 11S et albumines 2S

Les globulines 11S sont des homo-oligomères. Ce sont des hexamères d'environ 300 kDa, constitués donc de 6 monomères identiques d'environ 50 kDa. Les monomères sont liés entre eux par des interactions hydrophobes. Chaque monomère est lui-même constitué d'une sous unité acide  $\alpha$  hydrophile d'environ 30 kDa et d'une sous unité basique  $\beta$  hydrophobe d'environ 20 kDa. Ces 2 sous-unités sont liées entre elles par ponts disulfures. Les sous unités  $\beta$  hydrophobes sont orientées au cœur de la globuline alors que les sous unités  $\alpha$  hydrophiles sont orientées vers l'extérieur de la globuline. Cet arrangement confère à la globuline 11S une forme trigonale bipyramidale (**Figure 1**). La structure secondaire principale de ces protéines est en feuillets  $\beta$  (Marcone, Kakuda, & Yada, 1998; Patel, Cudney, & McPherson, 1994; Schwenke, 1994).



**Figure 1 : Représentation de la structure quaternaire d'une globuline 11S d'après Marcone et al. (1998).**  $\alpha$ , les sous unités acides hydrophiles et  $\beta$ , les sous unités basiques hydrophobes.

Les albumines 2S d'oléagineux ont des structures plus simples. Ce sont généralement des protéines de faible masse moléculaire (~15 kDa) généralement composées d'une grande sous unité (~10 kDa) et d'une petite sous unité (~5 kDa), liées par ponts disulfures. Ces protéines sont très riches en acides aminés soufrés et forment souvent des ponts disulfures intra-chaîne. Leur structure secondaire dominante est généralement en hélices  $\alpha$  (González-Pérez, 2015; Onsaard, 2012; Ponzoni, Brambilla, & Galasso, 2018).

### I.1.1.2. Protéines de colza

Les graines de colza sont composées à 21-24% de protéines et les tourteaux de presse sont concentrés à 33-39% de protéines. Les globulines constituent 26,5% à 65,3% de ces protéines et les albumines en constituent 13,4% à 46,1% (Dalgalarondo, Robin, & Azanza, 1986; Raab et al., 1992; Schwenke, 1994).

Les globulines 11S sont nommées cruciférines. Ces dernières ont une masse moléculaire d'environ 300 kDa et sont composées de monomères d'environ 50 kDa. Ces monomères sont constitués d'une sous unité  $\alpha$  de 30 kDa et d'une sous unité  $\beta$  de 20 kDa. La particularité de cette globuline 11S est que ses sous unités sont à la fois liées par ponts disulfures et par d'autres liaisons non covalentes. Le point isoélectrique de ces globulines est estimé à pH 7,2 et leur température de dénaturation dans l'eau à pH 7 à ~85 °C (Dalgalarondo et al., 1986; Ramlan et al., 2002; Schwenke, 1994).

Les albumines 2S sont nommées napines. Elles ont une masse moléculaire de 12-17 kDa et sont constituées d'une sous unité de 9 kDa liée à une sous unité de 4 kDa par 2 ponts disulfures. Elles ont également 2 ponts disulfures intra-chaîne. Le point isoélectrique de ces albumines est supérieur à pH 10. Elles possèdent 2 pics de dénaturation thermiques vers 84,3-88,3 °C de par le dépliement indépendant de ces 2 peptides (Krzyzaniak, Burova, Haertlé, & Barciszewski, 1998; Schwenke, 1994).

### **I.1.1.3. Protéines de sésame**

Le taux de protéines des graines de sésame est de 19% à 31%, et celui des tourteaux de presse est d'environ 50%. Les globulines représentent ~80% des protéines totales et les albumines en représentent ~20% (Namiki, 2007; Onsaard, 2012).

Les globulines 11S, nommées globulines  $\alpha$ , comptent pour 65% à 80% des globulines totales. Leur masse est comprise entre 250 et 450 kDa. Les sous unités  $\alpha$  ont une masse de 30,5-33,5 kDa et les sous unités  $\beta$  de 20-24,5 kDa. Leur point isoélectrique est à pH 4,9 et leur température de dénaturation dans l'eau à pH 7, d'environ 115 °C (Escamilla-Silva, Guzmán-Maldonado, Cano-Medinal, & González-Alatorre, 2003; Johnson, Suleiman, & Lusas, 1979; Onsaard, 2012)

Les albumines 2S de 13-15 kDa sont composées de 2 sous unités de 9 et 4 kDa liées par un seul pont disulfure (Onsaard, 2012).

### **I.1.1.4. Protéines de tournesol**

Les graines et tourteaux de tournesol contiennent respectivement ~20% et ~40% de protéines. Ces protéines sont constituées à 50-70% de globulines et à 17-34% d'albumines (González-Pérez, 2015).

Les globulines 11S s'appellent hélianthinines, ont une masse moléculaire de 300-350 kDa et sont constituées d'une sous unité  $\alpha$  et d'une sous unité  $\beta$  de 30-44 kDa et 20-27 kDa, respectivement, liées par un pont disulfure. Leur point isoélectrique est à pH 4-5 et leur température de dénaturation dans l'eau à pH 7 d'environ 100 °C (González-Pérez, 2015; Kabirullah & Wills, 1982; Salgado, Ortiz, Petruccelli, & Mauri, 2011).

Les albumines 2S de 10-18 kDa sont composées de 2 sous unités de 8-10 kDa et 3-4 kDa liées par 2 ponts disulfures (González-Pérez, 2015)

### **I.1.1.5. Protéines de lin**

La quantité de protéines dans les graines de lin est estimée à 10,5-36% et dans les tourteaux à 20-39%. Les globulines comptent pour 58-66% des protéines totales et les albumines pour 20-42% (Rabetafika et al., 2011).

Le nom des globulines 11S est linine. Leur masse est de 294-440 kDa. Les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  qui la constituent, ont respectivement des masses de 31 kDa et 20-23 kDa et sont liées par des ponts disulfures. Le point isoélectrique de ces globulines est compris entre pH 4,7 et pH 6 et leur température de dénaturation dans l'eau à pH 7 est d'environ 115 °C (Chung, Lei, & Li-Chan, 2005; Li-Chan & Ma, 2002; Rabetafika et al., 2011).

Les albumines 2S nommées conlinines, ont la particularité d'être constituées d'une seule chaîne polypeptidique de 15-19 kDa. Elles ont un point isoélectrique à pH 4,5 (Rabetafika et al., 2011; Truksa, MacKenzie, & Qiu, 2003).

### **I.1.1.6. Extraction des protéines d'oléagineux**

#### **I.1.1.6.1. Présentation générale**

L'extraction des protéines d'oléagineux, telles que celles de chanvre, de sésame, de colza, d'arachide, de lin ou de tournesol, fait face à deux principales contraintes. Ces contraintes sont la faible solubilité de ces protéines et la présence de nombreux composés antinutritionnels et qui altèrent la qualité des protéines. Les protocoles d'extraction, déjà bien connus des protéines de soja, ne peuvent souvent pas être appliqués tels quels pour l'extraction des protéines d'oléagineux.

Les facteurs antinutritionnels et indésirables des graines d'oléagineux sont variés. Les fibres, majoritairement contenues dans l'enveloppe des graines, diminuent la digestibilité et la

solubilité des protéines. Les inhibiteurs de protéases sont des protéines de faible poids moléculaire, solubles dans l'eau, qui se complexent avec les protéinases du tractus digestif humain et les désactivent. Les phénols peuvent s'oxyder et former des complexes avec les protéines et les minéraux. Ils altèrent ainsi les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles et sont responsables des couleurs foncées et des saveurs astringentes et amères des isolats de protéines d'oléagineux. L'acide phytique, présent majoritairement dans les cotylédons d'oléagineux, interagit également avec les minéraux et les protéines, diminuant leur biodisponibilité, la digestibilité des protéines et leur solubilité. Certains allergènes sont également présents dans les graines d'oléagineux. Les graines les plus touchées sont celles d'arachide. En revanche, des allergènes ont également été identifiés dans les graines de sésame et de colza. L'allergène est souvent une albumine 2S (Arntfield, 2011, 2018; Moure, Sineiro, Domínguez, & Parajó, 2006; Rodrigues et al., 2012; Sari et al., 2015; Tan, Mailer, Blanchard, & Agboola, 2011; Thiyam-Holländer, Eskin, & Matthäus, 2012).

L'extraction des protéines d'oléagineux débute par les traitements applicables aux graines. Un trempage des graines, une torréfaction, la fermentation ou la germination de celles-ci, peuvent diminuer leur quantité de facteurs antinutritionnels. En revanche, les 3 derniers traitements altèrent les propriétés des protéines. Comme énoncé précédemment, de nombreux facteurs antinutritionnels sont présents dans l'enveloppe des graines. Un décorticage préalable des graines permet d'en éliminer une partie. Ainsi le décorticage améliore la solubilité et la digestibilité des protéines. Le décorticage est assez aisé sur les graines de taille importante comme le tournesol, mais est difficilement applicable aux plus petites graines, comme le sésame ou le colza (Arntfield, 2011, 2018; Moure et al., 2006; Rodrigues et al., 2012; Sari et al., 2015; Tan et al., 2011; Thiyam-Holländer et al., 2012).

Les graines sont ensuite pressées mécaniquement. Lors d'un pressage à haute température, les inhibiteurs de protéases sont désactivés et le rendement d'extraction d'huile est amélioré, mais les protéines sont dénaturées. Il est possible d'effectuer un pressage à froid mais le tourteau de presse comporte toujours une certaine quantité de lipides. Le tourteau peut être à nouveau délipidé au solvant. Le plus répandu est l'hexane mais ce dernier est ensuite évaporé à hautes températures, entraînant la dénaturation des protéines. D'autres solvants de substitution peuvent être employés comme l'isopropanol ou un mélange de méthanol ou d'ammoniac. La délipidation au CO<sub>2</sub> supercritique est également possible. Ce composé est intéressant car il permet de travailler à faible température ; il a une faible toxicité et un faible impact

environnemental. La délipidation permet d'éliminer certains composés antinutritionnels, incluant des phénols et des glucosinolates. Une étape de trempage des tourteaux au point isoélectrique des protéines, peut permettre de solubiliser et d'éliminer une partie du matériel lignocellulosique et une partie des glucides (Arntfield, 2011, 2018; Moure et al., 2006; Rodrigues et al., 2012; Sari et al., 2015; Tan et al., 2011; Thiyam-Holländer et al., 2012).

Le tourteau est ensuite hydraté. Le temps, la température, le pH, la force ionique ou encore le ratio tourteau/liquide, sont des paramètres qui influent sur l'extractabilité des protéines. Plus le pH d'hydratation est alcalin, plus l'extractabilité des protéines est élevée car un pH très alcalin, entraîne simultanément une augmentation de la solubilité des protéines et la déstabilisation des parois cellulaires. En revanche, un pH très alcalin, surtout à partir de pH 12, favorise l'oxydation des phénols et leur complexation aux protéines. Il entraîne également la racémisation et la formation de lysinoalanine, un composé toxique pour les reins. Les propriétés fonctionnelles, organoleptiques et nutritionnelles des isolats obtenus ainsi se trouvent altérées. Pour pallier à cela, l'extraction à pH moins basique est parfois réalisée en présence de NaCl, mais les protéines d'oléagineux restent moins extractibles en solutions salines qu'à pH alcalin. Avant le pressage des graines ou pendant l'hydratation du tourteau, des enzymes d'hydrolyse des glucides ou des protéines peuvent être employées pour améliorer l'extraction des protéines et des lipides. Les hydrolyses des protéines améliorent leur solubilité mais altèrent leur structure et leurs propriétés fonctionnelles. Lors des hydratations à pH alcalins, l'ajout d'enzymes d'hydrolyse des glucides ne semble pas améliorer l'extractabilité des protéines (Arntfield, 2011, 2018; Moure et al., 2006; Rodrigues et al., 2012; Sari et al., 2015; Tan et al., 2011; Thiyam-Holländer et al., 2012).

S'en suivent des étapes de purification. La plus répandue consiste à faire précipiter les protéines à leur point isoélectrique, généralement compris entre pH 4 et 6. Le surnageant contenant des impuretés est éliminé et le culot de protéines lavé et re-suspendu. Une étape d'ultrafiltration et diafiltration permet d'éliminer les molécules de faibles poids moléculaires, incluant des phénols, des glucosinolates et l'acide phytique. Une méthode alternative connue sous le terme de micellisation, consiste à solubiliser les protéines de tourteau en solution saline, puis à diminuer la salinité par dialyse ou dilution pour faire précipiter ces protéines. Les protéines sont ensuite séchées par lyophilisation ou par atomisation. L'atomisation peut cependant être dénaturante pour les protéines (Arntfield, 2011, 2018; Moure et al., 2006; Rodrigues et al., 2012; Sari et al., 2015; Tan et al., 2011; Thiyam-Holländer et al., 2012)

### **I.1.1.6.2. Optimisation de l'extraction**

Différents auteurs ont travaillé sur l'impact des conditions d'extraction des tourteaux ou des graines entières d'oléagineux, sur les rendements d'extraction et sur la qualité des protéines extraites. Les conditions d'hydratation étudiées sont généralement le pH, le ratio tourteau/eau, la concentration en NaCl, le temps et la température. Après les conditions d'hydratation, les effets d'une étape de filtration ou du mode de séchage sont parfois étudiés.

#### **I.1.1.6.2.1. Optimisation de l'extraction des protéines de colza**

Le facteur influençant le plus les rendements d'extraction des protéines de colza, est le pH d'hydratation. Les rendements à pH faiblement alcalins (pH 8-10) sont faibles, de l'ordre de 20-35%. Le gain d'extractabilité avec l'augmentation du pH est fort de pH 10 à 12. Les rendements passent ainsi à 45-55% à pH 12 (Akbari & Wu, 2015; Gerzhova, Mondor, Benali, & Aider, 2016).

A pH 10 et 11, les rendements d'extraction augmentent avec l'augmentation du ratio tourteau/eau. Les rendements passent ainsi de 20-30% à 5% de tourteau, à 30-40% à 15% de tourteau. A pH 12 en revanche, la concentration en tourteau n'a pas d'impact significatif sur l'extractabilité des protéines (Gerzhova et al., 2016).

Les effets de la concentration en NaCl sont très variables en fonction de la concentration en tourteau et du pH étudié. A pH 10 et 12, l'ajout de NaCl (0 à 1 M) tend à augmenter l'extractabilité. Cette dernière peut passer de moins de 25% sans NaCl, à plus de 40% avec 1 M de NaCl. En augmentant le ratio tourteau/eau, une limite maximale de NaCl à ajouter apparaît. En effet à 15% de tourteau, au-delà de 0,6 M de NaCl, le rendement d'extraction commence à diminuer. A pH 10 et 12, les conditions de rendement optimal sont à 5% de tourteau et 1 M de NaCl. A pH 11, les effets sont très variables en fonction des concentrations en tourteau et en NaCl. La plage de plus forte extractabilité à pH 11, se situe entre 10 et 15% de tourteau avec 0,3 à 0,7 M de NaCl. Les gains en rendement d'extraction par le NaCl, sont plus élevés à pH 10 qu'à pH 12 (Gerzhova et al., 2016).

L'ajout de NaCl augmente la solubilisation des napines 2S et l'hydratation à pH 12 entraîne une dénaturation des protéines visible en électrophorèse par des bandes caractéristiques moins intenses de cruciférines 11S et de napines 2S (Gerzhova et al., 2016). Une diafiltration augmente la pureté des poudres protéiques d'autant plus que le nombre de facteurs de concentration volumique et de volume de diafiltration est élevé. Des isolats à 68,5% de

protéines ont été rapportés après un facteur de concentration de 10 et 10 volumes de diafiltration et de 81,9% de protéines après un facteur de concentration de 20 et 10 diavolumes (Akbari & Wu, 2015).

Une hydratation avec un ratio massique tourteau/eau de 5%, à pH 10 avec 1 M de NaCl, ainsi qu'une étape de diafiltration pour éliminer ces sels, semblent être les paramètres optimaux pour l'extraction des protéines de colza.

#### **I.1.1.6.2.2. Optimisation de l'extraction des protéines de sésame**

La méthode classique d'extraction des protéines de sésame consiste en une solubilisation alcaline à pH 9 des tourteaux, suivie d'une précipitation au point isoélectrique à pH 4,9, d'une neutralisation à pH 7 et d'un séchage par lyophilisation ou atomisation. Escamilla-Silva et al. (2003) ont tenté de simplifier la méthode en supprimant l'étape de précipitation isoélectrique. Ces auteurs ont constaté que les isolats obtenus par la méthode simplifiée, ont des rendements d'extraction, des puretés protéiques et des caractéristiques en DSC, similaires à ceux obtenus par extraction classique. L'atomisation est légèrement dénaturante contrairement à la lyophilisation. Ceci est observable par une baisse d'enthalpie de dénaturation en DSC.

Une autre étude a porté sur les conditions d'hydratation du tourteau ou des graines entières. En diminuant le pH de 4 à 2, l'extractibilité des protéines augmente de 5 à 20-55%. De pH 4 à 6, elle est minimale avec environ 5% d'extractibilité. Au-delà de pH 6, l'augmentation du pH augmente drastiquement, le rendement d'extraction passant de 5% à pH 6 à 55-85% à pH 11 (Rivas, Dench, & Caygill, 1981).

L'ajout de NaCl de 0 à 1 M augmente surtout l'extractibilité entre pH 5 et 8. Le maximum de rendement est atteint à pH 5,5 et 1 M de NaCl (~80%). Sans NaCl à ce même pH, le rendement d'extraction se situe vers 25% (Rivas et al., 1981).

L'extractibilité des protéines augmente avec l'augmentation du ratio farine/eau de 1/100 à 1/40-1/20 puis diminue jusqu'au ratio 1/10. Le temps d'hydratation a peu d'impact sur les rendements d'extraction. Ils sont maximum à 15 min d'hydratation et tendent à diminuer au-delà jusqu'à 120 min (Rivas et al., 1981).

Deux conditions d'hydratation semblent alors probantes en prenant en compte les effets néfastes d'un pH très alcalin sur les protéines. Une hydratation peut être réalisée à pH 5,5-6 avec 1 M de NaCl, avec un ratio farine/eau de 1/30 pendant 15 min. L'autre condition serait

une hydratation à pH 10, sans NaCl pendant 15 min, avec un ratio farine/eau de 1/20. Ces suspensions pourraient être ensuite séchées par lyophilisation.

### **I.1.1.6.2.3. Optimisation de l'extraction des protéines de tournesol**

Le pH d'hydratation des tourteaux de tournesol a également un fort impact sur les rendements d'extraction. Une augmentation du pH de 2 à 11 fait passer les rendements d'extraction de 15-20% à 45-90% (Ivanova, Chalova, Koleva, & Pishtiyski, 2012; Pickardt et al., 2009).

L'ajout de NaCl de 0 à 3,4 M a un effet sur l'extractabilité des protéines, dépendant du pH. De pH 2 à 3,8, l'ajout de NaCl diminue légèrement l'extractabilité (~30 à 15%). A pH 4, il augmente linéairement l'extractabilité (~15 à 40%). De pH 5 à 9-10, il augmente grandement l'extractabilité jusqu'à 1,7 M (~15-30 à 50-75%) qui tend à se stabiliser jusqu'à 3,4 M de NaCl. Au-delà de pH 9-10 jusqu'à pH 11, l'ajout de NaCl a peu d'impact sur l'extractabilité des protéines (Ivanova et al., 2012; Pickardt et al., 2009).

A pH 5-6, le rendement d'extraction diminue (~52% à 42%) avec l'augmentation du ratio tourteau/eau de 2,5% à 20%. L'augmentation de température de 20 à 40 °C augmente le rendement d'extraction d'environ 44 à 52%. Le temps d'hydratation a peu d'impact sur l'extractabilité mais elle tend à augmenter de 15 à 60 min, puis à diminuer au-delà jusqu'à 90 min (Ivanova et al., 2012).

Une hydratation de 60 min à 40 °C, avec un faible ratio tourteau/eau de 2,5-10%, semble être optimale. Si le choix d'un pH 6-7,5 est fait, une force ionique élevée correspondant à 1,3-1,7 M de NaCl est nécessaire. Le choix d'une extraction à pH 9-10 sans NaCl semble un choix également intéressant.

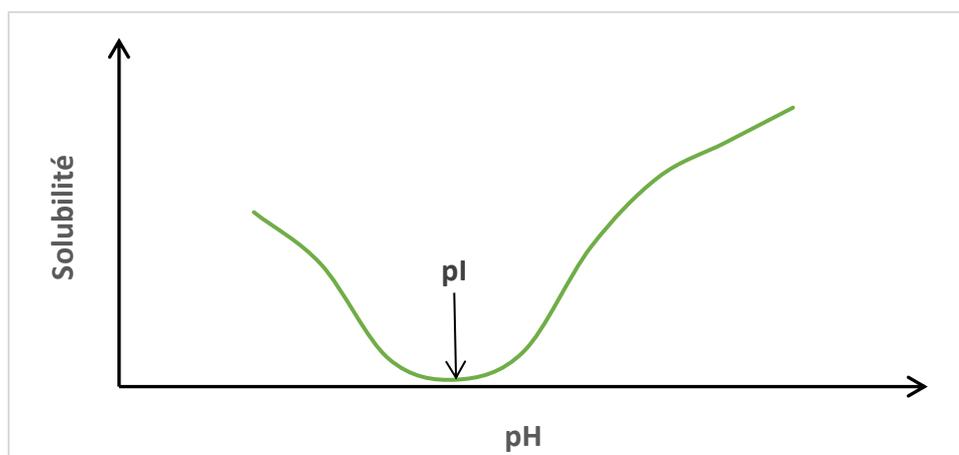
### **I.1.1.7. Solubilité**

La solubilité d'une protéine est sa portion d'azote qui est à l'état soluble dans des conditions spécifiques. Plus précisément, la solubilité d'une protéine est définie comme étant sa capacité à se dissoudre dans une solution. Elle est généralement le premier paramètre physicochimique qui est déterminé pour définir le potentiel d'utilisation d'une protéine. En effet, la solubilité des protéines est le facteur qui va avoir le plus d'impact sur leurs propriétés fonctionnelles : émulsifiantes, moussantes et gélifiantes.

La solubilité d'une protéine dépend de ses caractéristiques intrinsèques : masse moléculaire, composition et séquence d'acides aminés, conformation, teneur et répartition des groupes hydrophiles et hydrophobes... Elle dépend également des caractéristiques extrinsèques, à savoir les caractéristiques de son environnement : pH, force ionique, température, type de solvant, conditions opératoires... (Damodaran, 1997; Zayas, 1997)

### I.1.1.7.1. Effet du pH sur la solubilité

Le pH est le facteur le plus déterminant de la solubilité des protéines. La solubilité des protéines est en effet majoritairement gouvernée par la balance entre forces de répulsions électrostatiques et attraction entre les groupements hydrophobes. Au point isoélectrique des protéines, la charge nette globale des protéines est nulle. Les forces de répulsions électrostatiques sont, par conséquent, presque inexistantes. La conséquence sur les globulines est que ces dernières vont s'associer les unes aux autres, majoritairement par interactions hydrophobes, s'agréger et précipiter. La solubilité des globulines est alors minimale au point isoélectrique. A pH inférieur au point isoélectrique, les protéines sont majoritairement chargées positivement et inversement, à pH supérieur au point isoélectrique elles ont une charge nette globale négative. Ceci est d'autant plus vrai, que le pH est éloigné du point isoélectrique. Les forces de répulsions électrostatiques sont alors plus fortes que les forces d'attraction hydrophobes, ce qui est favorable à la solubilité. La solubilité et les rendements d'extraction sont généralement meilleurs à pH très alcalin qu'à pH acide. Effectivement, un pH très alcalin peut entraîner la dissociation et la désagrégation des protéines. Le profil de la courbe de solubilité des globulines en fonction du pH, présente généralement une forme en U, comme présenté **Figure 2** (Karki et al., 2009; Yin, Tang, Wen, & Yang, 2009; Zayas, 1997).



**Figure 2 :** Profil de solubilité, classique en « U », des globulines en fonction du pH. pI le point isoélectrique.

### I.1.1.7.2. Effet de la force ionique sur la solubilité

En théorie, à faible concentration en sel, l'ajout de sel augmente la solubilité des protéines en augmentant les forces de répulsions électrostatiques : c'est le « salting-in ». Au-delà d'une concentration seuil, l'ajout de sel diminue la solubilité des protéines : c'est le « salting-out » (Figure 3) (Koolman & Roehm, 2011).

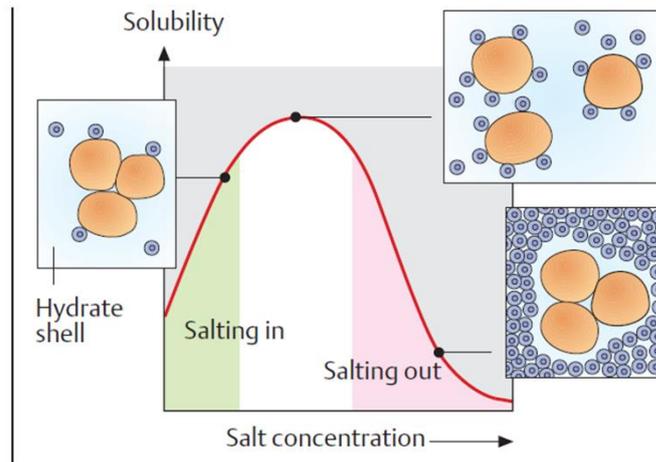


Figure 3 : Solubilité des protéines en fonction de la force ionique : « salting-in » et « salting-out ». Source : Koolman et Roehm (2011).

En conditions de « salting-in », les contre ions masquent les charges des protéines. Cela réduit les interactions électrostatiques intramoléculaires et augmente les forces de répulsions électrostatiques. Les enveloppes d'hydratation des groupes chargés des protéines ne sont pas affectées, et la capacité d'hydratation globale des protéines est augmentée grâce aux enveloppes d'hydratation des ions liés. L'ensemble de ces phénomènes entraîne une augmentation de solubilité des protéines. Dans les conditions de « salting-out », les ions et les protéines entrent en compétition pour interagir avec les molécules d'eau, entraînant une réduction de l'hydratation des protéines et donc de leur solubilité (Damodaran, 1997).

En réalité, à faible force ionique (<0,5 M), les deux phénomènes peuvent se produire. Si une protéine expose de nombreux groupes hydrophobes à la surface, le phénomène de « salting-out » opère, alors que si une protéine expose de nombreux groupes hydrophiles à la surface, c'est le phénomène de « salting-in » qui se produit (Damodaran, 1997). Le pH peut également modifier les effets de la force ionique sur la solubilité des protéines. Effectivement, de nombreux articles ont rapporté des effets variables de l'ajout de sel sur la solubilité des protéines en fonction du pH. De plus, l'impact du pH ne semble pas identique en fonction des sources protéiques (Achouri, Nail, & Boye, 2012; Hermansson, 1979; Ivanova et al., 2012; Kinsella, 1979; Paulson & Tung, 1987).

### **I.1.1.7.3. Effet des conditions opératoires sur la solubilité**

Les conditions opératoires d'extraction des protéines et de production d'isolats protéiques, peuvent impacter la solubilité des protéines. Le pH d'extraction, la réalisation d'une précipitation des protéines, les traitements thermiques, les traitements mécaniques... sont autant de paramètres qui peuvent insolubiliser tout ou partie des protéines. La mise en place du procédé d'extraction repose souvent sur une étude de la solubilité des protéines ou de leur extractabilité, combinée à d'autres analyses. L'extractabilité est la portion d'azote solubilisé dans la phase aqueuse après hydratation de la matière première (graines, farines, tourteaux...). Ainsi, l'étude de l'extractabilité des protéines en fonction des conditions d'hydratations, tels que la température, le temps, le ratio matière première/liquide ou la force ionique, peuvent aider à la détermination des paramètres d'extraction. Après séchage et obtention d'un isolat protéique, l'étude de la courbe de solubilité des protéines en fonction du pH est un bon indicateur de leur qualité et de leurs potentiels d'utilisation (Betschart, 1975; Nioi, Kapel, Rondags, & Marc, 2012; Rosenthal, Pyle, Niranjana, Gilmour, & Trinca, 2001; Zayas, 1997).

### **I.1.1.7.4. Solubilité des protéines de colza**

La solubilité des cruciférines 11S de colza est minimale à pH 5 (~5%). Elle augmente légèrement en s'éloignant vers les pH acides (~15% à pH 3,5) et fortement en s'éloignant vers les pH basiques (~85% à pH 11) (Paulson & Tung, 1987).

De pH 3,5 à 7,5, l'ajout de NaCl 350 mM ou 700 mM entraîne un effet de « salting-in » sur les cruciférines 11S, tandis que de pH 7,5 à 11, il entraîne un effet de « salting-out ». Ces effets sont indépendants de la concentration en NaCl. Le gain maximal de solubilité par le NaCl est observé à pH 5 et 6,5. A pH 5 et 6,5 respectivement, elle passe d'environ 5% ou 10% sans NaCl à environ 25% ou 30% avec NaCl. La plus grande diminution de solubilité, passant de ~85% sans NaCl à ~45% avec NaCl, est observée à pH 11. Dans cette étude, les auteurs ont émis l'hypothèse que puisque les anions inorganiques ( $\text{Cl}^-$ ) ont un diamètre d'hydratation plus faible que les cations inorganiques ( $\text{Na}^+$ ), ils sont plus aptes à se rapprocher des protéines et à écranter leurs charges (Paulson & Tung, 1987).

Cheung, Wanasundara, & Nickerson (2014), constatent également un effet de « salting-in » sur les cruciférines 11S de pH 5 à 7, engendré par l'ajout de 50 mM ou 100 mM de NaCl. Ainsi à pH 5 et 7, la solubilité passe de 11-16% avec 0 mM, à 77-90% avec 50-100 mM de NaCl. En revanche à pH 3, ces auteurs observent une solubilité très élevée des cruciférines 11S sans NaCl

(~90%). A ce pH, l'ajout de NaCl n'a pas d'effet significatif sur la solubilité. Ceci s'explique par le fait qu'à pH 5 et 7 proches du point isoélectrique (~pH 7,2), les répulsions électrostatiques entre les protéines sont faibles sans NaCl. Les ions apportés par le NaCl contribuent à la formation de la couche d'hydratation des protéines, favorisant leur interaction avec les molécules d'eau (Cheung et al., 2014).

La succinylation des cruciférines 11S change complètement l'allure de la courbe de solubilité. La solubilité devient minimale à pH 3,5 (~10%) et maximale de pH 6,5 à 11 (~90-100%). L'ajout de NaCl 350 mM ou 700 mM n'a pas d'impact significatif sur la solubilité des cruciférines 11S succinylées. La succinylation entraîne le remplacement du groupe ammonium ( $\text{NH}_3^+$ ) de la lysine par un groupe succinyl ( $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$ ). Le remplacement des forces attractives (ammonium – carboxyle ( $\text{NH}_3^+ - \text{COO}^-$ )) par des forces répulsives (carboxyle du succinate – carboxyle natif ( $\text{COO}^- - \text{COO}^-$ )) intra et intermoléculaires, favorise le dépliement des protéines, la dissociation des sous unités, diminue les interactions protéines-protéines et favorise les interactions protéines-eau. La succinylation entraîne également un abaissement du point isoélectrique (Paulson & Tung, 1987).

#### **I.1.1.7.5. Solubilité des protéines de tournesol**

Les hélianthinines 11S de tournesol ont une solubilité moyenne à pH acides (~50% à pH 2), minimale au point isoélectrique (~5% à pH 4-5) et maximale à pH basiques (~90% à pH 9-12). La succinylation de ces protéines engendre des profils de solubilité similaires mais sont décalés de 1-2 point de pH vers les pH acides. Ainsi, le point isoélectrique passe à pH 3-4 et le maximum de solubilité est atteint dès pH 7-8. Ce traitement augmente donc de façon significative la solubilité des protéines dans la gamme de pH alimentaire pH 5-7 (Kabirullah & Wills, 1982).

La réalisation d'hydrolysats protéiques, à partir d'isolat d'hélianthinines 11S par digestion avec des protéases (Flavourzyme 1000 MG (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danemark) et/ou Alcalase), entraîne une augmentation de leur solubilité de pH 2,5 à pH 7, d'autant plus importante que le degré d'hydrolyse est élevé. Ainsi à 30-50% d'hydrolyse, la solubilité des hydrolysats est de 75-90% et elle est relativement constante quel que soit le pH (2,5 à 7). Cette augmentation de solubilité est attribuée à la formation de peptides de petite taille. Leur masse moléculaire est plus faible, ce qui limite leur sédimentation, et leur surface en contact avec l'eau est plus importante, ce qui améliore leur capacité d'hydratation (Villanueva et al., 1999).

### **I.1.1.7.6. Solubilité des protéines de sésame**

Les globulines 11S de sésame ont un profil de solubilité en fonction du pH symétrique. Le minimum de solubilité est au point isoélectrique (<5% à pH 4-5). La solubilité augmente progressivement vers les pH acides et les pH alcalins (~45% à pH 1 et 10). Les effets du NaCl (0,2 M à 1 M) sur la solubilité des globulines 11S de sésame sont indépendants des concentrations appliquées. Aux pH acides (pH 1-6), l'ajout de NaCl a un effet de « salting-in ». Aux pH très acides (pH 1-2) l'effet est le plus prononcé avec une solubilité qui passe de 30-45% sans NaCl à 60-70% avec NaCl. Aux pH alcalins (pH 7-10), l'ajout de NaCl entraîne un effet de « salting-out ». Il est le plus marqué à pH 10 avec une solubilité qui passe de ~45% sans NaCl à 5-10% avec NaCl. Les auteurs de ce travail ont estimé qu'aux pH alcalins, l'adsorption des ions apportés par le NaCl sur les protéines, réduisait les forces de répulsions électrostatiques entre les protéines. Les interactions hydrophobes entre protéines seraient ainsi favorisées, menant à leur agrégation et à une perte de solubilité (Achouri et al., 2012).

### **I.1.1.7.7. Solubilité des protéines de soja**

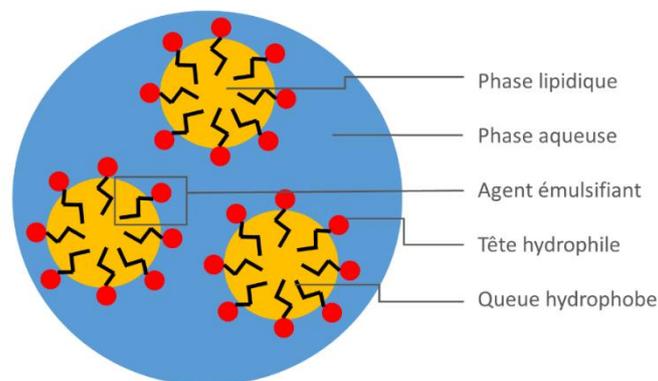
Un traitement thermique de 75 °C à 95 °C pendant 30 min à pH 7 sur des suspensions à 5% de glycinines 11S de soja, entraîne une diminution de leur solubilité à pH 7, proportionnelle à l'augmentation de température. Ainsi la solubilité des glycinines 11S de soja passe de ~65% sans traitement thermique à ~45% après traitement thermique à 95 °C. Ceci est dû à une dénaturation des protéines entraînant l'exposition de leurs groupements hydrophobes et la formation d'agrégats insolubles par liaisons hydrophobes (Shen & Tang, 2012). L'application d'un procédé de hautes pressions dynamiques (microfluidisation) jusqu'à 400 MPa, aux glycinines 11S, tend à augmenter leur solubilité à pH 6-7. Le maximum de solubilité est atteint à des pressions de 120-200 MPa. Ainsi, il passe de ~55-65% à 0 MPa à 80-85% à 120-200 MPa. Les auteurs estiment que la pression entraîne un dépliement des protéines, augmentant les interactions protéines-eau, ou bien qu'elle permet de rompre les liaisons hydrophobes entraînant la dissociation de certains agrégats (Molina, Papadopoulou, & Ledward, 2001; Shen & Tang, 2012).

## **I.1.1.8. Emulsions**

### **I.1.1.8.1. Définition**

Une émulsion consiste en un mélange de 2 phases, naturellement immiscibles : une phase aqueuse et une phase lipidique. Il existe des émulsions huile dans l'eau, les plus communes, et

des émulsions eau dans l'huile. Les interfaces huile/eau sont riches en énergie, ce qui signifie que les émulsions se déstabilisent dès qu'elles sont créées, à moins d'ajouter un agent émulsifiant capable de réduire la tension interfaciale huile/eau. Un agent émulsifiant doit être tensioactif, c'est-à-dire qu'il doit avoir une nature amphiphile. Un composé est amphiphile lorsqu'il possède à la fois une affinité pour l'eau (hydrophilie) et pour les composés non polaires, tels que les lipides (hydrophobie ou lipophilie). L'agent émulsifiant s'adsorbe ainsi aux interfaces huile/eau, en orientant ses groupements hydrophobes vers la phase lipidique et ses groupements hydrophiles vers la phase aqueuse. La création de ce film interfacial entraîne la diminution de la tension interfaciale et permet de maintenir les gouttelettes lipidiques en suspension dans la phase aqueuse (**Figure 4**).



**Figure 4 : Schéma d'une émulsion.**

Une émulsion est alors formée par le mélange d'une phase lipidique et d'une phase aqueuse, homogénéisées par un traitement mécanique qui engendre des forces de cisaillement. Ces dernières créent les gouttelettes lipidiques, à l'interface desquelles des agents émulsifiants amphiphiles telles que certaines protéines, vont migrer et s'adsorber. Les gouttelettes lipidiques des émulsions ont généralement des tailles comprises entre 0,1 et 100  $\mu\text{m}$  (Damodaran, 1997; McClements, 1998; Tadros, 2013; Wouters, Rombouts, Fierens, Brijs, & Delcour, 2016).

### **I.1.1.8.2. Formation des films protéiques interfaciaux**

La création du film interfacial par les protéines se fait en 3 principales étapes qui sont la diffusion, l'adsorption et les réarrangements structuraux.

La diffusion correspond au passage des protéines de la phase aqueuse aux interfaces huile/eau. Elle est alors grandement dépendante de la mobilité des protéines. Ainsi elle est favorisée par

des faibles tailles et une forte solubilité des protéines, ainsi que par une faible viscosité de la phase aqueuse (Dickinson, 1996; McClements, 1998).

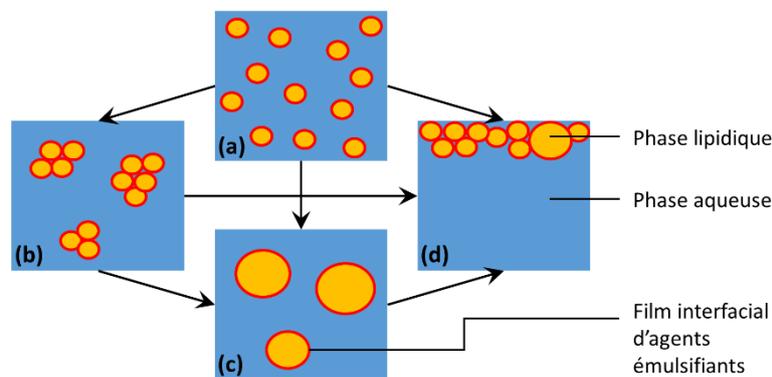
L'adsorption correspond aux interactions entre les gouttelettes lipidiques et les groupements hydrophobes des protéines. Elle est donc facilitée par une hydrophobicité de surface des protéines élevée. La concentration protéique aux interfaces huile/eau est favorisée par un ratio protéine/phase lipidique important. Diverses forces de répulsions entre les protéines aux interfaces et les protéines de la phase aqueuse peuvent limiter l'adsorption de ces dernières. C'est le cas des forces de répulsions électrostatiques, stériques ou encore d'hydratation. La répartition des groupements hydrophobes sur la protéine a également un impact sur ses capacités d'adsorption (Dickinson, 1996; McClements, 1998).

Les protéines aux interfaces vont spontanément optimiser le nombre d'interactions entre leurs groupements hydrophobes et la phase lipidique et le nombre d'interactions entre leurs groupements hydrophiles et la phase aqueuse, entraînant des réarrangements structuraux de ces protéines. Les globulines ont naturellement une structure tridimensionnelle compacte, leurs groupements hydrophobes sont majoritairement contenus dans leur cœur alors que leurs groupements hydrophiles sont principalement localisés à leur périphérie. Aux interfaces huile/eau, les globulines vont réduire leur énergie libre en altérant leur conformation pour maximiser les interactions hydrophobes et hydrophiles. L'aptitude des protéines à modifier leur structure correspond à la flexibilité des protéines. Les protéines qui ont une structure secondaire en « pelote » aléatoire sont très flexibles et peuvent se déployer rapidement aux interfaces. Les protéines avec des structures secondaires plus ordonnées, telles que les globulines, sont moins flexibles, donc plus rigides et mettent plus de temps à modifier leurs structures au contact de l'interface huile/eau. La présence de liaisons fortes tels que des ponts disulfures au sein d'une protéine, réduit également sa flexibilité (Damodaran, 1997; Graham & Phillips, 1979; McClements, 1998).

### **I.1.1.8.3. Mécanismes de déstabilisation**

Après formation des émulsions, ces dernières peuvent évoluer. Il existe différents types de déstabilisation des émulsions, dont les principaux sont la floculation, la coalescence et le crémage (**Figure 5**).

La fréquence d'apparition de la floculation et de la coalescence augmente avec la fréquence de collision des gouttelettes lipidiques. Il existe 3 principaux types de collision : celles dues aux mouvements Browniens, celles dues à la gravité et celles dues à l'application de forces de cisaillement. La fréquence d'apparition de ces collisions peut être réduite en homogénéisant la taille des gouttelettes lipidiques, en réduisant leur nombre, le ratio phase lipidique/phase aqueuse, la différence de densité entre ces 2 phases, la température et la fréquence de cisaillement et en augmentant la taille des gouttelettes lipidiques et la viscosité de la phase aqueuse. Homogénéiser la taille des gouttelettes lipidiques réduit la fréquence de collision en limitant le phénomène de mûrissement d'Ostwald. Ce phénomène intervient en présence de gouttelettes lipidiques de tailles hétérogènes. Au cours du temps, les gouttelettes lipidiques de plus grandes tailles vont avoir tendance à grossir au détriment des plus petites (McClements, 1998).



**Figure 5 : Mécanismes de déstabilisation des émulsions.** (a) émulsion initiale, stable. (b) floculation. (c) coalescence. (d) crémage.

La floculation intervient lorsqu'il y a collision des gouttelettes lipidiques et interactions entre les protéines de plusieurs films interfaciaux, sans rupture de ces derniers. Ce phénomène est alors réversible (**Figure 5b**). Les collisions entre gouttelettes lipidiques mènent ensuite à de la floculation, lorsque les forces d'attractions entre les films protéiques interfaciaux de plusieurs gouttelettes sont plus importantes que les forces de répulsions. Les interactions d'attraction peuvent être des interactions de Van der Waals ou hydrophobes alors que les forces de répulsions peuvent être électrostatiques, stériques ou d'hydratation. Une floculation importante peut entraîner une augmentation de la viscosité de l'émulsion et mener à la formation d'un gel (Damodaran, 1997; McClements, 1998; Tadros, 2013).

La coalescence quant à elle, intervient lorsqu'il y a collision des gouttelettes lipidiques et rupture des films interfaciaux. Ceci mène à la fusion irréversible de plusieurs gouttelettes

**(Figure 5c)**. Elle est favorisée par la floculation et le crémage de par le rapprochement des gouttelettes lipidiques et par des films interfaciaux fins, fragiles et peu viscoélastiques. Si la concentration en protéine est insuffisante pour couvrir toutes les interfaces huile/eau, la collision de plusieurs gouttelettes entraînera une coalescence directe par les trous dans les films interfaciaux. Lors du rapprochement de 2 gouttelettes lipidiques, le liquide de la phase aqueuse est expulsé de l'espace étroit qui les sépare : c'est l'effet Gibbs-Marangoni. Ce mouvement de la phase aqueuse peut entraîner une partie des protéines des films interfaciaux, qui glissent le long des surfaces des gouttelettes, ce qui forme des régions où la concentration en protéines est réduite. La coalescence peut alors se produire par ses régions fragilisées des films interfaciaux. La coalescence intervient souvent après un temps de contact des gouttelettes lipidiques prolongé qui entraîne une déstabilisation progressive des films interfaciaux jusqu'à leur rupture (Dickinson, 1996; McClements, 1998).

Enfin, le crémage consiste en la remontée des gouttelettes lipidiques à la surface, du fait de la plus faible densité des gouttelettes lipidiques que de celle de la phase aqueuse (**Figure 5d**). C'est un phénomène réversible. Le crémage peut être ralenti en augmentant la viscosité de la phase aqueuse, en diminuant la taille des gouttelettes lipidiques et la différence de densité entre la phase aqueuse et la phase lipidique selon la loi de Stokes. Le crémage est alors favorisé par la coalescence de par l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques. Une faible floculation où peu de gouttelettes lipidiques sont liées les unes aux autres, tend à favoriser le crémage car les floculats ont une taille effective plus grande que les gouttelettes individuelles. En revanche, une très forte floculation peut entraîner la formation d'un réseau tri-dimensionnel de floculats qui empêche le mouvement des gouttelettes individuelles et donc limite le crémage (McClements, 1998; Tadros, 2013).

### **I.1.2. Composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement répandus dans les végétaux, dont les oléagineux. En tant que métabolites secondaires, ce sont des composés qui ne sont ni impliqués dans le cycle énergétique ni dans la croissance des végétaux (Ozdal, Capanoglu, & Altay, 2013). Au sein des végétaux, leurs principaux rôles sont des rôles de défense contre les stress biotiques et abiotiques (Pourcel, Routaboul, Cheynier, Lepiniec, & Debeaujon, 2007; Soto-Vaca, Gutierrez, Losso, Xu, & Finley, 2012). Leur structure commune est constituée d'un cycle aromatique et d'un groupe hydroxyle (OH). Il existe plus de 8000 composés phénoliques. Ils sont classés en phénols simples, dérivés de l'acide benzoïque ou de

l'acide cinnamique (acide caféique, acide férulique, acide gallique...) et en polyphénols (tanins, flavonoïdes, saponines...). Les composés phénoliques présentent de nombreuses activités biologiques, dont des propriétés antioxydantes. Consommés, ils préviennent les risques cardiovasculaires, de cancer, les réactions inflammatoires... (Ozidal et al., 2013; Pourcel et al., 2007; Soto-Vaca et al., 2012).

En revanche, en présence d'oxygène, par auto-oxydation ou par l'action des polyphénols oxydases ou des peroxydases, les composés phénoliques peuvent être oxydés en quinones. Ces quinones peuvent ensuite se lier à d'autres phénols, quinones ou protéines via entre autres leurs groupements amino ou sulfhydryle. Ces liaisons peuvent être irréversibles dans le cas de liaisons covalentes, ou réversibles dans le cas de liaisons hydrogènes, hydrophobes, ioniques ou de van der Waals. Les grands complexes forment généralement des pigments bruns. Ces réactions affectent le potentiel antioxydant des phénols, mais également les propriétés des protéines : diminution de la solubilité, de l'hydrophobicité de surface et des propriétés nutritionnelles (digestibilité et biodisponibilité de la lysine et de la cystéine). Les phénols sont les plus stables à pH 7, et la liaison des quinones aux protéines est favorisée à pH alcalin. Les acides phénoliques et les polyphénols sont tous deux aptes à se lier aux protéines. Les composés phénoliques les moins stables face à l'oxydation, semblent être ceux de faible masse moléculaire (phénols simples), avec au moins 2 groupes hydroxyles (OH) sur le groupe benzène, avec des groupes hydroxyles proches les uns des autres. L'affinité de liaison entre les polyphénols et les protéines augmente avec la taille des polyphénols (Arntfield, 2018; Cilliers & Singleton, 1989; Friedman & Jürgens, 2000; Matheis & Whitaker, 1984; Ozidal et al., 2013; Pourcel et al., 2007; Sosulski, 1979).

Les graines d'oléagineux sont riches en composés phénoliques. Elles contiennent de nombreux phénols simples tels que l'acide p-hydroxy-benzoïque, vanillique, caféique, p-coumarique, férulique, sinapique... ainsi que des polyphénols tels que de la pro-anthocyanidine, quercétine, kaempférol, myricétine, apigénine... Ces composés phénoliques sont également présents dans les tourteaux de presse. Les oléagineux sont alors très exposés à la formation de complexes entre protéines et phénols, surtout aux pH alcalins. La formation de ce genre de complexes est relatée pour divers oléagineux tels que le colza, la moutarde, le tournesol ou le coton (Arntfield, 2018; Mattila, Pihlava, et al., 2018; Ozidal et al., 2013; Shahidi & Naczki, 1992; Siger, Nogala-Kalucka, & Lampart-Szczapa, 2008; Sosulski, 1979).

## I.2. Le chanvre

### I.2.1. Review: « Hemp seed as a source of food proteins: a review »

Potin, F., & Saurel, R. Hemp seed as a source of food proteins: a review. In HEMP – Production, Characterization and Applications, *Sustainable Agriculture Reviews*, Crini G. and Lichtfouse E. Eds, Springer Nature. A paraître in 2019.

#### I.2.1.1. Abstract

The galloping population growth is leading to a significant increase in the protein demand. Conventional protein sources, particularly those of animal origin, will no longer be sufficient to meet this demand. The use of plant proteins, less costly in terms of resources and with a much lower environmental impact, is an interesting alternative to meet future societal and environmental challenges. Hemp seed is an undervalued co-product resulting from the cultivation of industrial hemp. This plant resource has significant contents in protein and oil of nutritional value, about 26% and 36% respectively, that may help to meet the challenges of sustainable food. The specific valorization of hemp proteins for human consumption is a recent issue. Through this chapter, we showed the current state of knowledge on hemp proteins in terms of composition, nutritional aspect, extraction, and physicochemical, functional and biological properties. Different extraction routes have been proposed to recover the main hemp protein fractions from oil press cakes in general. Extraction yields generally vary from 34 to 51%, and the protein purity of the resulting protein isolates from 87 to 94%. The proteins, usually extractible from hemp meal, belong to the globulin and albumin families. Most of hemp protein isolates contain predominantly globulins, mainly the 11S edestins. The hemp proteins have an interesting essential amino acid profile and have a high digestibility of about 90%. Many authors have highlighted that hemp protein hydrolysates possess a wide range of health biological activities such as antioxidant properties, metal chelation, antihypertensive, hypoglycemic properties... Hemp proteins also have techno-functional properties such as gelling, emulsifying and foaming properties adapted to the development of new plant-based foods. Different treatments of hemp proteins can improve their functional properties, such as enzymatic and chemical modifications or pH- and heat-induced denaturation. Despite limited solubility, hemp protein ingredients represent an alternative to current cereal and legume protein materials in human diet in the future.

**Keywords**

Hemp, Protein, Extraction, Techno-functional properties, Biological activity

**Abbreviations**

HEC: Hemp Enzyme Concentrate, hemp protein concentrate obtained by enzyme-assisted extraction

HPH: Hemp Protein Hydrolysate

HPI: Hemp Precipitated Isolate, hemp protein isolate obtained by globulin isoelectric point precipitation

HMI: Hemp Micellized Isolate, hemp protein isolate obtained by micellization

SPI: Soy Precipitated Isolate, soy protein isolate obtained by globulin isoelectric point precipitation

**I.2.1.2. Introduction**

According to the forecasts of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), the world's population is expected to reach 9.1 billion by 2050, requiring a 70% increase in world food production. In 2017, 11% of the world's population was undernourished and 13% of adults were obese (FAO, 2018). Feeding the planet by fighting against global warming are the major issues that will have to be faced, especially as global warming is leading to a decrease in crop yields each year (FAO, s. d.). Ovovegetarian food is known to require less energy, land and water resources than meat food (Pimentel & Pimentel, 2003). The consumption of more plant proteins is a solution to face these problems. Global protein demand was expected to increase by 40% between 2010 and 2030. This increase was expected to be 33% and 43% for animal and plant protein demands respectively (Ozanne, 2014).

Cereals, legumes and oilseeds are the main sources of plant proteins. It is estimated that only 35% of the total proteins produced by the agricultural sector is used for human consumption. The rest is used for livestock feed, non-food applications, or simply treated as a waste. Soy proteins or corn and wheat flours, are already widely used. In contrast, « conventional » sources of protein should no longer be sufficient to meet the global demand for protein in the coming years. Finding alternative sources of protein is strongly recommended (Sari et al., 2015).

Hemp is an annual herbaceous plant, highly harvested worldwide, mainly for its fibers in stems (Ash, 1948). Asia is the biggest producer of hemp, and cultivates nearly 75% of the world's hemp. In Asia, production is mainly shared between China, which grows 50% of the world's hemp, and North Korea. Europe is the second largest hemp growing continent. In 2004, it produced 14% of the world's hemp, but it has seen a renewed interest in hemp cultivation since 2011. The area under cultivation has increased from 8,000 hectares in 2011 to 33,000 hectares in 2016. France is the European leader and produces nearly half of European production, placing it in 3rd position worldwide behind North Korea (Amaducci et al., 2015; Bouloc, 2006; Carus et al., 2013).

Hemp is an ecologically and economically interesting plant for many reasons. It has a strong and rapid growth since it is harvested 4 months after seeding and produces a significant amount of biomass (Ash, 1948). It does not need phytosanitary products because it has the ability to eradicate weeds, and is not affected by any pests or diseases. It is one of the few agricultural products to be grown without phytosanitary products in non-organic farms (Carus et al., 2013). It is used in rotation culture and increases the yield of the next culture by 10 to 15%. It has the ability to remove large quantities of heavy metals from the soil, and its long root system helps to prevent soil erosion. It also has low water and input requirements (Ranalli & Venturi, 2004).

One hectare of hemp produces about 5 tons of straw and 1 ton of seed. All parts of hemp are recoverable. Fibers which represent about 30% of the straw are mainly used for pulp and paper, as well as for insulation. The woody core of the stems, that account for about 50% of the straw is mainly used as horse bedding or as garden mulch. The dusts, corresponding to about 15% of the straw are pelletized for incineration or used as compost. Flowers and leaves can also be used in pharmaceuticals or food supplements. Seeds are still undervalued, since they are mainly used for livestock feed, or consumed as such as human food (Carus et al., 2013). The large quantities of oils and proteins, of nutritional interests, contained in hemp seeds, are not yet valued at their true value in human food.

The purpose of this chapter is to synthesize scientific knowledge on hemp proteins in terms of composition, nutritional aspect, extraction, and physicochemical, functional and biological properties

### I.2.1.3. Hemp Seed Composition

The composition of hemp seed and its derivatives is reported **Table 1** (Aluko, 2017; Balentić et al., 2019; Callaway, 2004; House, Neufeld, & Leson, 2010; Kim & Lee, 2011a; Mamone, Picariello, Ramondo, Nicolai, & Ferranti, 2019; Mattila, Mäkinen, et al., 2018; Sarv, 2017; Tang et al., 2006).

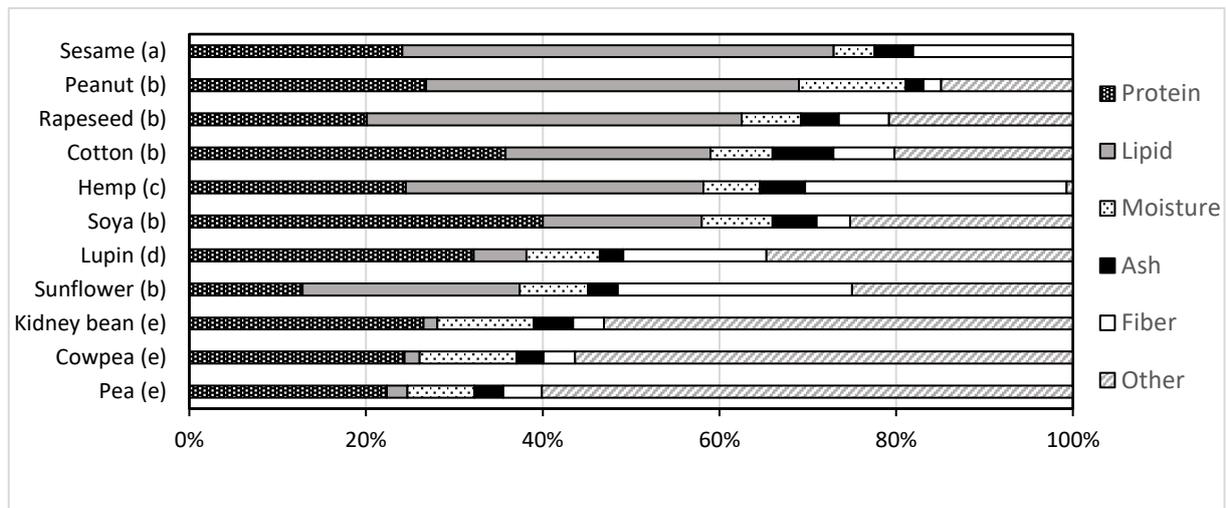
**Table 1: Composition of hemp seed and derived products.** SD: standard deviation. n: number of references.

g/100g wet basis	Whole seeds				Dehulled seeds		Seed hulls		Cold pressed hemp meal				Delipidated hemp meal			
	Mean	±	SD	n	Mean	n	Mean	n	Mean	±	SD	n	Mean	±	SD	n
<b>Proteins</b>	24.5	±	0.4	5	35.9	1	12.7	1	33.4	±	5.2	4	39.2	±	9.7	3
<b>Lipids</b>	33.7	±	4.3	5	46.7	1	10.3	1	10.6	±	0.4	4	1.0			1
<b>Moisture</b>	6.4	±	0.4	4	4.9	1	5.1	1	6.4	±	1.7	4	8.6	±	1.6	3
<b>Ashes</b>	5.1	±	0.4	3	6.4	1	3.9	1	6.7	±	0.4	4	9.7			1
<b>Carbohydrates</b>	27.6			1	15.1	1	64.1	1	45.3	±	3.5	3	57.3			1
<b>Total fibers</b>	21.6			1					42.6			1	45.4			1
<b>Energy (kJ/100g)</b>	2248.9	±	133.5	3	2770.0	1	2020.0	1	2040.0			1				
<b>References</b>	Callaway 2004; House et al. 2010; Aluko 2017; Sarv 2017; Mattila et al. 2018				House et al. 2010; Kim and Lee 2011b		House et al. 2010; Mattila et al. 2018		Callaway 2004; House et al. 2010; Mamone et al. 2019				Tang et al. 2006; Sarv 2017; Balentić et al. 2019			

Hemp seeds have high contents in protein and fat. Whole seeds consist of approximately 26.2% protein and 36% lipid (all percentages in w/w dry basis). Hulled seeds have around 35.7% and 41.7% contents for proteins and lipids respectively. The seed hull contains about 69% carbohydrates, richer than the whole seeds with about 32% content, which are themselves richer in carbohydrates than the hulled seeds with about 16% content. Hemp carbohydrates are mostly fibers. Fibers account for about 93.2% of carbohydrates for the various hemp seed derivatives. Hemp seeds are usually cold-pressed to extract oil. The residual cakes or meals thus obtained have only around 11% lipids. The proteins are then concentrated at ~36%. Further delipidation by using organic solvent can be applied to the meal to remove almost all the lipids, increasing

the protein content to ~43%. The minerals are mostly present in the seed pulp. The ash content of shelled seeds is indeed 6.7% against 3.8% for the seed hull. The energy value of hemp seed products ranges from 1997.9 kJ/100 g for meal to 2912.7 kJ/100 g for hulled seed.

The comparison of hemp seeds with other oilseeds and protein crops is presented **Figure 6** in terms of composition (Aluko, 2017; Callaway, 2004; Elleuch, Besbes, Roiseux, Blecker, & Attia, 2007; Erbaş, Certel, & Uslu, 2005; House et al., 2010; Khattab, Arntfield, & Nyachoti, 2009; Mattila, Mäkinen, et al., 2018; Rodrigues et al., 2012; Sarv, 2017). Hemp seeds have protein content in the range of other seeds and pulses. Their composition is similar to that of peas, cowpeas, red beans, peanuts, or sesame seeds. Their protein content is significantly higher compared to sunflower seeds or canola seeds, but still less rich than for their soybean, cotton and lupine counterparts. The amount of lipids contained in hemp seeds is higher than the average of seeds. Thus, hemp seeds contain more fat than peas, cowpeas, red beans, lupine seeds, sunflower seeds, soya beans and cotton seeds. They contain less fat than rapeseeds, sesame seeds and peanuts. Regarding protein and lipid contents, hemp seeds are then intermediate between oilseeds and proteaginous pulses.



**Figure 6: Composition of different oleaginous and proteaginous seeds.** a: Elleuch et al. (2007). b: Rodrigues et al. (2012). c: Callaway (2004); House et al. (2010); Aluko (2017); Sarv (2017); Mattila et al. (2018). d: Erbaş et al. (2005). e: Khattab et al. (2009).

### I.2.1.3.1. Hemp Proteins

Hemp seed proteins are predominantly composed of about 65-80% of globulins. The remaining fraction corresponds to the albumins, amounting to about 20-30% (Aluko, 2017; Park, Seo, & Lee, 2012; Ponzoni et al., 2018; Tang et al., 2006).

### I.2.1.3.1.1. Globulins

Hemp globulins are represented predominantly by 11S edestins representing about 65% of total proteins and 93% of globulins, and in a minority by 7S globulins accounting for about 5% of total proteins and 7% of globulins (Osburn, 1992; Ponzoni et al., 2018; Tang et al., 2006).

#### **Edestin (11S)**

Edestin is a homohexamer, like most 11S globulins, of about 320 kDa (Aluko, 2017; Docimo, Caruso, Ponzoni, Mattana, & Galasso, 2014; Patel et al., 1994). Each monomer of approximately 54 kDa is composed of an acid  $\alpha$  subunit of ~34 kDa and a more heterogeneous basic  $\beta$  subunit, generally forming 2 characteristic bands at ~18 and ~21 kDa upon gel electrophoresis (Kim & Lee, 2011b; Pihlanto, Mattila, Mäkinen, & Pajari, 2017; Tang, Wang, & Yang, 2009). The acid  $\alpha$  and basic  $\beta$  subunits are linked together by a disulfide bridge. No disulfide bridge is involved between the monomers, and hydrophobic bonds seem to be preferentially at the origin of the hexameric structure (Hadnadev et al., 2018; Kim & Lee, 2011a; Malomo & Aluko, 2015a; Mamone et al., 2019; Tang et al., 2006; Q. Wang, Jin, & Xiong, 2018; X.-S. Wang, Tang, Yang, & Gao, 2008). Kim & Lee (2011a), detected edestin bands by gel electrophoresis after periodic acid-Schiff staining, suggesting that edestin could contain carbohydrate parts in its structure.

Three types of edestin have been identified: CsEde1, CsEde2 and CsEde3 (Docimo et al., 2014; Ponzoni et al., 2018). Each type is itself composed of two isoforms. There are then 6 genes encoding edestin. The 2 genes coding for type 1 edestin, CdEde1A and CdEde1B, and the 2 genes coding for type 3 edestin, CdEde3A and CdEde3B, are carried by a common DNA fragment of 16071 bp while the 2 genes coding for type 2 edestin, CdEde2A and CdEde2B, are carried by another fragment of 8232 bp. An edestin gene, composed of 4 exons and 3 introns, codes jointly for the acid  $\alpha$  and basic  $\beta$  subunits. A cleavage site is present between these 2 sequences to form the acid  $\alpha$  and basic  $\beta$  subunits after post-translational modifications. The edestin forms coded by the 6 genes have a common N-terminal sequence of 23 amino acids and contain 4 cysteine residues ; 3 of these residues locate on the acid  $\alpha$  subunit and the last one on the basic  $\beta$  subunit. These cysteine residues allow the inter-chain disulfide bond between the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits and an intra-chain disulfide bond within the acid  $\alpha$  subunit.

## 7S globulin

7S globulin consists of a subunit of about 48 kDa (Mamone et al., 2019; Ponzoni et al., 2018; Tang et al., 2006, 2009). A single gene encoding 7S globulin has been identified on a 1893 bp DNA fragment. This gene has 5 exons and 4 introns and encodes a 53.5 kDa precursor polypeptide. The 7S polypeptide has a N-terminal sequence of 21 amino acids, 4 N-glycosylation sites and contains 3 cysteine residues. X.-S. Wang et al. (2008), observed that the 48 kDa subunit of 7S globulin appeared to be partially associated with the  $\beta$  basic subunit of edestin through disulphide bond.

### I.2.1.3.1.2. Albumins

According to Malomo & Aluko (2015a), the albumins consist mainly of 7 polypeptides of 6 to 35 kDa, unaffected by the addition of reducing agent, thus meaning no inter-chain disulfide bond is formed in their structure. Odani & Odani (1998) and Ponzoni et al. (2018), have identified specifically a 2S albumin of 10 kDa. It consists of 2 subunits of 7 and 3 kDa respectively, linked by 2 disulfide bridges in contradiction with the previous authors. Two genes encode this protein: Cs2S-1 and Cs2S-2. These 2 genes are present on the same 13738 bp DNA fragment, and encode the same 142 amino acid precursor polypeptide. The 2 subunits are coded by the same gene. The precursor polypeptide contains a N-terminal sequence of 23 amino acids and a cleavage site, which leads to the dissociation of the 2 subunits by post-translational modifications. Albumin 2S is very rich in sulfur amino acids representing 18% of the total amino acids of this protein. The small subunit contains 2 cysteine and 3 methionine residues, while the large subunit contains 6 cysteine and 5 methionine residues. The largest subunit forms 2 intra-chain disulfide bonds.

### I.2.1.3.1.3. Amino Acid Composition and Nutritional Value

#### Amino acids

The amino acid composition of hemp seed and its derivatives is presented **Table 3**. As usual presentation, sufficient and limiting / deficient amounts of amino acids have been established based on the recommendations of the FAO/World Health Organization and United Nations University (FAO/WHO & UNU, 2007) for feeding children aged from 1 to 2 years or for adults over 18 years old. Hemp proteins from whole and hulled seeds, seed hull, press-cake and hemp protein isolates, contain all essential amino acids in sufficient quantities for adult nutrition, except lysine, which is the only limiting amino acid. According to Malomo & Aluko (2015a),

only the albumins contain lysine in sufficient quantity, but they appear limiting in isoleucine, leucine, tryptophan and in aromatic amino acids (Phenylalanine + Tyrosine) for both adult and children nutrition, and in valine only for children nutrition. These authors also determined the amount of amino acids in hemp globulin and albumin isolates. According to the combined amino acid data for albumins and globulins, total hemp proteins should be limiting in isoleucine, leucine, tryptophan and valine, which is not the case according to all other authors. The amino acid composition of hemp protein isolates resulting from selective isoelectric point precipitation (HPI) is representative of globulins (Girgih, Alashi, He, Malomo, & Aluko, 2013; Girgih, Udenigwe, & Aluko, 2010; Hadnadev et al., 2018; Malomo & Aluko, 2015b; Ren et al., 2016; Tang et al., 2006; Q. Wang et al., 2018). Tryptophan is present in insufficient amount in the seed hull proteins for children nutrition. On the other hand, it is sufficient for adult nutrition (House et al., 2010; Mattila, Mäkinen, et al., 2018). Finally, the 7S globulin fraction and the 11S globulin fraction have rather similar amino acid compositions. However, the 7S globulin fraction is limiting in sulfur amino acids, unlike the 11S, explaining that the HPI, majorly represented by edestins are not deficient in sulfur amino acids (Callaway, 2004; Kim & Lee, 2011a; X.-S. Wang et al., 2008).

### **Digestibility**

Different *in vitro* and *in vivo* protein digestibility values available in the literature for hemp and other plant and animal protein sources are listed **Table 2**. The whole seed proteins of hemp and resulting press-cake have *in vivo* digestibility values of 85% and 87% respectively (House et al., 2010; Malomo & Aluko, 2015b). Dehulling of hemp seeds increases *in vivo* protein digestibility by 10% to 95% digestibility (House et al., 2010). The hulled hemp seed proteins thus have digestibility values similar to those of animal proteins: 94% for meat and fish, 98% for beef, 94-95% for whole or skim milk, or 98% for eggs (FAO/WHO & UNU, 2007; Sarwar, 1997; Schaafsma, 2000). *In vivo* digestibility values of hemp proteins are comparable to other vegetable proteins ranging from 71% for black beans to 99% for pea protein concentrates (PPC) (Rutherford, Fanning, Miller, & Moughan, 2015; Sarwar, 1997).

*In vitro* digestibility value of hemp meal proteins is close to that obtained *in vivo* : 85% vs. 87% respectively (House et al., 2010; Malomo & Aluko, 2015b). This value is close to the *in vitro* protein digestibility of cottonseed meal measured at 81% (Hsu, Vavak, Satterlee, & Miller, 1977). Hemp protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (HPI), has an *in vitro* digestibility of 88%, higher than that of soy protein isolate obtained by isoelectric point

precipitation (SPI) evaluated at 80% (FAO/WHO & UNU, 2007; Hsu et al., 1977; Malomo & Aluko, 2015b; X.-S. Wang et al., 2008)

**Table 2: *In vivo* and *in vitro* digestibility values of hemp proteins and other plant and animal proteins in percentage.** a: House et al. (2010); b: Malomo & Aluko (2015b); c: X.-S. Wang et al. (2008); d: Schaafsma (2000); e: Sarwar & Peace (1986); f: FAO/WHO & UNU (2007); g: Sarwar (1997); h: Hsu et al. (1977); i: Rutherford et al. (2015); j: Ahrens, Venkatachalam, Mistry, Lapsley, & Sathe (2005); k: Angulo-Bejarano et al. (2008). HPI and SPI, hemp and soy protein isolates respectively. PPC, rice PC and MPC, pea, rice and milk protein concentrates respectively.

Raw material	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Whole seed <sup>a</sup>	85	
Dehulled seed <sup>a</sup>	95	
Hemp	Meal <sup>ab</sup>	85
	HPI <sup>bc</sup>	88
	11S <sup>c</sup>	91
	7S <sup>c</sup>	88
Soy	Bean <sup>de</sup>	93
	Flour <sup>f</sup>	86
	Meal <sup>g</sup>	80
	SPI <sup>fghi</sup>	95
Pea	Seed <sup>ef</sup>	86
	PPC <sup>i</sup>	99
Sunflower	Seed <sup>e</sup>	91
	Flour <sup>f</sup>	90
Cotton	Seed <sup>f</sup>	90
	Meal <sup>h</sup>	85
Peanut <sup>ef</sup>	95	
Almond <sup>j</sup>		88
Faba bean <sup>e</sup>	88	
Black bean <sup>g</sup>	71	
Bean <sup>f</sup>	78	
Lentil <sup>e</sup>	84	
Rolled oat <sup>e</sup>	90	
Chickpea flour <sup>k</sup>	84	72
Rice PC <sup>i</sup>	88	
Wheat	Raw <sup>d</sup>	91
	White flour <sup>f</sup>	96
Milk	Whole <sup>d</sup>	95
	Skim <sup>g</sup>	94
	MPC <sup>i</sup>	98
	Lactalbumin <sup>g</sup>	99
Egg <sup>d</sup>	98	
Meat/fish <sup>f</sup>	94	
Beef <sup>d</sup>	98	

**Table 3: Amino acid composition of proteins from hemp seed and derived products.** Tot AA: total amino acids. Y/O: years old. HPI: hemp protein isolate obtained by isoelectric precipitation. HMI: hemp protein isolate obtained by micellization. Glb: globulins. Alb: albumins. Asx = aspartic acid + asparagine. Glx = glutamic acid + glutamine. Met: methionine. Cys: cysteine. Phe: phenylalanine. Tyr: tyrosine. Hydrophilic = arginine + Asx + cysteine + Glx + histidine + lysine + serine + threonine + tyrosine. Hydrophobic = alanine + glycine + isoleucine + leucine + methionine + phenylalanine + proline + tryptophan + valine. Phobic/Philic = hydrophobic / hydrophilic. Aromatic = phenylalanine + tryptophan + tyrosine. Grey background, limiting amino acids according to FAO recommendations for children aged from 1 to 2 Y/O. Underlined AA, essential amino acids.

g/100 g of tot AA	Whole Seed				Dehulled seed				Hull				Hemp presscake				HPI				HMI	Glb	Alb	7S	11S	FAO recommendations			
	Value	±	SD	n	Value	±	SD	n	Value	±	SD	n	Value	±	SD	n	Value	±	SD	n	Value	Value	Value	Value	Value	Value	Value	Value	Value
Alanine	4.7	±	0.8	3	4.6	±	0.3	2	4.7	±	0.1	2	4.4	±	0.2	2	4.4	±	0.3	8	4.5	2.8	4.1	5.1	4.9				
Arginine	11.9	±	1.6	3	12.6	±	0.8	2	10.3	±	1.2	2	12.4	±	2.8	2	12.9	±	2.0	8	10.9	16.1	13.4	9.2	10.7				
Asx	11.1	±	1.1	3	10.9	±	0.5	2	10.8	±	0.2	2	10.7	±	1.4	2	11.0	±	0.8	8	11.2	9.5	8.3	10.6	10.1				
Cysteine	1.7	±	0.2	3	1.1	±	1.1	2	1.9	±	0.3	2	1.8	±	0.2	2	0.9	±	0.6	8	1.6	3.3	3.4	0.2	0.3				
Glycine	4.8	±	0.3	3	4.7	±	0.1	2	4.9	±	0.0	2	4.8	±	0.5	2	4.2	±	0.2	8	4.1	4.1	8.7	4.6	4.4				
Glx	17.9	±	1.9	3	19.8	±	2.6	2	14.5	±	0.5	2	18.1	±	2.8	2	19.5	±	2.2	8	19.1	21.5	21.4	19.1	19.1				
<u>Histidine</u>	2.7	±	0.4	3	2.9	±	0.2	2	2.6	±	0.5	2	3.0	±	0.7	2	2.9	±	0.2	8	3.1	3.9	3.9	3.8	3.8	1.8	1.5		
<u>Isoleucine</u>	3.9	±	0.4	3	3.9	±	0.2	2	4.3	±	0.4	2	3.9	±	0.0	2	4.0	±	0.3	8	5.1	2.9	2.1	3.7	3.8	3.1	3.0		
<u>Leucine</u>	6.9	±	0.6	3	6.6	±	0.6	2	7.7	±	1.0	2	6.9	±	0.8	2	6.8	±	0.6	8	7.1	5.6	4.2	7.4	7.4	6.3	5.9		
<u>Lysine</u>	4.0	±	0.5	3	3.6	±	0.0	2	3.9	±	0.0	2	3.9	±	0.5	2	3.5	±	0.6	8	3.1	3.7	7.7	4.0	3.8	5.2	4.5		
Methionine	2.5	±	0.1	3	2.2	±	0.8	2	2.4	±	0.4	2	2.4	±	0.1	2	1.8	±	0.4	8	2.3	4.1	1.8	1.8	2.7				
Phenylalanine	4.7	±	0.4	3	4.4	±	0.4	2	5.7	±	0.8	2	4.7	±	0.5	2	4.6	±	0.4	8	4.6	3.3	1.4	4.9	4.6				
Proline	4.3	±	0.6	3	4.5	±	0.3	2	6.5	±	2.4	2	4.5	±	0.4	2	4.2	±	0.5	8	4.1	3.9	4.0	5.3	4.9				
Serine	5.3	±	0.4	3	5.2	±	0.4	2	4.9	±	0.1	2	5.4	±	1.1	2	5.1	±	0.5	8	5.6	5.7	5.4	6.7	6.1				
<u>Threonine</u>	4.0	±	0.6	3	3.8	±	0.1	2	4.1	±	0.3	2	3.8	±	0.3	2	3.9	±	0.6	8	3.6	2.6	4.9	4.8	4.6	2.7	2.3		
<u>Tryptophan</u>	0.97	±	0.1	2	1.10	±	0.0	2	0.71	±	0.0	1	1.10	±	0.1	2	1.22	±	0.2	3	ND	0.34	0.17	ND	ND	0.74	0.60		
<u>Tyrosine</u>	3.4	±	0.3	3	3.0	±	0.9	2	3.9	±	1.1	2	3.2	±	0.2	2	3.7	±	0.3	8	4.0	3.4	2.1	3.6	3.8				
<u>Valine</u>	5.2	±	0.4	3	5.1	±	0.1	2	6.3	±	1.2	2	5.1	±	0.0	2	5.3	±	1.0	8	6.2	3.4	3.0	5.2	4.9	4.2	3.9		
Met+Cys	4.2	±	0.3	3	3.3	±	1.8	2	4.3	±	0.0	2	4.2	±	0.1	2	2.6	±	1.0	8	3.9	7.4	5.2	2.0	3.0	2.6	2.2		
Phe+Tyr	8.1	±	0.7	3	7.5	±	0.5	2	9.6	±	2.0	2	7.9	±	0.7	2	8.3	±	0.7	8	8.6	6.7	3.5	8.4	8.4	4.6	3.8		
Hydrophilic	62.0	±	7.0	3	63.0	±	6.7	2	56.9	±	4.3	2	62.3	±	9.9	2	63.4	±	7.7	8	62.1	69.7	70.4	61.9	62.3				
Hydrophobic	38.0	±	3.8	3	37.0	±	2.8	2	43.1	±	6.4	2	37.7	±	2.6	2	36.6	±	3.9	8	37.9	30.3	29.6	38.1	37.7				
Phobic/Philic	0.6	±	0.5	3	0.6	±	0.4	2	0.8	±	1.5	2	0.6	±	0.3	2	0.6	±	0.5	8	0.6	0.4	0.4	0.6	0.6				
Aromatic	9.1	±	0.9	3	8.6	±	1.4	2	10.4	±	2.0	2	9.0	±	0.8	2	9.6	±	0.9	8	8.6	7.0	3.7	8.4	8.4				
References	Callaway 2004; House et al. 2010; Mattila et al. 2018				House et al. 2010; Kim and Lee 2011b				House et al. 2010; Mattila et al. 2018				House et al. 2010; Malomo and Aluko 2015b				Tang et al. 2006; Wang et al. 2008; Girgih et al. 2010, 2013; Malomo and Aluko 2015b; Ren et al. 2016; Hadnadev et al. 2018; Wang et al. 2018				Hadnadev et al. 2018	Malomo and Aluko 2015a	Malomo and Aluko 2015a	Wang et al. 2008	Wang et al. 2008	FAO/WHO and UNU 2007			

### I.2.1.3.1.4. Extraction of Hemp Proteins

In order to valorize all the components of the hemp seed, hemp proteins are generally extracted from cakes resulting from the mechanical pressing of whole seeds in hemp oil production.

Many authors have proposed the extraction of hemp proteins from hemp meal in order to characterize protein fraction properties and to produce hemp protein concentrates or isolates (Girgih et al., 2014, 2010; Hadnadev et al., 2018; Kim & Lee, 2011a; Malomo & Aluko, 2015b, 2016; Malomo, He, & Aluko, 2014; Mamone et al., 2019; Orio et al., 2017; Ren et al., 2016; Tang et al., 2006; Q. Wang et al., 2018; X.-S. Wang, Tang, Chen, & Yang, 2009; X.-S. Wang et al., 2008; Yin et al., 2008; Yin, Tang, Wen, & Yang, 2007). The general extraction route of hemp proteins is presented **Figure 7**. Hemp oil is extracted from whole or hulled seeds by cold mechanical pressing. The residual cake generally contains about 70% less oil than the original seeds. Further delipidation by solvent may be applied, generally with hexane, to substantially remove the lipids. The cakes are crushed and sometimes sifted before being hydrated. During extraction, the hydration is carried out typically by suspending 5% of cake (from 1 to 7.5%) in distilled water at pH 10 (from 8 to 10), 37 °C (from 20 to 37 °C), with 2 h stirring (from 1 to 4 h). Successive centrifugation is carried out at 7000 g (from 6000 to 10000 g) at 20 °C (from 4 to 20 °C) during 30 min (from 15 to 60 min). The pellet is discarded and the supernatant recovered. The pH of the supernatant is adjusted to pH 5 (from 4.5 to 5) and sometimes filtered on cheese-cloth or Whatman® paper. A new centrifugation step is applied at 8000 g (from 5000 to 8000 g), at 20 °C for 10 to 60 min. The pellet is sometimes washed with distilled water and then resuspended at pH 7 (from pH 6.8 to 7). Dialysis is optionally applied, and the suspension is freeze-dried. The isolates obtained have protein content varying from 87 to 94% on a dry basis. The extraction yields are generally between 34 and 51% except in the work of Tang et al. (2006), where it reached 73%.

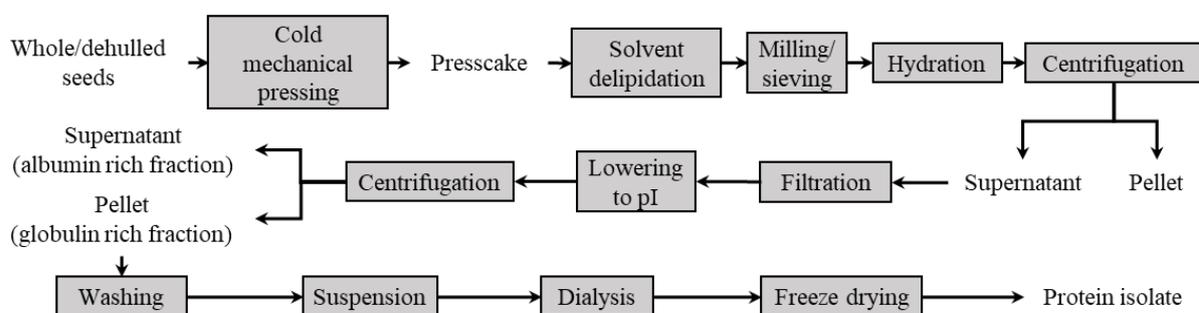


Figure 7: General extraction procedure of proteins from hemp seed. pI: isoelectric point.

Alternative extraction methods based on micellization principle have been described in the literature. Malomo & Aluko (2015a), suspended the raw hemp meal at 10% in 0.5 M NaCl solution for 1 h at 24 °C. The supernatant obtained after centrifugation was filtered and dialyzed against distilled water. The content of the dialysis tubing was centrifuged. The supernatant was collected as the albumin fraction. After washing with distilled water and successive centrifugation, the resulting pellet was collected as the globulin fraction. After final freeze-drying, these authors obtained powders with protein contents (in w/w dry basis) and extraction yields of 80% and 6.33% for albumins and 100% and 6.07% for globulins, respectively. In a similar way, Hadnadev et al. (2018), proposed extraction by suspending 10% delipidated hemp cake in 0.8 M NaCl solution at pH 7 for 2 h at 35 °C. The supernatant obtained by centrifugation was diafiltered by ultrafiltration using a 12-14 kDa cut-off membrane with distilled water at pH 7. A new centrifugation step was performed on the retentate and the pellet was freeze-dried. The resulting protein isolate (HMI) had a high protein purity of ~99% with a protein yield of ~40%.

Otherwise, Malomo & Aluko (2015b), proposed an enzyme-assisted extraction method to facilitate the release of proteins from the plant material. A mixture of cellulase, hemicellulase, xylanase and phytase was applied to the aqueous suspension of hemp meal at pH 5. After incubation at 37 °C for 4 h, the solution was diafiltered by ultrafiltration at 10 kDa cut-off and then freeze-dried. The resulting powder (HEC) had at 74% protein content on a wet basis.

### **I.2.1.3.1.5. Physicochemical Properties and Functionality**

#### **I.2.1.3.1.5.1. Solubility**

Protein solubility is a key-property for many liquid foods and influences basically other techno-functional properties such as gelling and emulsifying properties.

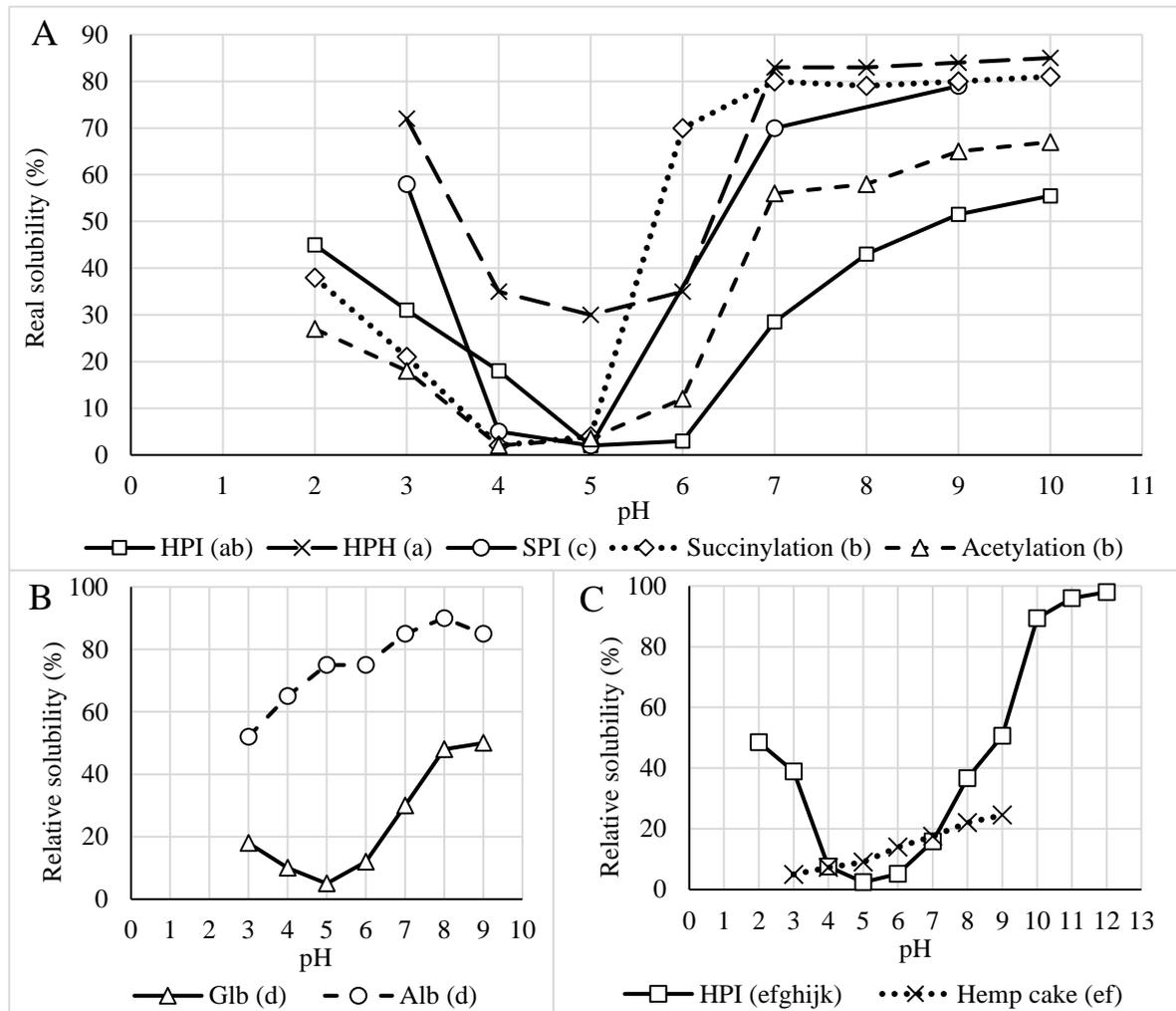
Protein solubility can be defined as the equilibrium between hydrophobic protein–protein and hydrophilic protein–water interactions. The common method to measure solubility evaluates the retention of proteins in the supernatant after centrifugation, which is influenced by the amount of aggregated proteins able to sediment. Protein solubility is sometimes referred to as « nitrogen solubility », since nitrogen from both protein and non-protein sources, such as nucleic acids, free amino acids, peptides, and phospholipids, is extracted in solubility tests. Nitrogen solubility can be defined as the ratio of solubilized nitrogen to total nitrogen in the sample, expressed as a percentage. Most of the authors who have investigated the solubility of

hemp proteins have expressed the protein solubility, as relative nitrogen solubility. In this case, the amount of soluble protein, or soluble nitrogen, after hydration of the protein material in 0.1 M NaOH solution was considered to correspond to 100% solubility. The amount of soluble protein at the different pH of hydration is then divided by the amount of soluble protein in 0.1 M NaOH, to obtain the percentage of relative solubility. Thus, this method makes it possible to represent the solubility curve as a function of pH, but gives no indication of the actual solubility values of the protein material.

The extractability of hemp proteins from cake has been studied by Malomo & Aluko (2015b) and Malomo et al. (2014), by assessing their relative solubility from pH 3 to 9 (**Figure 8C**). Relative solubility increased with increasing pH. From pH 3 to 5, it increased slightly from about 5 to 10%, respectively. Above pH 5, the increase in solubility is enhanced towards alkaline pH, reaching up about 25% at pH 9.

Many authors have studied the relative solubility of hemp protein isolates (HPI) produced by alkaline solubilization and isoelectric precipitation (**Figure 8C**) (Dapčević-Hadnađev et al., 2019; Hadnađev et al., 2018; Kim & Lee, 2011a; Malomo & Aluko, 2015b; Malomo et al., 2014; Tang et al., 2006; Q. Wang et al., 2018). Although the relative solubility values for a given pH varied considerably from one author to another, the profiles of solubility with pH were generally similar. The relative solubility is minimum at the isoelectric point of hemp globulins, around pH 5. It increases towards the alkaline pH to reach a maximum at pH 12. It seems that the maximum relative solubility is almost reached for pH 10. Starting from pH 5, relative solubility increases with decreasing pH up to pH 2. The maximum solubility encountered at acidic pH appears to be 2 times lower as the maximum solubility encountered at alkaline pH.

Malomo & Aluko (2015a), studied the relative solubility of hemp globulins and albumins separately from pH 3 to 9 (**Figure 8B**). Hemp globulins presented the same solubility profile as HPI (Malomo & Aluko, 2015b). This is consistent with the fact that HPI is obtained after selective isoelectric precipitation of globulins. The solubility profile of hemp albumins was totally different since their relative solubility tended to increase continuously with pH. The albumins showed significantly higher relative solubility values within the above pH range, varying from about 50 to 90%.



**Figure 8: Solubility of hemp proteins as a function of pH.** (A) Real nitrogen solubility of hemp protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (HPI), hemp protein hydrolysates (HPH), chemically modified HPI (succinylated or acetylated) and soy protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (SPI). (B) Relative nitrogen solubility of isolated hemp globulins (Glb) and albumins (Alb). (C) Relative nitrogen solubility of hemp protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (HPI) and hemp press cake. Results from a: Yin et al. (2008); b: Yin et al. (2009); c: Karki et al. (2009); d: Malomo & Aluko (2015a); e: Malomo et al. (2014); f: Malomo & Aluko (2015b); g: Kim & Lee (2011a); h: Hadnadev et al (2018); i: Dapčević-Hadnadev et al. (2019); j: Tang et al. (2006); k: Q. Wang et al. (2018).

Yin et al. (2008; 2009), studied the real nitrogen solubility of HPI from pH 2 to 10 (**Figure 8A**). They observed the same profile of solubility vs pH as the previous authors for relative solubility. Thus, the solubility was minimal at pH 5 close to 0%, then increased with pH to reach the maximum value at pH 10 with about 60% of soluble protein. Solubility increased also from pH 5 to 2 up to about 45%. The effect of partial HPI hydrolysis by trypsin on the real protein solubility is shown in **Figure 8A** (Yin et al., 2008). The hemp protein hydrolysates (HPH) having 2.3 to 6.7% degree of hydrolysis, generally showed the same solubility profile with pH as the initial HPI. On the other hand, the HPH solubility values were significantly higher within the entire pH range. The gain was 2 to 2.5 times at pH 3, more than 15 times at pH 5, about 3

times at pH 7 and about 1.5 times at pH 10. The authors also studied the impact of acetylation and succinylation of hemp proteins on HPI real solubility as reported in **Figure 8A** (Yin et al., 2009). Both treatments did not change the profile of protein solubility curves. However, the chemical modifications of hemp proteins decreased their solubility at pH 2 and 3, but increased it from pH 6 to 10. Succinylation resulted in a more pronounced solubility increase from pH 6 to 10 than acetylation. The solubility of the succinylated hemp proteins reached a maximum value at pH 7 and remained constant up to pH 10, with similar values to those obtained for HPH in the same pH range (Yin et al. 2008).

In comparison, soy protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (SPI) have a similar U-shaped solubility profile as that of HPI, with a minimum of solubility towards pH 4-5 (Karki et al., 2009) (**Figure 8A**). Nevertheless, the actual solubility values are much higher for SPI than for HPI at acidic and basic pH. The solubility values of SPI and HPI are 60 and 30% at pH 3, 70 and 30% at pH 7 and 80 and 50% at pH 9, respectively.

The surface hydrophilic–hydrophobic balance of proteins and their ability to interact with water molecules are mainly related to their composition in amino acids and the net charge of these macromolecules. Therefore, the measure of surface hydrophobicity and net charge of proteins provide useful information regarding solubility behaviour of these compounds. The surface hydrophobicity of proteins can be measured through a fluorescent probe, mainly 8-anilino-1-naphthalene sulfonate or ANS, which fluorescence is amplified by binding to the hydrophobic pockets at the surface of the protein particle. The surface hydrophobicity values ( $H_o$ ) are calculated by the slope of the fluorescence intensity as a function of protein concentration in mg/ml.

Tang et al. (2009), Q. Wang et al. (2018) and X.-S. Wang et al. (2009), reported  $H_o$  values for hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI) at pH 7 of 75, 89 and 179 respectively. These values were lower or close to the  $H_o$  values of 155 and 163 reported for soy protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (SPI) by Jiang, Chen, & Xiong (2009) and Sorgentini & Wagner (1999), respectively. Teh, Bekhit, Carne, & Birch (2016), measured the  $H_o$  values at neutral pH for acid soluble and alkali soluble hemp globulins respectively. Similar surface hydrophobicity values ( $H_o=75$ ) were obtained for these protein fractions. The same authors measured the zeta potential of hemp proteins at pH 7 from the same protein fractions. The 2 protein fractions had the same zeta potential value measured at -9.2 mV, significantly lower than those reported elsewhere for SPI at pH 7. Indeed Lam, Shen, Paulsen,

& Corredig (2007) and Liu & Tang (2015), reported zeta potential values of -25 mV and -33 mV for SPI, respectively. From these results, it can be assumed that the aqueous suspensions of hemp proteins are less stable than their soy counterparts at neutral pH.

#### **I.2.1.3.1.5.2. Water Holding Capacity and Oil Holding Capacity**

Water holding capacity (WHC) and oil holding capacity (OHC) are important properties for food products where soft texture is sought and limited water or lipid release during and after cooking are expected. Water or oil retention capacity of oilcakes are generally little affected by their delipidation. Hemp, flax and canola meals presented similar OHC values (Teh, Bekhit, Carne, & Birch, 2013). Hemp cake has WHC values close to those of canola and higher than those of flax. In addition, hemp cake had slightly higher WHC value and slightly lower OHC value as those of hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI) respectively (Malomo et al., 2014). The WHC and OHC values obtained for acid soluble hemp globulins and alkali soluble hemp globulins were slightly higher for the later ones (Teh et al., 2013). OHC and WHC values for the acid or alkali soluble globulins are close to those of canola proteins, and higher than those of flax ones.

The hemp protein isolates obtained by micellization (HMI) by Hadnadev et al. (2018), presented the same OHC value as those produced by isoelectric precipitation (HPI), whereas the WHC value for HMI was 2 times lower compared to HPI. In the previous work of Malomo & Aluko (2015b), the authors showed that hemp protein concentrates obtained by enzymatic digestion of hemp cake by hemicellulase, cellulase, xylanase and phytase (HEC) and successive ultrafiltration, led to an OHC value similar to that of HPI and a slightly higher WHC value. Yin et al. (2008), observed that the digestion of HPI by trypsin resulted in a 3 to 4-fold decrease in WHC. OHC was also decreased by protein hydrolysis, except at the highest hydrolysis degree close to 7% where it was similar to that of HPI. A heat treatment at 95 °C for 10 min applied by the same authors to HPI did not affect the WHC, but slightly decreased OHC of the isolates.

#### **I.2.1.3.1.5.3. Gelation**

A protein gel is a continuous macromolecular network entrapping an aqueous phase, formed under physical stress, mainly by heating, or by applying specific physicochemical conditions from stable protein suspensions. Scientific data on the gelation properties of hemp proteins are scarce and only concern thermal gelation (**Table 5**).

Hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI), mainly containing globulins, begin to denature at 86 °C (Ton: onset temperature) as observed by differential scanning calorimetry (DSC) and have a thermo-denaturation temperature (Td) peak at 94 °C (Table 4). The average enthalpy of denaturation ( $\Delta H$ ) of this protein fraction was estimated at 11 J/g of protein (Hadnađev et al., 2018; Tang et al., 2006; X.-S. Wang et al., 2008; Yin et al., 2008). This denaturation could be predominantly ascribed to 11S globulins. In fact, 7S hemp proteins have been reported to present no thermal denaturation peak during calorimetry measurement (X.-S. Wang et al., 2008). Tang et al. (2006), indicated that the degree of ordered structure of 11S edestin was related to both hydrophobic interactions and disulfide bridges as revealed by the decrease in  $\Delta H$  in presence of sodium dodecyl sulfate and dithiothreitol respectively. The presence of disulfide bridges seems to play an effective role in the thermal stability of hemp 11S globulins since a slight decrease in Ton and Td values was also noted in the presence of dithiothreitol.

**Table 4: Differential scanning calorimetry data for hemp proteins and other plant protein sources.** Td: denaturation temperature,  $\Delta H$ : denaturation enthalpy, Ton: onset temperature, HPI: hemp protein isolate obtained by isoelectric precipitation, HMI: hemp protein isolate obtained by micellization. a: Tang et al. (2006); b: X.-S. Wang et al. (2008); c: Hadnađev et al. (2018); d: Yin et al. (2008); e: Salgado et al. (2011); f: He et al. (2013); g: Colombo, Ribotta, & León (2010); h: Shen & Tang (2012); i: Liang & Tang (2013); j: Paredes-López, Ordorica-Falomir, & Olivares-Vázquez (1991).

	Hemp				Sun-flower <sup>e</sup>	Rape-seed <sup>f</sup>	Peanut <sup>g</sup>	Soy <sup>h</sup>	Pea <sup>i</sup>	Chick-pea <sup>j</sup>
	HPI <sup>abcd</sup>	HMI <sup>c</sup>	11S <sup>b</sup>	7S <sup>b</sup>	pI protein isolates					
<b>Ton</b> (°C)	86		86	None	99	98	104	90	82	88
<b>Td</b> (°C)	94	96	92	None	8	10	12	6	7	4
<b><math>\Delta H</math></b> (J/g)	11	22	7	None						

Hadnađev et al. (2018), compared DSC data between hemp protein isolates obtained by isoelectric precipitation (HPI) and micellization (HMI) respectively. These authors found that micellization extraction led to increased Td and  $\Delta H$  values. This result revealed the production of HMI with higher thermal stability, suggesting higher level of structural organization and a more preserved native state of proteins compared to HPI.

Otherwise Yin et al. (2008), indicated that the denaturation enthalpy values for HPI decreased in proportion to their degree of hydrolysis by trypsin, traducing a decrease in the extent of ordered structures within hemp polypeptides.

In addition, the HPI had thermo-denaturation temperature and denaturation enthalpy of the same order of magnitude as those of other oilseed protein isolates, prepared from sunflower

seed, rapeseed or peanut, having Td and  $\Delta H$  values ranging from 98 to 104 °C and 8 to 12 J/g of protein respectively (Colombo et al., 2010; He et al., 2013; Salgado et al., 2011). Legume proteins extracted from soybeans, peas or chickpeas, had slightly lower Td and  $\Delta H$  values than those of HPI, the former ranging from 82 to 99 °C and between 4 and 7 J/g of protein respectively (Liang & Tang, 2013; Paredes-López et al., 1991; Shen & Tang, 2012).

According to Malomo et al. (2014), hemp meal had better gelling properties than hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI), probably due to the contribution of sugars and polysaccharides. The minimum gelation concentrations of hemp meal and HPI were measured at 12 and 22% (w/w) respectively. Dapčević-Hadnadev, Hadnadev, Lazaridou, Moschakis, & Biliaderis (2018), investigated also the gelling properties of hemp protein isolates obtained by alkaline extraction / isoelectric precipitation (HPI) or by micellization (HMI). The gels were formed from 30% (w/w) protein suspension at pH 7, heated at 120 °C for 15 min. For the 2 types of isolates, true gels were formed with very close gel forces evaluated by dynamic rheology. However, in comparison to HMI gels, the HPI gels displayed a slightly higher elastic modulus and a higher breakdown limit during amplitude sweep test, revealing the formation of stronger and more cohesive HPI-based gels. The microstructures of the 2 gel types were very different. From confocal microscopic observations, the HPI gels showed extended interconnections between large protein granules forming a low porous network, while HMI formed a filamentous protein network with large pores. The addition of NaCl up to 300 mM had little impact on the structure of the HPI gels, while it resulted in a pore size increase for HMI gels. Finally, the two types of gel had a yellowish-red color probably due to the co-extraction and polymerization of phenolic compounds.

#### **I.2.1.3.1.5.4. Emulsion**

Proteins are commonly used to stabilize oil in water emulsion in food products. Emulsions are thermodynamically unstable because they increase the interfacial surface and consequently the free energy of the system. The presence of proteins as emulsifiers, able to adsorb at the oil/water interfaces, helps to reduce interfacial tension and contributes to the stability of the emulsion. The ability of protein to form emulsion is then generally evaluated through particle size measurement or emulsifying activity index (EAI) determination (**Table 5**). Over time, oil in water emulsion is subject to flocculation, coalescence and creaming phenomena, since the system tends to minimize its free energy. Flocculation is the reversible or irreversible aggregation of droplets. Coalescence occurs when the interfacial film is broken, resulting in the

irreversible fusion of dispersed droplets into larger ones. Finally, creaming is the migration of oily particles to the surface against gravity due to the difference in density between the two phases. The creaming kinetics is slowed down by the droplet size reduction and the viscosity increase of the continuous phase. Particle size change or phase separation in emulsion are evaluated as flocculation index (FI), coalescence index (CI) creaming stability (CS) and emulsion stability index (ESI).

In the literature, emulsifying properties of hemp proteins have been evaluated from hemp meals, hemp protein isolates and their separated fractions, i.e. globulins and albumins (**Table 5**).

### **Hemp meal**

Teh et al. (2013), have studied the emulsifying properties of hemp cakes at pH 7 compared to those obtained from rapeseed with or without delipidation. According to these authors, raw hemp meal has a lower emulsifying activity than canola meal. On the other hand, the delipidation of hemp cake increased its emulsifying activity, becoming higher than that of delipidated canola meal. Emulsions prepared from raw hemp cake were found more stable than those obtained from delipidated meal. Emulsion stability was higher for raw hemp meal than for raw canola meal. However, more stable emulsions were observed for delipidated canola meal than for their hemp counterpart.

### **Hemp protein isolate**

Malomo et al. (2014), compared the emulsifying properties of hemp cake and hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI) in the range of pH 3 to 9. Emulsions were prepared from 1 to 5% protein suspensions with a 83/17 protein solution to oil ratio. The authors found that the emulsifying properties of hemp meal were not significantly affected by pH and meal concentration. The droplet size measured by granulometry as the Sauter mean diameter ( $d_{32}$ ) in the HPI emulsions was impacted by the pH, with some differences regarding the protein concentration used. In most cases,  $d_{32}$  values for HPI-based emulsions were higher than those prepared from hemp cake, except at 5% protein at pH 5, 7 and 9, where droplet size was slightly lower for the former emulsions. No difference in stability was observed between hemp cake-based and HPI-based emulsions.

**Table 5: Summary of the functional properties studied in the scientific literature.** HPM: Hemp protein meal, HPI: Hemp protein isolate obtained by isoelectric precipitation. HEC: Hemp protein concentrate obtained by enzymatic digestion of press-cake by cellulase, hemicellulase, xylanase and phytase. SPI: Soy protein isolate obtained by isoelectric precipitation. HMI: Hemp isolate obtained by micellization. HPH: Hemp protein hydrolysates. Glb: Hemp globulins. Alb: Hemp albumins. OHC: Oil holding capacity. WHC: Water holding capacity. LGC: Least gelation concentration. ES(I): Emulsifying stability (index). EA(I): Emulsifying activity (index). CS: Creaming stability. FI: Flocculation index. CI: Coalescence index. FC: Foaming capacity. FS: Foaming stability.

Functionality	Protein material	Operating conditions	Performed analyses	References
Water or oil holding capacity	HPM+HPI		OHC, WHC	Malomo et al. (2014)
	HPM+HPI+HEC		OHC, WHC	Malomo and Aluko (2015b)
	hemp, canola or flax : raw or delipidated cake, alkali or acid soluble globulins		OHC, WHC	Teh et al. (2013)
	HPI+SPI		OHC, WHC	Tang et al. (2006)
	HPI+HMI		OHC, WHC	Hadnadev et al. (2018)
	HPI+HPI heated 95°C 10 min+HPH by trypsin		OHC, WHC	Yin et al. (2008)
Gelling	HPM+HPI	pH 7; 2 to 20%; 95°C 1h	LGC	Malomo et al. (2014)
	HPI+HMI	pH 7; 30% protein suspension with 0, 50 or 300 mM NaCl; 120°C 15 min	confocal microscopy, rheology	Dapčević-Hadnadev et al. (2018)
Emulsifying	HPM+HPI	pH 3, 5, 7 or 9; 1, 2.5 or 5% protein suspension with 83/17 protein solution to oil ratio	droplet size, ES	Malomo et al. (2014)
	HPM+HPI+HEC	pH 3, 5, 7 or 9; 1, 2.5 or 5% protein suspension with 83/17 protein solution to oil ratio	droplet size, ES	Malomo and Aluko (2015b)
	hemp, canola or flax : raw or delipidated cake, alkali or acid soluble globulins	pH 7; 2% protein suspension with 50/50 protein solution to oil ratio	EA, droplet size, ES, CS	Teh et al. (2013)
	HPI+SPI	pH 3 to 8; 0.2% protein suspension with 75/25 protein solution to oil ratio	EAI, ESI	Tang et al. (2006)
	Glb+Alb	pH 3, 5, 7 or 9; 1, 2.5 or 5% protein suspension with 83/17 protein solution to oil ratio	droplet size, ES	Malomo and Aluko (2015a)
	HPI+HMI	pH 3; 0.25, 0.75 or 1.5% protein suspension with 90/10 protein solution to oil ratio	droplet size, FI, CI, CS, confocal microscopy, rheology	Dapčević-Hadnadev et al. (2019)
	HPI+HPI shifted at pH 12 for 5 min at 20, 30, 40, 50 or 60°C	pH 7; 2% protein suspension with 75/25 protein solution to oil ratio	EAI, ES, confocal microscopy	Wang et al. (2018)
	HPI+HPI heated 95°C 10 min+HPH by trypsin	pH 3, 5, 7 or 9; 0.2% protein suspension with 75/25 protein solution to oil ratio	EAI, ESI	Yin et al. (2008)
Foaming	HPM+HPI	pH 3, 5, 7 or 9; 2, 4 or 6% protein suspension	FC, FS	Malomo et al. (2014)
	HPM+HPI+HEC	pH 3, 5, 7 or 9; 2, 4 or 6% protein suspension	FC, FS	Malomo and Aluko (2015b)
	Glb+Alb	pH 3, 5, 7 or 9; 2, 4 or 6% protein suspension	FC, FS	Malomo and Aluko (2015a)
	HPI+HPI heated 95°C 10 min+HPH by trypsin	pH 7; 1% protein suspension	FC, FS	Yin et al. (2008)

Tang et al. (2006), investigated the emulsifying properties of HPI and soy protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (SPI) from pH 3 to 8. Whatever the pH, the emulsifying activity (EAI) and emulsion stability (ESI) indexes were lower for HPI-based emulsions than for SPI-based emulsions. The EAI of both types of emulsion were maximum at pH 3, minimum around the isoelectric point, and relatively constant from pH 5 to 8. The ESI measured for the SPI-based emulsions followed the same profile as EAI with pH, whereas the ESI has been relatively constant for HPI-based emulsions in the same pH range.

Some authors have applied different pretreatments to HPI to improve their emulsifying properties. Yin et al. (2008), produced hydrolysates from HPI digestion by trypsin. The hydrolysates led to lower EAI than HPI at pH 3, 5, 7 and 9. The ESI was increased by the hydrolysis treatment for emulsions at pH 3, 5 and 9, but decreased for emulsions at pH 7. EAI and ESI of HPI-based emulsions were the highest at pH 9 and pH 7 respectively and then decreased in the following order: pH 7 > pH 3 > pH 5 and pH 9 > pH 3 > pH 5 respectively. The same authors have demonstrated that a heat treatment at 95 °C for 10 min applied to HPI allowed to improve the emulsifying activity at all pH except at pH 5. The heat treatment only led to improve emulsion stability at pH 7 and impaired it at pH 5.

Recently Q. Wang et al. (2018), showed that mild heat treatment (30-60 °C) applied to HPI suspensions in strong alkaline conditions at pH 12 enhanced the emulsifying properties of hemp proteins at pH 7, by decreasing droplet size and improving emulsions stability. The efficiency of the pretreatment was reinforced with the increase in temperature.

Yin et al. (2009), observed that both preliminary acetylation and succinylation applied to HPI improved the emulsifying activity of the modified hemp proteins at pH 7. In addition, the ESI for HPI appeared slightly increased after acetylation and decreased after succinylation.

Other authors have compared the emulsifying properties of hemp protein isolates obtained by different extraction processes. Recently, Dapčević-Hadnađev et al. (2019), compared the properties of emulsions prepared at pH 3 from hemp protein isolates obtained by isoelectric precipitation (HPI) or by micellization (HMI). The emulsions with a 90/10 protein solution to oil ratio presented the lowest oil droplet size for HMI regardless protein concentration varying from 0.25 to 1.25%. Droplet size decreased as a function of protein concentration in the case of HPI-based emulsions. The flocculation index (FI) was the lowest for HMI and unaffected by protein concentration. The coalescence index (CI) decreased with increased protein

concentration for both types of hemp protein isolate. CI values were relatively close between HPI- and HMI-based emulsions. Earlier, Malomo & Aluko (2015b), have compared the emulsifying properties of HPI-type proteins with hemp protein isolates obtained after enzymatic digestion of cake by cellulase, hemicellulase, phytase and xylanase, and successive ultrafiltration (HEC). The emulsions were prepared at pH 3, 5, 7 or 9 from 2, 4 or 6% protein suspension with a 83/17 protein solution to oil ratio. In all conditions, the droplet size of emulsions prepared with HEC was higher than those prepared with HPI. The stability of the HEC-based emulsions was similar to lower depending on pH and protein concentration in comparison to HPI-based emulsions.

### **Globulins and albumins**

Malomo & Aluko (2015a), compared the emulsifying properties of isolated hemp globulins and albumins at pH 3, 5, 7 and 9 for 1, 2.5 or 5% protein suspensions applying a 83/17 protein solution to oil ratio. Overall within experimental conditions, droplet size and emulsion stability were relatively similar between globulins and albumins except under a few conditions. At 5% protein concentration and at pH 7 and 9, the globulins led to oil droplets of smaller diameter in emulsion than those obtained from albumins. At pH 7 and 1% protein concentration, the emulsion stability was significantly lower with globulins than with albumins.

Teh et al. (2013), have also compared the properties of oil in water emulsions based on alkali soluble hemp globulins or acid soluble ones respectively, to those of emulsions prepared from other hemp or oilseed protein materials. These authors reported similar emulsifying activity and emulsion stability between alkali and acid soluble globulins-based systems at pH 7. Moreover, the emulsifying activity of delipidated hemp cake was higher than that of hemp alkali and acid soluble globulins, itself higher than raw hemp cake. Nevertheless, the raw hemp cake led to more stable emulsions than those formed with delipidated hemp cake and even more than those prepared from acid or alkali soluble hemp globulins. In addition, the emulsifying activity of alkali and acid soluble hemp globulins were similar to their rapeseed counterparts, whereas the emulsifying stability was significantly higher for rapeseed protein-based emulsions.

#### **I.2.1.3.1.5.5. Foam**

Food foam results from the stable dispersion of air bubbles in a liquid phase. Generally, protein suspensions have good foamability. The efficiency of proteins to form foam structure is

evaluated by foaming capacity (FC) and foaming stability (FS) tests, based on the determination of the foam volume initially generated in the system and its conservation with time respectively.

Several authors have evaluated the foaming properties of hemp protein materials (**Table 5**). Malomo et al. (2014), reported that hemp cakes had lower foaming properties (FC and FS) evaluated at pH 3, 5, 7 and 9 and at 2, 4 or 6% protein concentration than hemp protein isolate produced by isoelectric precipitation (HPI). The FC of the hemp cake increased slightly with pH, whereas a maximum and a minimum were assessed at pH 3 and 5 respectively for HPI. The FS value for HPI was measured close to 100% and was affected nor by pH, nor by protein concentration except at 6% protein concentration-pH 5 condition, where it decreased. The FS value was lower for hemp cakes and depended on pH and protein concentration.

Malomo & Aluko (2015b), compared foaming ability of the same hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI) or enzymatic digestion of hemp meal (HEC), as those used to evaluate emulsifying properties as reported in section **I.2.1.3.1.5.4**. Compared to HPI, HEC led to significantly higher FC values of about 3-fold within experimental pH (3-9) and protein concentration (2-6%) ranges. Foams formed from HEC at 2 or 4% protein concentration were generally less stable than those formed from HPI. At 6% protein concentration, similar values of FS were measured for HPI- and HEC-based foams except at pH 5 where the FS value was significantly higher for HEC-based foam.

The enzymatic digestion of HPI by trypsin degraded its foaming properties (FC and FS) at pH 7. However, heat treatment of HPI at 95 °C for 10 min increased FS and did not impact FC (Yin et al., 2008).

### **I.2.1.3.1.6. Biological Activity**

#### **I.2.1.3.1.6.1. Antioxidant Property**

According to Pojić et al. (2014), hemp cakes have antioxidant activity evaluated by DDPH ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) free radical scavenging method, mainly ascribed to the presence of phenolic compounds. Kim & Lee (2011a), found that hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI) had also antioxidant activity. The antioxidant activity of HPI was proportional to protein concentration, with DDPH activity values ranging from 20% at 0.5 mg protein/ml to 80% at 3 mg protein/ml. This antioxidant activity would be partly due to the 11S edestins. Indeed, Kim & Lee (2011b), reported DDPH activity values of edestin ranging from 1% at 0.5 mg protein / ml, to over 20% at 3.5 mg protein/ml.

HPI hydrolysates (HPH) prepared by pancreatin and pepsin had antioxidant activity values measured by the DDPH method, ranging from about 15 to 65%, and metal chelation rates ranging from about 45 to 95% depending on the peptide composition (Girgih et al., 2014). Girgih et al. (2010), separated similar HPH into several fractions of <1, 1-3, 3-5 and 5-10 kDa molecular weight. HPH and all peptide fractions had antioxidant activity according to DDPH measurements and displayed effective hydroxyl radical scavenging, metal chelation, ferric reduction and inhibition of linoleic acid oxidation. HPH had the highest metal chelation activity, whereas small and large size peptide fractions had the highest DDPH antioxidant activity and ferric reduction ability respectively. All peptide fractions, regardless of molecular weight, displayed higher hydroxyl radical scavenging activity than HPH. Elsewhere, Girgih, Udenigwe, & Aluko (2013), demonstrated that oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and DDPH antioxidant activity of peptides tended to increase with their content in hydrophobic amino acids, whereas hydroxyl radical scavenging decreased.

Tang et al. (2009), generated different hemp protein hydrolysates (HPH) from enzymatic digestions with alkalase, Flavourzyme®, Neutrane®, pepsin, Protamex® or trypsin. By evaluating DDPH antioxidant activity, Fe<sup>2+</sup> chelation and reducing power for all hydrolysates, the authors highlighted more or less antioxidant efficiency depending on the enzymes used. X.-S. Wang et al. (2009), also revealed that HPH produced by Neutrane® had significant antioxidant activity determined from similar analytical characterizations.

Both alkali and acid soluble hemp globulins have antioxidant properties (Teh et al., 2016). According to the last authors, the ORAC activity of alkali and acid soluble hemp globulins remained unchanged after their hydrolysis by different proteases, namely AFP 4000 (AFP), HT proteolytic concentrate (HT) or protease G (ProG) from Enzyme Solutions (Australia), actinidin or zingibain. In contrast, DDPH antioxidant activities could increase nearly 5-fold after proteolysis. Proteolysis by HT led to hydrolysates with the highest DDPH antioxidant activity rate reaching up to 73%.

#### **I.2.1.3.1.6.2. Renal Disease Prevention**

Aukema et al. (2011), have studied the impact of the diet of rats having renal polycystic insufficiency, on the symptoms of this pathology including cardiovascular hypertrophy. The rats had different diets based on various protein isolates from hemp (HPI), soybean (SPI) or pea (PPI), or casein (CPI), the last chosen as a reference. SPI and HPI had the same effects for reducing the symptoms of the pathology. Indeed, in comparison with the CPI-based diet, a diet

based on HPI or SPI improved the growth of rats, caused a decrease in kidney weight and liquid content, a reduction in the volume of cysts and fibrosis, and led to healthy levels of creatinine and chemokine receptors 2 (CCR2), and heart weights of healthy subjects. On the other hand, the diet based on PPI, compared to that based on CPI, only improved the growth of rats and led to lower creatinine and CRR2 levels. It did not change the volume of fibrosis, and increased kidney weight, renal liquid content and cyst volume.

### **I.2.1.3.1.6.3. Antihypertensive Activity**

Girgih, Alashi, et al. (2013), investigated the effect of diets based on hemp meal protein hydrolysates produced by pepsin and pancreatin (HPH), or hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI), on rats having spontaneous hypertension. The reference diet was based on casein protein isolates. The HPH- or HPI-based diet reduced systolic blood pressure, through mainly decreases in angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and quantitative level of plasma renin. ACE is an enzyme that converts angiotensin 1 to angiotensin 2, which has a strong vasoconstrictor effect. These positive effects were more pronounced for the HPH-based diet than for the HPI-based diet and have been observed during tests in the prevention or treatment phase of hypertension. Contrariwise Girgih, Udenigwe, Li, Adebisi, & Aluko (2011), found an increase in systolic blood pressure following hemp-based feeding of rats having spontaneous hypertension. This difference may be due to the different amounts of hemp protein isolates ingested by the rats.

Hemp protein hydrolysates produced by pepsin and pancreatin (HPH) also exhibited antihypertensive abilities, by reducing ACE and renin activity, and systolic blood pressure (Girgih et al., 2014). The involved peptides enabling simultaneously the highest antioxidant (DDPH test), metal chelation and ACE inhibition activities, and the highest systemic blood pressure reduction, have been identified: Proline-Serine-Leucine-Proline-Alanine and Tryptophan-Valine-Tyrosine-Tyrosine. The peptides having the highest combined ACE and renin inhibition rates, and the highest reduction in systolic blood pressure were: Serine-Valine-Tyrosine-Threonine and Isoleucine-Proline-Alanine-Glycine-Valine. According to Girgih et al., (2011), peptides having <1 kDa and 1-3 kDa molecular weights had higher ACE and renin inhibitions than overall HPH. On the other hand, the HPH potential to reduce the systolic blood pressure was 2 times higher than that of <1 kDa and 1-3 kDa peptide fractions.

Orio et al. (2017), performed acid hydrolysis of HPI at 110 °C. The authors obtained protein hydrolysates inhibiting almost 45% of ACE activity and isolated 3 peptides exhibiting ACE

inhibition rates higher than 93%: Glycine-Valine-Leucine-Tyrosine, Leucine-Glycine-Valine and Arginine-Valine-Arginine. These 3 peptides were originated from the hydrolysis of the acid subunit of edestin 1 and/or edestin 2.

According to Teh et al. (2016), alkali and acid soluble hemp globulins have limited ACE inhibition properties. These properties can be significantly improved, by nearly 30 times, by the production of enzymatic hydrolysates with AFP 4000 (AFP), HT proteolytic concentrate (HT) or protease G (ProG) (Enzyme Solutions, Australia), actinidin or zingibain. HT hydrolysates showed the highest ACE inhibition rates reaching up to about 77% inhibition.

#### **I.2.1.3.1.6.4. Hyperglycemia and Inhibition of $\alpha$ -Glucosidase**

$\alpha$ -glucosidase is an enzyme that hydrolyses starch and disaccharides to glucose. Enzymatic hydrolysates (HPH) of hemp protein isolates obtained by isoelectric point precipitation (HPI) have been reported to have  $\alpha$ -glucosidase inhibition property of interest for the treatment of patients having hyperglycemic diseases (Ren et al., 2016). The last authors found that the HPH obtained by alkalase treatment had much higher  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, reaching almost 60% inhibition rate, than those obtained after enzymatic digestion of HPI with Flavourzyme, Protamex®, neutrase, trypsin or papain, having from 5 to 22% inhibition. From about 10% hydrolysis, the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase increased in proportion to the increases in hemp protein concentration from 0.1 to 100 mg/ml and hydrolysis degree up to 27%. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase was mainly ascribed to 2 peptides: Leucine-Arginine and Proline-Leucine-Methionine-Leucine-Proline.

#### **I.2.1.3.1.6.5. Degenerative Brain Disease and Inhibition of Acetylcholinesterase**

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme that converts the neurotransmitter acetylcholine (ACh) into inactive metabolites, i.e. choline and acetate. With aging and dietary changes of humans, less acetylcholine is synthesized, while AChE continues normal activity. Thus, a clear decrease in ACh leads to dysfunctions of the central nervous system, which can in the long run contribute to memory disorders such as dementia or Alzheimer's disease. Malomo & Aluko (2016), showed that hemp protein hydrolysates (HPH) from hemp protein isolate obtained by isoelectric point precipitation (HPI) had AChE inhibition activities that would prevent progression to such troubles. This inhibition did not seem directly related to the degree of hydrolysis of hemp proteins. HPH obtained with 1% pepsin had the greatest AChE inhibition effect, compared with those obtained at other enzyme concentrations varying from 0.5% to 4%

or with other types of enzyme such as alkalase, papain, pepsin + pancreatin, thermoase or Flavourzyme®. The authors hypothesized that the higher inhibition for this condition could result from increased synergistic effects between peptides of a wider size range present in the sample.

#### **I.2.1.4. Conclusion**

Hemp seeds are a good source of plant proteins with a protein content comparable to that of most of legume seeds. The hemp proteins have interesting nutritional value since they are rich in essential amino acids and were demonstrated highly digestible. They present also interesting techno-functional abilities such as emulsifying, foaming and gelling properties that could be exploited in the food industry. In addition, they have revealed a wide range of biological activities, enhanced after partial hydrolysis by various proteases. The most limiting factors in the valorization of hemp proteins in food industry seemed to be their low extraction yield and low solubility.

Previous works have shown that some post-extraction treatments of hemp proteins improved their solubility in the food pH range. However, few have evaluated the impact of these treatments on the general functional properties of hemp proteins.

The challenges for developing hemp protein ingredients are to obtain high extraction yields and highly soluble proteins, while maintaining their nutritional and functional properties. To meet the issue, further studies exploring extraction conditions and post-extraction functionalization treatments of hemp proteins are required.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté through the “plan d'actions régionales pour l'innovation” (PARI) and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs (n° 2016-9205AAO033S03076 and BG0009561).

## I.2.2. Extra review

### I.2.2.1. Autres composants des graines de chanvre

#### I.2.2.1.1. Huile de chanvre

Les graines de chanvre sont constituées d'environ 30-35% d'huile. Cette huile est composée à 80-95% d'acides gras polyinsaturés et est très riche en acides gras essentiels, à savoir l'acide linoléique, ou oméga-6 (~56% des acides gras), et l'acide alpha linoléique, ou omega-3 (~22% des acides gras). Le ratio oméga 6/oméga 3 est compris entre 2:1 et 3:1, ce qui est considéré comme le ratio optimal pour l'alimentation humaine. Les deux métabolites biologiques qui en sont dérivés, les acide gamma-linoléique et stéaridonique sont également présents à raison de ~4 et ~2% des acides gras, respectivement. L'acide oléique compte pour environ 9% des acides gras totaux. Les acides gras saturés constituent seulement 7-10% des acides gras et sont représentés par l'acide palmitique (~5% des acide gras) et l'acide stéarique (~2% des acides gras) (**Tableau 6**) (Callaway, 2004; Crescente et al., 2018; Osburn, 1992).

**Tableau 6 : Comparaison de composition en acides gras, de plusieurs graines.** Résultats en % massique. AL : acide linoléique. GLA : acide gamma linoléique. SDA : acide stéaridonique. %PUFA : % acides gras polyinsaturés. n6/n3 : ratio oméga 6/oméga 3. Source : repris de l'article de Callaway (2004).

Seed	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	AL <sup>b</sup> acid	GLA	SDA	%PUFA	n6/n3 ratio
Oil hempseed <sup>a</sup>	5	2	9	56	22	4	2	84	2.5
Fiber hempseed	8	3	11	55	21	1	<1	77	2.7
Black currant	7	1	11	48	13	17	3	81	4.1
Flax (linseed)	6	3	15	15	61	0	0	76	0.2
Evening primrose	6	1	8	76	0	9	0	85	>100.0
Sunflower	5	11	22	63	<1	0	0	63	>100.0
Wheat germ	3	17	24	46	5	5	<1	56	10.2
Rape seed	4	<1	60	23	13	0	0	36	1.8
Soy	10	4	23	55	8	0	0	63	6.9
Borage	12	5	17	42	0	24	0	66	>100.0
Corn	12	2	25	60	1	0	0	60	60.0
Olive	15	0	76	8	<1	0	0	8	>100.0

L'huile est le plus communément extraite par pressage mécanique à froid. Cette méthode permet de récupérer 60 à 80% de l'huile de chanvre. Cette dernière s'oxyde cependant rapidement, nécessitant l'ajout d'antioxydants. Un pré-traitement des graines par ultrason avant extraction ou l'utilisation d'enzymes en combinaison à la pression à froid, permettent d'améliorer les rendements d'extraction d'huile sans affecter la composition et l'intégrité de cette dernière (Crescente et al., 2018). Des solvants comme l'éthanol ou l'hexane peuvent être employés mais sont efficaces à haute température (70 °C), ce qui oxyde l'huile. Le CO<sub>2</sub>

supercritique permet une extraction à basse température et une extraction simultanée de composés antioxydants tels que des tocophérols, des phénols ou des phospholipides (Crescente et al., 2018).

### **I.2.2.1.2. Composés phénoliques**

Les graines de chanvre comportent plus de 483 composés phytochimiques, dont certains sont exclusifs à la famille des *Cannabis*. Ces composés incluent des cannabinoïdes, des lignanamides, des flavonoïdes, des stilbénoloïdes, des terpénoïdes, des lignanes et des alcaloïdes (Pihlanto et al., 2017).

La quantité de phénols totaux dans les graines entières est de 96-221 mg/ 100 g et dans l'enveloppe des graines de 197-331 mg/100 g. L'enveloppe des graines est alors plus riche en composés phénoliques que la pulpe (Mattila, Pihlava, et al., 2018). Selon Galasso et al. (2016), la teneur en phénols totaux dans les graines de chanvre varie considérablement entre les variétés. Ces auteurs ont rapporté des taux de phénols totaux étonnement élevés, variant de 588 à 1063 mg/ 100 g en fonction des variétés. Des farines de chanvre ont été rapportées comme ayant 98 mg de phénols totaux/100 g de farine (Mikulec et al., 2019). Hadnadev et al. (2018), ont dosé les phénols totaux dans leur isolat de chanvre obtenu par solubilisation alcaline et précipitation au point isoélectrique et sur leur isolat de chanvre obtenu par micellisation. Ces auteurs ont obtenu respectivement des valeurs de phénols totaux de 139,9 mg/100 g et 101,3 mg/100 g.

Les graines entières de chanvre comportent de la proanthocyanidine, un tanin condensé (105 mg/100 g), et de la lignanamide, une lignane (77 mg/100 g) (Mattila, Pihlava, et al., 2018). Les tourteaux et farines comportent de la catéchine (49,8 mg/100 g), de la N-trans-caffeoyltyramine (15,2 mg/100 g), de l'acide p coumarique (8,4 mg/100 g), de l'acide p hydroxybenzoïque (7,9 mg/100 g), de la cannabisine B (6,5 mg/100 g), de la cyanidine (5,8 mg/100 g), de l'acide férulique (4,7 mg/100 g), de l'acide protocatéchi (2,8-3,5 mg/100 g) et de l'acide gentisique (3,1 mg/100 g) (Multari et al., 2016; Pojić et al., 2014).

### **I.2.2.1.3. Minéraux, vitamines et oligoéléments**

Les graines de chanvre contiennent de nombreux minéraux, vitamines et oligoéléments, contenus dans l'enveloppe et la pulpe. Les graines entières sont riches en phosphore (1160-1170 mg/100 g), potassium (859-921 mg/100 g), magnésium (483-496 mg/100 g) et en calcium (127-145 mg/100 g). Elles contiennent du fer (4,4-14 mg/100 g), du sodium (12 mg/100 g), du manganèse (7-10,5 mg/100 g), du zinc (7 mg/100 g), du cuivre (1,9-2 mg/100 g) et du cadmium

(1,5 µg/100 g). Enfin, elles sont constituées de vitamine E, ou tocophérols (90 mg/100 g), de vitamine B1, ou thiamine (0,4 mg/100 g), et de vitamine B2, ou riboflavine (0,1 mg/100 g) (Callaway, 2004; Mattila, Mäkinen, et al., 2018; Multari et al., 2016).

#### **I.2.2.1.4. Facteurs antinutritionnels**

La présence de composés antinutritionnels a été détectée dans les graines de chanvre. C'est le cas des acides phytiques, des tanins condensés, des inhibiteurs de trypsine, des glycosides cyanogènes et des saponines, dont les niveaux varient considérablement entre les variétés. L'acide phytique est présent en grande concentration dans toutes les variétés, alors que les glycosides cyanogènes se trouvent majoritairement dans les variétés françaises et les tanins condensés, les inhibiteurs de trypsine et les saponines se retrouvent en niveau « acceptable » dans les tourteaux de chanvre. Ces composés antinutritionnels sont principalement localisés dans les cotylédons des graines (Crescente et al., 2018; Galasso et al., 2016; Pihlanto et al., 2017).

Dans les graines entières, des taux d'acides phytiques de 3,5% massique ont été rapportés, alors que dans les tourteaux, des taux d'acides phytiques de 2,3% massique, de glucosinolates de 3,8 µmol/g, de tanins condensés de 23 mg/100 g et d'inhibiteurs de trypsine de 2,9 unité/mg de protéine ont été rapportés (Mattila, Pihlava, et al., 2018; Pojić et al., 2014).

Le caractère allergène des végétaux est souvent associé à l'albumine 2S. Bien qu'une albumine 2S ait été caractérisée dans les protéines de chanvre, aucune étude sur son caractère allergène n'a encore été menée (Aluko, 2017).



# Chapitre II : Stratégie de l'étude



## Stratégie de l'étude

Les objectifs principaux de cette thèse sont de définir et comprendre les conditions d'extraction des protéines de chanvre à partir de tourteau brut et leurs effets sur les propriétés physico-chimiques et émulsifiantes des isolats obtenus. Ces objectifs ont été traités en différentes étapes qui sont dans l'ordre chronologique : l'étude et la définition des conditions d'extraction des protéines de chanvre à partir de tourteau, la réalisation de stocks d'isolats protéiques selon les conditions d'extraction définies, la caractérisation de ces isolats incluant l'étude de leurs propriétés physicochimiques et nutritionnelles puis la caractérisation de leurs propriétés émulsifiantes (**Figure 9**).

Comme constaté dans l'étude bibliographique (**Chapitre I**), contrairement à d'autres oléagineux, peu d'études se sont intéressées à l'impact des conditions d'extraction sur la qualité et la quantité des protéines de chanvre extraites. La première étape s'est alors naturellement orientée vers la définition des conditions d'extraction. Dans ces études, les protéines sont généralement extraites à partir de tourteau délipidé au solvant, par solubilisation alcaline (pH 10), précipitation sélective au point isoélectrique des globulines (pH 5), neutralisation (pH 7) et séchage par lyophilisation. Les isolats protéiques obtenus sous ces conditions d'extraction semblent être peu solubles et par conséquent avoir des propriétés fonctionnelles limitées. Cette faible solubilité serait la conséquence de fortes interactions entre les protéines au point isoélectrique qui en insolubiliserait une partie de manière irréversible. Les quelques études sur les albumines de chanvre semblent montrer qu'elles auraient un potentiel nutritionnel et technologique intéressant. Leur profil en acides aminés est complémentaire aux globulines, particulièrement par des teneurs en lysine et en acides aminés soufrés plus importantes. Elles ont une solubilité relative assez élevée sur l'ensemble des pH. Nous avons alors fait le choix d'une extraction sans précipitation isoélectrique permettant de récupérer simultanément les globulines et les albumines. Nous avons également décidé de ne pas délipider les tourteaux au solvant. Ce choix a été pris pour des considérations économiques et écologiques. Les solvants sont en effet souvent coûteux et polluants. Il a également été pris pour combler le manque de données de la bibliographie sur l'extraction des protéines de chanvre à partir de tourteau brut.

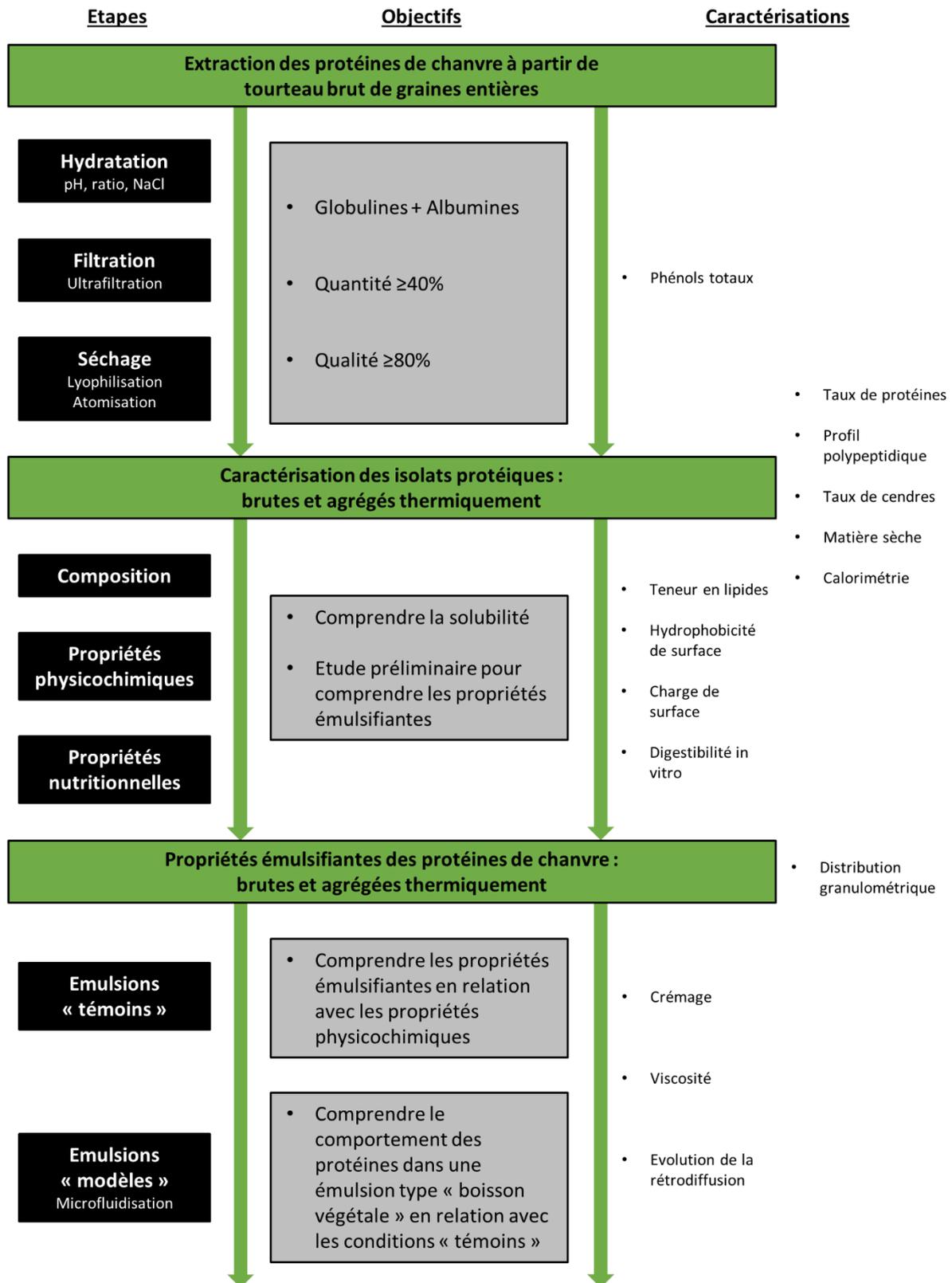


Figure 9 : Représentation schématique de la démarche scientifique.

Les rendements trouvés dans la littérature sur les isolats de protéines de chanvre obtenus par hydratation de 5-7,5% de tourteau ou de graines, à pH 10, à 20-37 °C, précipitation isoélectrique à pH 5, neutralisation à pH 7 et lyophilisation, sont généralement compris entre 35 et 50%. Les pertes protéiques occasionnées par les étapes de filtration et de séchage à l'échelle « laboratoire » sont souvent plus importantes qu'à l'échelle « industrielle ». Nous nous sommes alors concentrés sur le rendement de solubilisation des protéines après l'hydratation du tourteau. L'objectif de ce rendement a été fixé à  $\geq 40\%$ . Les seuls produits protéiques de chanvre trouvés sur le marché sont généralement issus de tourteau broyé, parfois raffiné et ont des teneurs en protéines de  $\sim 50-65\%$ . Ces faibles taux protéiques impliquent la présence d'impuretés telles que des fibres, des phénols, des lipides et d'autres composés antinutritionnels qui peuvent altérer les propriétés techno-fonctionnelles, nutritionnelles et organoleptiques des protéines. Nous nous sommes alors également fixé un objectif de pureté protéique important  $\geq 80\%$ .

La stratégie a été d'étudier l'impact des différents paramètres d'extraction sur la qualité et la quantité de protéines extraites. Trois étapes ont été étudiées : l'hydratation (différents pH (2 à 12), ratios massiques tourteau/liquide (2 à 22%) et différentes forces ioniques (0 à 500 mM de NaCl)), la purification par ultrafiltration et le séchage par lyophilisation ou atomisation. Le choix des conditions d'extraction a été fait en prenant en compte l'applicabilité industrielle. Le but indirect de cette thèse est de pouvoir proposer un procédé qui serait applicable et rentable à l'échelle industrielle et qui permette d'obtenir un produit d'intérêt technologique et nutritionnel. La digestibilité *in vitro* des isolats a été étudiée dans cette optique pour évaluer leur qualité nutritionnelle.

La seconde partie du travail s'est ensuite portée sur la caractérisation des isolats obtenus et sur l'étude de leurs propriétés physicochimiques. Il est connu que des traitements de fonctionnalisation des protéines peuvent améliorer leurs propriétés fonctionnelles. De plus, les produits industriels sont généralement pasteurisés ou stérilisés. Il nous a alors semblé intéressant d'étudier l'impact d'une dénaturation thermique des protéines sur leurs propriétés. La solubilité se présente comme le principal biais à l'utilisation des protéines de chanvre. Elle est de plus le paramètre qui a le plus d'impact sur les propriétés fonctionnelles des protéines. Les données de la littérature sur la solubilité réelle des protéines de chanvre sont très limitées. Le cœur de cette partie a alors été l'étude de la solubilité des protéines et des propriétés qui la définissent. Les caractérisations des isolats ont également été faites dans le but d'aider à la compréhension de leurs propriétés émulsifiantes.

La dernière partie a alors été consacrée à l'étude des propriétés émulsifiantes des protéines de chanvre. Dans un premier temps, nous avons réalisé des émulsions « témoins » avec des ratios de solution protéique/huile de 90/10. La concentration en protéines des solutions protéiques a été de 1%. Ces émulsions ont été réalisées pour étudier et comprendre les propriétés émulsifiantes des protéines de chanvre et pour pouvoir confronter nos données avec celles de la littérature. L'objectif a été d'essayer de comprendre la relation entre les propriétés physicochimiques et les propriétés émulsifiantes. Dans un second temps, nous avons réalisé des émulsions « modèles » se rapprochant des conditions retrouvées dans des laits de soja industriels. Elles ont par conséquent été formées à 3,2% de protéines dénaturées thermiquement pour mimer les effets d'une pasteurisation ou d'une stérilisation et à 2% de lipides. Ces émulsions ont été homogénéisées par microfluidisation à différentes pressions (40, 80 et 120 MPa). L'objectif était de vérifier si les hautes pressions dynamiques pouvaient améliorer les propriétés des émulsions en diminuant la taille des gouttelettes lipidiques ou en modifiant la structure des agrégats protéiques. La finalité a été d'évaluer le comportement des protéines de chanvre dans le genre de produit qui pourrait être proposé aux consommateurs. Le comportement des protéines dans cette matrice a été analysé et comparé à celui des protéines dans les émulsions « témoins ».

# **Chapitre III : Matériel et méthodes**



## III.1. Réactifs chimiques et matières premières

Tous les réactifs utilisés sont de grade équivalent ou supérieur au grade analytique. Sauf mention contraire, ils sont tous de la marque Sigma-Aldrich® (St. Quentin Fallavier, France) ou ThermoFisher (Dardilly, France). L'isolat commercial de protéines de chanvre est le Hemp Pro 70 de la marque Manitoba Harvest® (Manitoba, Canada). Le Miglyol® 812 N (Caprylique/Caprique Triglycéride), est une huile neutre de marque OIO Oleochemicals (Hambourg, Allemagne).

## III.2. Préparation des échantillons

### III.2.1. Préparation des matières premières

Les tourteaux ont été obtenus par pressage mécanique à froid de graines entières de chanvre, par un moulin artisanal local (La Goutte d'Or du Plateau : Varennes-Saint-Sauveur, France). Les tourteaux ont été emballés sous vide et conservés à 4 °C avant utilisation. Les graines ou le tourteau ont été broyés par un mixeur ménager Moulinex® DPA141/350-5004, par impulsions successives pour éviter l'échauffement du produit. Les broyats <1,25 mm obtenus ont été utilisés pour la caractérisation des matières premières et pour les étapes suivantes d'extraction des protéines.

### III.2.2. Extraction des protéines

#### III.2.2.1. Hydratation

Le tourteau broyé a été hydraté dans de l'eau distillée à différents pH (2 à 12), ratios massiques tourteau/eau (2 à 22%) et différentes forces ioniques (0 à 500 mM de NaCl). Les suspensions ont été agitées magnétiquement à température ambiante pendant 30 min, après quoi leur pH a été ajusté avec du NaOH ou de l'HCl  $\leq 2$  M. Les échantillons ont été agités à nouveau pendant 1 h avant un nouvel ajustement du pH, puis laissés sous agitation toute la nuit à température ambiante. Le lendemain, le pH des suspensions a été ajusté avant et après 1 h d'agitation. La centrifugation a été effectuée à 12000 g pendant 20 min à 20 °C et les surnageants ont été récupérés sous forme d'extraits aqueux de protéines de chanvre. Lors de la réalisation des stocks d'isolats (ou pools d'isolats), de par les capacités limitées de la centrifugeuse lors du passage de grands volumes, la centrifugation a été réalisée à 10000 g au lieu de 12000 g.

D'autres échantillons ont été préparés selon les mêmes conditions, avec un ratio massique tourteau/eau distillée de 10% à pH 12. Après centrifugation, les surnageants ont été récupérés

puis leur pH a été abaissé soit à 10, soit à 5. Une nouvelle centrifugation à 12000 g pendant 20 min à température ambiante a été réalisée. Le surnageant résultant de l'abaissement du pH à 10 a été collecté en tant que l'échantillon noté 12>10 par la suite. Le surnageant résultant de l'abaissement du pH à 5 a formé la fraction d'albumines et le culot de globulines a été re-suspendu dans 10 volumes d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 10 et la solution mise en agitation magnétique une nuit à température ambiante. Le lendemain, le pH a été réajusté avant d'effectuer une nouvelle centrifugation identique permettant de récupérer le surnageant de globulines.

Sauf mention contraire, un ratio tourteau/eau distillée de 10%, sans NaCl a été appliqué pour les différentes analyses. Suite aux analyses des différentes conditions d'hydratation (**Chapitre IV.2**), les paramètres définis pour la constitution des pools d'isolats protéiques ont été les suivants : l'hydratation a été fixée à 10% massique de tourteau dans de l'eau distillée à pH 10 ou 12, sans ajout de NaCl. La centrifugation a été réalisée à 10000 g pendant 20 min à température ambiante.

### **III.2.2.2. Dia-filtration par ultrafiltration**

Certains surnageants de protéines solubles ont été dia-filtrés par ultrafiltration. Le pH des surnageants ont été abaissés préalablement à pH 10, avant d'être recentrifugés à 12000 g (ou 10000 g pour la constitution des pools d'isolats) pendant 20 min à température ambiante. L'ultrafiltration a été réalisée sur l'appareil Pellicon® Mini Cassette Holder avec une cassette Pellicon 2 Ultracel (Millipore, Dachstein, France) en cellulose régénérée composite de 0,1 m<sup>2</sup> de surface et de seuil de coupure de 5 kDa ou 10 kDa. La dia-filtration a été pratiquée avec 1 à 5 dia-volumes d'eau distillée à pH 10 en maintenant la pression  $\leq 2$  bars. Le rétentat a été récupéré et ajusté à pH 10 avant d'être centrifugé à 12000 g (ou 10000 g pour la constitution des pools d'isolats), 10 min à température ambiante. Les surnageants ont été conservés à 4 °C avant atomisation ou congelés sur plaques inox avant lyophilisation.

Pour la constitution des pools d'isolats protéiques, les paramètres d'ultrafiltration ont été fixés à un seuil de coupure de 10 kDa, avec 4 dia-volumes d'eau distillée à pH 10. Etant donné la plus faible concentration en azote total du surnageant obtenu à pH 10 que de celui obtenu à pH 12 (0,18g contre 0,38g d'azote total/100 g de surnageant), après épuisement des 4 diavolumes en ultrafiltration, le surnageant à pH 10 a été concentré 2 fois pour atteindre une concentration  $\sim 0,36$ g d'azote total/100 g de surnageant.

### **III.2.2.3. Filtration frontale**

Des essais de filtration frontale ont été réalisés sur les surnageants obtenus à pH 10. L'appareil utilisé a été une pompe-filtre à 7 plaques de la marque Tom Press (Sorèze, France). La filtration a été réalisée avec des filtres de 18, 14-20, 2-7 ou 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  pendant 1 passage ou 5, 10 ou 15 minutes de circulation en boucle.

### **III.2.2.4. Séchage**

Afin d'obtenir des isolats de protéines brutes, les extraits ont été séchés soit par lyophilisation, soit par atomisation sur un atomiseur-sécheur de laboratoire Büchi Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Rungis, France) Les conditions d'atomisation étaient : un débit produit de 375 ml/h, un débit d'aspiration fixé à 100%, une température d'entrée de 110 °C et une température de sortie d'environ 60 °C.

Pour la constitution des pools d'isolats, l'atomisation a été retenue comme seule méthode de séchage.

### III.2.2.5. Récapitulatif des paramètres d'extraction définis pour la constitution des pools d'isolats

Le schéma d'extraction récapitulant les paramètres appliqués pour la constitution des pools d'isolats de protéines brutes est présenté **Figure 10**.

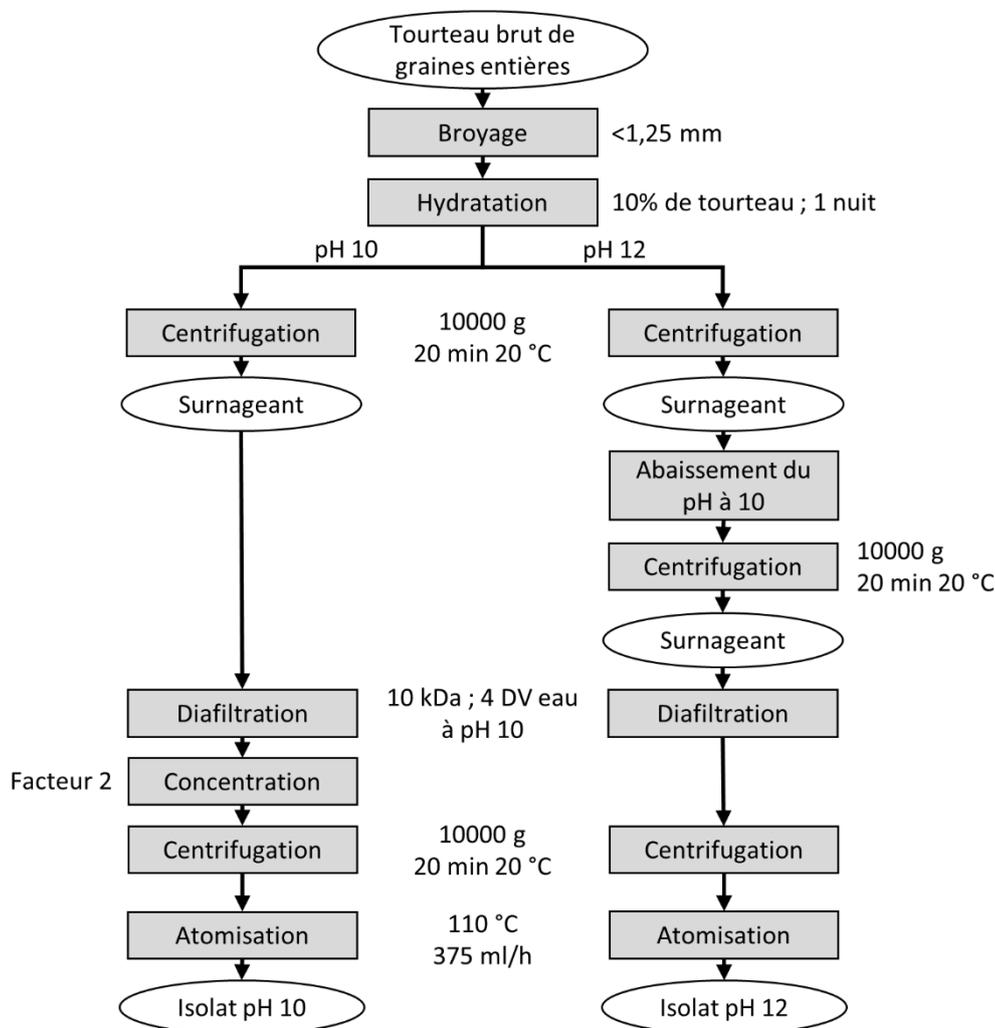


Figure 10 : Schéma récapitulatif du procédé d'extraction appliqué pour la constitution des pools d'isolats. DV, le dia-volume.

### III.2.3. Agrégation thermique

Des agrégats thermiques de protéines de chanvre ont été réalisés selon le protocole de Oliete, Potin, Cases, & Saurel (2018), avec quelques ajustements. Les isolats de protéines de chanvre obtenus à partir de l'hydratation du tourteau à pH 10 ou 12, ont été suspendus dans de l'eau distillée pour avoir une concentration protéique finale de 1% massique (3,2% pour les agrégats formés pour la réalisation des émulsions « modèles »). Le pH a été ajusté à pH 7,5, avec du NaOH ou de l'HCl  $\leq 0,5$  M. Les échantillons ont été placés au bain-marie à 40 °C. Une fois la température des échantillons égale à 40 °C, le bain-marie a été chauffé de 1 °C/min jusqu'à

95 °C. La température a été maintenue à 95 °C pendant 1 h, puis les échantillons ont été immédiatement placés dans la glace jusqu'à ce qu'ils refroidissent à 20 °C.

### III.2.4. Préparation des émulsions

Les émulsions ont été formées selon le protocole de Dapčević-Hadnađev et al. (2019), avec quelques modifications. Elles ont été formées à partir des protéines brutes ou agrégées thermiquement, issues des isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. Pour les émulsions « témoins », des solutions à 1% massique de protéines ont été préparées dans de l'eau distillée. Le pH a été ajusté à 3 ou 7,5 avec du NaOH ou de l'HCl  $\leq 0,5$  M. Les émulsions ont été formées avec un ratio massique suspension protéique/Miglyol de 90/10. Pour les émulsions « modèles », 2% massique de Miglyol ont été ajoutés à des solutions d'agrégats thermiques à 3,2% massique de protéine à pH 7,5.

Les suspensions ont été pré-homogénéisées à haute vitesse à l'Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Talant, France) à 12000 rpm pendant 60 s. Ensuite, les échantillons ont été directement homogénéisés avec un microfluidiseur Microfluidizer LM10 équipé d'une chambre d'interaction G10Z en Z avec un diamètre de canaux de 87  $\mu\text{m}$  (Microfluidics, Westwood, Etats-Unis) avec deux passages, à une pression de 40 MPa pour les émulsions « témoins » ou jusqu'à 120 MPa pour les émulsions « modèles ».

## III.3. Caractérisation des matières premières

### III.3.1. Matière sèche

Pour déterminer la teneur en matière sèche, la méthode AOAC n°925.10 a été suivie avec quelques adaptations. L'échantillon exactement pesé a été placé à l'étuve à 105 °C pendant 48h. Le produit a ensuite été retiré de l'étuve puis placé dans un dessiccateur au moins 1h, après quoi il a été pesé. La teneur en eau a été calculée par la formule suivante :

$$\% \text{matière sèche} = \frac{m_f}{m_i} \times 100$$

Avec  $m_i$ , la masse initiale de l'échantillon et  $m_f$ , la masse finale de l'échantillon après étuvage et passage au dessiccateur.

### III.3.2. Taux de cendre

Le taux de cendre a été déterminé par mesure gravimétrique selon la méthode AOAC n°923.03, avec quelques modifications. Les échantillons ont été pré-calcinés sur plaques chauffantes puis placés au four à moufle LT15/11/B180 de NABETHERM (Lilienthal, Allemagne) à 550 °C pendant 5 h. Après refroidissement au dessiccateur, les résidus ont été pesés et le taux de cendre a été déterminé par la formule suivante :

$$\text{Taux de cendre (\%)} = \frac{m_{\text{cendres}}}{m_{\text{initiale}}} * 100$$

### III.3.3. Teneur en lipide par Soxhlet

La teneur en lipide a été caractérisée par extraction sur appareil de Soxhlet à l'éther de pétrole, en se basant sur la méthode de référence AOAC n° 945.16. Des ballons à cols rodés, contenant 3 billes en verres ont été préalablement lavés, séchés en étuve puis placés dans un dessiccateur au moins 1 h avant d'être pesés (m1). 5 g de produit ont été exactement pesés (m2) dans des cartouches en cellulose. Ces cartouches ont été placées dans les appareils de Soxhlet, dans lesquels a été introduit de l'éther de pétrole en quantité suffisante pour permettre le reflux du solvant via le siphon. Environ 25 ml supplémentaire d'éther de pétrole ont été ajoutés pour compenser une éventuelle évaporation de solvant. Les ballons ont été chauffés à reflux et l'extraction a été réalisée pendant 5 h. A la fin de l'extraction, le solvant restant dans les ballons a été évaporé à l'évaporateur rotatif, sous vide partiel, avec un bain marie à 65 °C. Les ballons ont été mis à sécher sous hotte pendant 1 nuit, puis au moins 1 h dans un dessiccateur pour éliminer les dernières traces de solvant et d'humidité avant d'être pesés (m3). Le pourcentage de lipide a été estimé selon la formule :

$$\% \text{Lipide} = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \times 100$$

avec m3 la masse des lipides, du ballon et des billes de verre, m1 la masse du ballon et des billes de verres seules et m2 la masse d'échantillon placé initialement dans la cartouche en cellulose.

### III.3.4. Teneur en azote et en protéine par Kjeldahl

#### III.3.4.1. Azote total

L'azote total a été déterminé par la méthode de Kjeldahl AOAC n° 920.87, avec quelques ajustements. Une quantité d'échantillon pesée exactement a été ajoutée dans les matras, de façon à avoir 10 à 200 mg de protéine par matras. Dans chaque matras a été ajouté 10 ml d'acide sulfurique 96%, 2 billes en verre et 1 pastille de catalyseur (Kjeltabs NACT AA44, Thompson and Capper Ltd, Cheshire, Angleterre). La minéralisation a été réalisée à l'aide d'une unité de digestion K435 de BÜCHI (Rungis, France). Les échantillons ont été chauffés à 320 °C pendant 20 min, puis 400 °C pendant 1h, permettant la transformation totale de l'azote en ion ammonium. Les vapeurs acides ont été éliminées par un épurateur B414 de BÜCHI (Rungis, France). Après refroidissement, 25 ml d'eau distillée et 2 gouttes de phénolphtaléine ont été ajoutées dans chaque matras. Les matras ont été placés sur l'unité de distillation K355 de BÜCHI (Rungis, France). Du NaOH 32% a été ajouté jusqu'au virage de couleur bleue ou brun clair, caractéristique du passage d'ion ammonium en ammoniacque. La distillation a été réalisée en piégeant les condensats d'ammoniacque dans 50 ml d'acide borique 2% (m/v). Le dosage a ensuite été réalisé par une solution d'HCl 0,1 M jusqu'à obtenir le pH initial de la solution d'acide borique 2% (m/v). Le pourcentage d'azote a été déterminé par la formule suivante :

$$\%azote (g/g) = \frac{[HCl] * V_{\text{éq HCl}} * MN}{m} \times 100$$

Avec [HCl] la concentration de la solution d'HCl titrante : ici 0,1 mol/l ;  $V_{\text{éq HCl}}$  le volume équivalent d'HCl pour le titrage (l) ; MN la masse molaire de l'azote : 14 g/mol et m la masse d'échantillon initiale dans le matras (g).

#### III.3.4.2. Azote non protéique

La teneur en azote non protéique a été déterminée à la suite d'une précipitation des protéines à l'acide tri-chloro-acétique (TCA). La méthode utilisée a été inspirée des protocoles de Chihi (2016) et de Nioi (2013). Du TCA 24% (m/m) a été ajouté aux solutions protéiques avec un ratio de 1 g de TCA pour 1 g de solution protéique, de manière à avoir une concentration finale en TCA de 12% (m/m). Après ajout du TCA, les échantillons ont été mis sous agitation magnétique pendant 15 min à température ambiante, puis centrifugés à 12000 g pendant 15 min à température ambiante. Les surnageants contenant l'azote non protéique ont été récupérés. La

quantité d'azote non protéique a été déterminée par Kjeldahl selon les mêmes conditions opératoires que pour l'azote total.

Le pourcentage d'azote protéique a été calculé selon la formule :

$$\% \text{azote protéique} = \% \text{azote total} - \% \text{azote non protéique}$$

Le pourcentage de protéine a ensuite été estimé en multipliant le pourcentage d'azote par le facteur de conversion des protéines de 6,25 selon Sosulski & Holt (1980).

Par mesure de simplification, face aux faibles quantités d'azote non protéiques, constantes quelques soient les pH d'hydratation, les teneurs en protéine ont été estimées directement en multipliant la quantité d'azote total par 6,25.

### III.3.4.3. Solubilité des protéines

La solubilité des protéines a été déterminée selon la méthode de Mohamed, Zhu, Issoufou, Fatmata, & Zhou (2009), avec quelques adaptations. Des solutions à 0,5% de protéines ont été réalisées à différents pH (2 à 12). Les suspensions ont ensuite été centrifugées à 12000 g pendant 20 min à température ambiante. Les surnageants ont été collectés, et le taux de protéines mesuré grâce à la méthode de Kjeldahl. Le pourcentage de solubilité des protéines a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Solubilité (\%)} = \frac{\text{Quantité de protéines dans le surnageant (g)}}{\text{Quantité de protéines initiale (g)}} \times 100$$

Les rendements d'extraction ont été déterminés selon la même formule, la quantité de protéine initiale étant déterminée pour une quantité donnée de tourteau.

### III.3.5. Composition polypeptidique par électrophorèse

La composition polypeptidique des surnageants a été caractérisée par électrophorèse SDS-PAGE. Des gels d'électrophorèse Novex™ (ThermoFisher, Dardilly, France) à 8-16% ou 10-20% de Tris-Glycine ont été utilisés. Les échantillons ont été dilués au moins au 1/2 dans le tampon d'échantillons : 187,5 mM Tris-HCl, pH 8,9, 10% (m/v) de glycérol, 2% (m/v) de SDS et 0,05 % (m/v) de bleu de bromophénol, en présence (conditions réductrices) ou en absence (conditions non réductrices) de 2% (m/v) de dithiothréitol (DTT). Les échantillons dans les conditions réductrices ont été chauffés dans un bain-marie pendant 10 minutes à 95 °C. Tous

les échantillons ont été préparés puis déposés dans les puits du gel de manière à avoir 10 ou 20 µg de protéines par puits. Pour un gel donné, les quantités de protéines dans chaque puits ont été standardisées. Des marqueurs protéiques de poids moléculaire de Sigma-Aldrich® (St. Quentin Fallavier, France) (SigmaMarker™ S8445, wide range, 6,5-200 kDa) ou Thermo Scientific™ (Dardilly, France) (PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, 5-250 kDa) ont été utilisés. La migration a été effectuée à 35 mA par gel avec le tampon de migration suivant : 0,3% (m/v) de trizma base, 1,45% (m/v) de glycine et 0,1% (m/v) de SDS, dans une cuve de migration Scientific® Mini Gel Tank (ThermoFisher, Dardilly, France). Les gels ont ensuite été rincés avec de l'eau distillée et la fixation a été effectuée dans 4 bains d'eau distillée successifs chauffés pendant 1 minute au micro-ondes à 550 W. La coloration des gels a été effectuée avec du bleu de Coomassie, Thermo Scientific™ PageBlue™ (ThermoFisher, Dardilly, France), pendant une nuit. La décoloration a ensuite été réalisée dans plusieurs bains d'eau distillée, jusqu'à la couleur désirée. Les gels ont été photographiés par le système ChemiDoc™ XRS+ de Bio-Rad Lab (Marnes-la-Coquette, France) et les scans ont été analysés par ImageLab™ (3.0).

### III.3.6. Quantité de phénols totaux

Les phénols ont été dosés par la méthode au Folin-Ciocalteu en s'inspirant de la méthode utilisée par Boye et al. (2010). Les concentrations citées par la suite sont les concentrations finales après ajout de tous les réactifs. Une droite étalon a été réalisée pour l'acide gallique (**Annexe 1**). Les concentrations d'acide gallique de 0 à 8 µg/ml ont permis d'obtenir des valeurs d'absorbance comprises entre 0 et 0,85. La droite de l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique a été obtenue avec un coefficient de régression linéaire  $R^2=0,982$ , signifiant que 98,2% de la variance a été expliquée par la corrélation. L'équation de la droite  $y=0,1131x$ , a été utilisée pour calculer la teneur en phénols totaux des échantillons à analyser en équivalent d'acide gallique. Les échantillons de protéines solubles à mesurer ont été dilués de manière à ce qu'ils contiennent tous 0,002% massique d'azote total final, afin de standardiser l'absorbance potentiellement due aux protéines. Le blanc a été mesuré en remplaçant l'échantillon par un volume équivalent d'eau distillée. 0,1 M final de réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté, puis le mélange a été vortexé 5 s et placé à l'obscurité pendant 8 min. Ensuite, 3% de carbonate de sodium ont été ajoutés et le mélange a été vortexé 5 s avant d'être laissé à l'obscurité pendant 1 h. Les mesures d'absorbances ont été réalisées à 725 nm sur le spectrophotomètre UVISCO UV-1200.

### III.3.7. Mesures calorimétriques par DSC

Les analyses d'enthalpie différentielle (DSC (Differential Scanning Calorimetry)), ont été menées sur le microcalorimètre, micro DSC III de SETARAM (Caluire, France). Des suspensions à 5% massique de protéine ont été réalisées dans de l'eau distillée. La référence utilisée a été l'eau distillée. Une montée en température de 25 °C à 120 °C à 0,5 °C/min a été appliquée. Pour chaque échantillon, après refroidissement, l'une des mesures a suivi une deuxième montée en température pour vérifier que la dénaturation était complète et irréversible. Les températures de début de pic (Ton), de sommet du pic (Td), et de fin de pic de dénaturation (Tof) en °C, ainsi que l'enthalpie de dénaturation ( $\Delta H$ ) (J/g de protéine) ont été déterminées.

### III.3.8. Hydrophobicité de surface à l'ANS

L'hydrophobicité de surface (H0) a été déterminée selon la méthode de Tang et al. (2009), par mesure de la fluorescence de la sonde 1-anilidonaphthalene-8-acide sulfonique (ANS), par un spectrofluorimètre Luminescence Spectrometer LS 50B (Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France). Plusieurs concentrations en protéine (0,004 à 0,02% (m/m)) et volumes d'ANS (25 à 40  $\mu$ l) ont été testées pour fixer les paramètres (**Annexe 2**). Les solutions protéiques ont été diluées à 0,003, 0,006, 0,09, 0,012 et 0,015% massique de protéine dans l'eau distillée à pH 3 ou 7,5. Le pH a été ajusté par de l'HCl ou du NaOH  $\leq$  0,5 M. Une solution d'ANS 8 mM a été préparée dans de l'eau distillée ajustée à pH 3 ou 7,5. Par cuve, 3 ml de suspension protéique ont été ajoutés ainsi que 35  $\mu$ l d'ANS 8 mM. Après 15 min à l'obscurité, les échantillons ont été excités à 380 nm et l'émission a été mesurée à 460 nm. L'hydrophobicité de surface correspond à la valeur de la pente de la partie linéaire obtenue en traçant l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en protéine en mg/ml.

### III.3.9. Charge de surface par mesure de potentiel zêta

Le potentiel zêta a été mesuré par ZetaCompact<sup>TM</sup> Z8000 (CAD Instruments, Les Essarts Le Roi, France), sur le principe de la mobilité électrophorétique des particules. Les solutions protéiques ont été diluées dans de l'eau distillée à pH 3 ou 7,5, jusqu'à l'observation d'un nombre de particules proche de 100. Les mesures ont été réalisées à un voltage de 80 Volts. Un seuil de 2,5% a été appliqué sur les mesures, supprimant les déplacements parasites observés pour moins de 2,5% des particules totales. Les valeurs de potentiels zêta ont été calculées à partir de la mobilité des particules par l'équation de Smoluchowski.

### III.3.10. Taille des particules par granulométrie laser

La distribution de la taille des particules a été caractérisée par granulométrie avec le MasterSizer 3000 (Malvern, Orsay, France), selon la méthode décrite par López, Ingrassia, Busti, Bonino, et al. (2018), avec quelques modifications. Les suspensions protéiques, à pH 3 ou 7,5 ont été déposées dans la cuve de l'appareil contenant de l'eau distillée au pH de l'échantillon, en quantité suffisante pour atteindre un taux d'obscurité compris entre 10 et 20%. La vitesse d'agitation a été fixée à 1100 rpm. L'indice de réfraction de la phase continue a été fixé à 1,33, ce qui correspond à celui de l'eau et à 1,4497 pour la phase dispersée. Le diamètre volumétrique  $d_{[4;3]}$ , la largeur de distribution de taille (span) et la distribution de taille en pourcentage en volume, ont été déterminés. Les formules de calcul de  $d_{[4;3]}$  et de span ont été les suivantes :

$$d_{[4;3]} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$

Avec  $n_i$  le nombre de particules de diamètre  $d_i$  et  $D_{90}$ ,  $D_{50}$  et  $D_{10}$ , les diamètres moyens à 90, 50 et 10% du volume cumulé (Gharsallaoui et al., 2010).

### III.3.11. Digestibilité *in vitro*

#### III.3.11.1. Mesure de l'activité enzymatique de la trypsine présente dans la pancréatine

L'activité enzymatique de la trypsine au sein de la pancréatine commerciale a été mesurée afin de déterminer la quantité de pancréatine à incorporer dans la phase de digestion intestinale (**Annexe 3**). Cette activité a été mesurée selon la méthode de The Royal Society of Chemistry (2014). Au sein d'une cuvette en plastique, 1,3 ml de tampon Tris-HCl (0,046 M) à pH 8,1 et 150  $\mu$ l de substrat (10 mM P-toluene-sulfonyl-L-arginine méthyl ester (TAME)) ont été ajoutés. La solution a été mélangée par retournement. Un volume de 50  $\mu$ l de solution de trypsine à 0,10, 0,15 ou 0,20  $\mu$ g/ml a été incorporé dans chaque cuvette, excepté pour le blanc. Les solutions ont été mélangées par retournement, puis incubées à température ambiante au sein du spectrophotomètre UVISCO UV-1200. L'absorbance a été enregistrée à 247 nm, toutes les 10 secondes pendant 10 minutes. L'activité de la trypsine a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Unités/mg} = \frac{(\Delta A_{247} \text{ essais} - \Delta A_{247} \text{ blanc}) \times 1000 \times 1,5}{540 \times X}$$

Avec  $\Delta A_{247}$  la pente de la partie linéaire initiale de la courbe de l'absorbance en fonction du temps en min ; 540 le coefficient d'extinction molaire de TAME à 247 nm ; 1,5 le volume en ml du mélange de réaction (Tris-HCl + TAME + Enzyme) et X la quantité initiale de pancréatine en mg.

### III.3.11.2. Digestion gastro-intestinale

La digestion gastro-intestinale simulée *in vitro* des protéines de chanvre a été effectuée selon la méthode de référence établie par Minekus et al. (2014). Les simulants des fluides gastriques (SFG) et intestinaux (SFI) ont été préparés selon les conditions du **Tableau 7**. La solution de SFG a été ajustée à pH 3 et celle de SFI à pH 7.

Tableau 7 : Préparation des simulants de fluides gastriques (SFG) et de fluides intestinaux (SFI).

Composants	SFG	SFI
	mmol/l	mmol/l
KCl	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	25	85
NaCl	47,2	38,4
MgCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	0,1	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,5	-

Pour la digestion gastrique, un volume de 10 ml de solution protéique de chanvre à 2% (m/m) a été préparé et 7,5 ml de SFG ont été incorporés. Le pH a été ajusté à 3 avec une solution d'HCl  $\leq 0,5$  M. Le niveau d'HCl ajouté a été relevé. L'obtention d'un ratio 50% solution protéique et 50% de solution gastrique a été recherché. Les 10 ml de solution gastrique étaient composés de : 7,5 ml de SFG (précédemment ajouté), 16 mg de poudre de pepsine ( $> 25000$ U/mg de protéines), 5  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> à 0,3 M, la quantité d'HCl relevée précédemment, et d'eau distillée pour compléter le volume à 10 ml. La solution SFG + protéines a été incubée sous agitation continue à 170 rpm, pendant 2 h à 37 °C.

La digestion intestinale a été réalisée en second lieu. La solution résultant de la digestion gastrique a été mélangée avec 11 ml de SFI ainsi que 40 µl de CaCl<sub>2</sub> à 0,3 M. Le pH a été ajusté à pH 7 avec du NaOH ≤ 1 M, et le volume ajouté a été noté. Une quantité de poudre de pancréatine (P1750-4\*USP) de 641 g, a été calculée et ajoutée pour avoir 100 U/ml de solution finale (40 ml), d'activité de la trypsine. Le volume final a été complété jusqu'à 40 ml avec de la solution SFI, puis la solution a été incubée 2 h à 37 °C sous agitation à 170 rpm.

Un volume de 10 ml de la mixture digérée a été prélevé et mélangé avec 10 ml d'acide trichloro-acétique (TCA) à 10% (m/v). La solution a été centrifugée à 20 °C, durant 10 min, à 8000 g. Le pourcentage d'azote soluble dans le TCA, libéré pendant le processus de digestion, a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Hydrolyse enzymatique (\%)} = \frac{\text{quantité de protéines dans le surnageant de TCA}}{\text{quantité totale de protéines}} \times 100$$

La caséine a été utilisée comme référence. Son pourcentage d'hydrolyse a été considéré comme correspondant à 100% de digestibilité.

### III.4. Caractérisation des émulsions

#### III.4.1. Taille des gouttelettes lipidiques, floculation et coalescence par granulométrie

Le mode opératoire a été le même que pour les mesures de tailles des particules en suspension, avec quelques modifications pour la caractérisation des émulsions, selon la méthode de Dapčević-Hadnađev et al. (2019). Les mesures ont été réalisées directement après formation des émulsions (t<sub>0</sub>), ou après 24 h (t<sub>24</sub>) de stockage à 4 °C. La phase dispersante dans la cuve de l'appareil a été de l'eau distillée au pH des émulsions, avec ou sans 1% de SDS. Les indices d'absorbance et de réfraction, et les valeurs de densité du Miglyol utilisées ont été respectivement de 3, 1,4497 et 0,948 g/cm<sup>3</sup>. Les distributions de taille des gouttelettes en pourcentage en volume, les diamètres d<sub>[4;3]</sub>, et les largeurs de distribution des tailles de gouttelette (span) ont été déterminés. Les indices de floculation (IF) et de coalescence (IC) ont été calculés selon les formules suivantes :

$$IF = \frac{d_{[4;3]} \text{ eau distillée}}{d_{[4;3]} \text{ 1\% SDS}} - 1$$

$$IC = \frac{d_{[4;3]} 24h 1\% SDS}{d_{[4;3]} 0h 1\% SDS} - 1$$

### III.4.2. Indice de stabilité du crémage

L'indice de stabilité du crémage a été calculé selon la méthode de Karaca, Low, & Nickerson (2011), avec de légères modifications. Les émulsions « témoins » ont été préparées selon la méthode décrite précédemment avec ajout d'azide de sodium à 0,02% (m/v) comme agent antimicrobien. Les émulsions ont ensuite été immédiatement transférées dans des tubes et laissées à température ambiante. La stabilité des émulsions a été mesurée selon le phénomène de séparation des phases (sérum et crème). L'indice de stabilité au crémage a été calculé à 7, 14 et 21 jours, selon la formule suivante :

$$\text{Indice de stabilité au crémage (\%)} = \frac{\text{Hauteur du sérum}}{\text{Hauteur totale de l'émulsion}} \times 100$$

### III.4.3. Viscosité dynamique

La viscosité des émulsions « modèles » a été déterminée juste après leur formation à l'aide du rhéomètre rotationnel HAAKE™ RotoVisco™ 1 équipé d'un double gap cylinder system DG43 (ThermoFisher, Dardilly, France). La méthode de Forster & Ferrier (1979), a été appliquée avec quelques modifications. La température en cours de mesure a été maintenue à 25 °C, à l'aide d'un bain-marie. Les mesures ont été réalisées en augmentant le taux de cisaillement de 0 à 150 s<sup>-1</sup>. Après un retour à 0 s<sup>-1</sup>, le taux de cisaillement a de nouveau été augmenté jusqu'à 150 s<sup>-1</sup>. Le tracé de la contrainte de cisaillement (Pa) en fonction du taux de cisaillement (1/s), a formé des droites pour l'ensemble des échantillons, sans différence entre les 2 montées successives du taux de cisaillement. Les émulsions ont alors montré un comportement Newtonien et la viscosité a été calculée comme étant la pente de cette droite lors de la première montée du taux de cisaillement.

### III.4.4. Stabilité des émulsions « modèles » par évolution de la rétrodiffusion

La stabilité des émulsions « modèles » a été déterminée à l'aide d'un Turbiscan<sup>LAB</sup> (Formulacion, Toulouse, France) selon la méthode de Oliete, Yassine, Cases, & Saurel (2019). Les émulsions ont été déposées dans des tubes cylindriques à fond plat de 25 ml en verre borosilicaté. Une mesure a été réalisée juste après formation des émulsions (t0) et après 24 h (t24) de stockage à température ambiante. Les mesures sont basées sur la diffusion multiple de

la lumière. L'appareil est muni de 2 capteurs optiques qui mesurent la lumière monochromatique en proche-infrarouge, transmise et rétrodiffusée. La tête de détection balaye la totalité de l'échantillon, de sa partie basse à sa partie haute, en prenant des mesures tous les 40  $\mu\text{m}$ . Des variabilités de profils de transmission et de rétrodiffusion au cours du temps traduisent la déstabilisation de l'échantillon.

### **III.5. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica, version 12 (Tulsa, OK, Etats-Unis), par analyse de variance (ANOVA). Un test de Tukey a été utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ . Toutes les mesures ont été effectuées avec au moins trois répétitions.



# **Chapitre IV : Caractérisation de la matière première et mise en place du procédé d'extraction**



## IV.1. Introduction du chapitre

Comme évoqué précédemment (**Chapitre II**), les isolats protéiques de chanvre sont peu solubles, probablement à cause de fortes interactions entre les protéines au point isoélectrique qui en insolubilisent une partie. Ce premier chapitre de résultats est alors dédié aux caractérisations des matières premières (graines et tourteau) et à la mise en place d'un procédé d'extraction des protéines de chanvre à partir de tourteau brut de graines entières, sans précipitation isoélectrique. L'impact des conditions d'hydratation, d'une étape de filtration et du mode de séchage sur la qualité et la quantité de protéines extraites est étudié. Les conditions d'extractions sont sélectionnées pour tenter de répondre aux objectifs de pureté protéique ( $\geq 80\%$ ) et de rendement d'extraction ( $\geq 40\%$ ) que nous nous sommes fixés. Ils sont également sélectionnés pour répondre à l'objectif d'extraction simultanée des globulines et les albumines.

## IV.2. Impact des conditions d'hydratation

### IV.2.1. Article : « Hemp (*Cannabis sativa* L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality »

Potin, F., Lubbers, S., Husson, F., & Saurel, R. (Accepted in 2019). Hemp (*Cannabis sativa* L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality. *Journal of Food Science*.

#### (Extractability of hemp proteins)

Food Engineering, Materials Science, and Nanotechnology

#### IV.2.1.1. Abstract

The purpose of this paper was to study the extraction conditions of hemp proteins from undelipidated press-cakes. The effects of different hydration conditions on protein recovery yield and polypeptide profile were evaluated: pH (2 to 12), ionic strength (0 to 500 mM NaCl) and press-cake/liquid weight ratio (2 to 22%). pH was the most impacting factor. At acidic pH (2 to 7) the extraction yields were low and quite constant ( $< 7\%$ ), corresponding mainly to hemp albumins solubilization. The extraction of globulins started to increase significantly from pH 8, with protein extraction yield varying from 8.3% at pH 8 to 67.1% at pH 12 for a 10 % press-cake/liquid weight ratio. The addition of NaCl in press-cake suspensions did not increase the total nitrogen content in aqueous extracts at alkaline pH while the lowest press-cake/liquid weight ratios (5-10%) were revealed optimal regarding protein recovery rate. The intense

coloration observed on the aqueous extracts above pH 8 was assigned to solubilization and oxidation of phenolic compounds whose concentration increased about 7-folds from pH 2 to 12. At the highest applied pH (11-12), the formation of covalent complexes between phenolic compounds and some hemp polypeptides was hypothesized. Aqueous extraction at strong alkaline pH (> 9) without salt addition and respecting a 10% press-cake/liquid weight ratio should be retained to optimize protein extraction yield. However, further purification steps are required to evaluate the nutritional, organoleptic and techno-functional properties of hemp proteins extracted in such conditions.

**Keywords: hemp, extraction, plant proteins, solubility, phenolics**

### **IV.2.1.2. Practical application**

The traditional extraction process of hemp proteins by alkaline solubilization and isoelectric precipitation, mostly from delipidated hemp press-cake, leads to limited quantity and poor solubility of extracted proteins, and data related to extraction conditions are insufficiently available to optimize this process. This article aims to find optimal hydration conditions (pH, ionic strength, press-cake to liquid ratio) for protein extraction from undelipidated hemp press-cake, allowing high protein recovery and preserving protein quality. The results obtained represent very useful data for developing an economically viable and sustainable extraction process of proteins from raw hemp press-cake.

### **IV.2.1.3. Introduction**

According to FAO, global protein demand is expected to increase by 40% between 2010 and 2030 mainly to respond to the world's population growth. This increase has been evaluated to 33 and 43% for animal and plant proteins respectively (Ozanne, 2014). The diversification in plant protein sources for human consumption will help to meet this challenge. For instance, the valorization of oilseed proteins is an opportunity to propose alternatives to current plant proteins extracted from cereals or legumes (Sari et al., 2015). These proteins are often available in press-cake after oil extraction. The protein content of residual press-cake obtained after oil extraction from oilseeds generally varies from 20 to 50% (w/w) (Ramachandran, Singh, Larroche, Soccol, & Pandey, 2007; Sari et al., 2015).

Among oilseeds, hemp seeds represent a potential source of proteins for human consumption. Hemp is a worldwide harvested plant for its fibers from stems and leaves. In such production, hemp seeds are regarded as under-valued coproducts despite high contents in lipids and proteins

(~30 and ~25% (w/w) of seeds respectively). However, hemp oil extracted from seeds is the most valued products mainly for cosmetic industry and press-cakes enter generally in animal feed. The protein content is increased by 10 to 15% in the press-cakes obtained after oil extraction by mechanical pressing (Callaway, 2004; House et al., 2010). Hemp proteins have interesting nutritional values regarding amino acid profile and digestibility (House et al., 2010; Malomo & Aluko, 2015b), and physicochemical properties that can be exploited to formulate food products (Callaway, 2004; Malomo & Aluko, 2015a; Tang et al., 2006). These proteins are mainly globulins (60 to 80% of the total proteins) and in lower proportion, albumins (20 to 40% of the total proteins) (Park et al., 2012). Hemp globulins consist of 11S edestin (~93% of globulins) and 7S globulins (~7% of globulins) (Osburn, 1992; Ponzoni et al., 2018; Tang et al., 2006). Edestin 11S, comparable to 11S soy glycinin, is a homohexamer of about 300 kDa (Patel et al., 1994). The 7S globulin fraction consists of a 48 kDa polypeptide, comparable to the  $\beta$  subunit of soy  $\beta$ -conglycinin. (Ponzoni et al., 2018; X.-S. Wang et al., 2008). The albumin fraction comprises a 2S albumin of 10 kDa comparable to that of Brazil nuts, and other proteins below 35 kDa (Malomo & Aluko, 2015a; Odani & Odani, 1998; Ponzoni et al., 2018).

The most limiting factor for recovery and use of hemp proteins appears to be their low solubility. The solubility of hemp press-cake protein has been evaluated below 25% over the range of pH 3 to 9 (Malomo & Aluko, 2015b). The hemp globulin isolates obtained by solubilization of the delipidated press-cake at pH 8-10, followed by isoelectric point precipitation at pH 5, resuspension at pH 7 and freeze-drying, had protein contents ranging from 84 to 95% (w/w, wet basis) (Aluko, 2017; Girgih, Alashi, et al., 2013; Malomo & Aluko, 2015b; Mamone et al., 2019; Tang et al., 2006, 2009; Yin et al., 2008). These isolates have solubility values of less than 40% in the range of pH 3 to 7, and less than 60% until pH 10 (Malomo & Aluko, 2015b; Yin et al., 2008). Malomo & Aluko (2015b), applied enzymatic treatment to improve the extractability of hemp proteins from cellulosic matrices during hydration by using mixtures of cellulase, hemicellulase, xylanase and phytase, whereas Yin et al. (2008), used trypsin digestion to increase the solubility of hemp protein isolates. The low solubility of hemp protein isolates produced by isoelectric precipitation was supposed to result from strong interactions between proteins at pH 5, leading to an irreversible loss of solubility (Aluko, 2017). The effects of hydration conditions of hemp press-cake were not clearly stated in the previous papers dealing with extraction of hemp proteins. In order to define a sustainable extraction process of hemp proteins from press-cake (no delipidation by solvent, no use of enzymes), the extractability of these proteins needs to be evaluated from raw hemp press-cake.

The objective of the present work was to investigate the extractability of hemp proteins from raw (un-delipidated) press-cake by considering different pH, salt contents and press-cake to water ratios during solubilization. The extractability of hemp proteins was quantitatively and qualitatively evaluated by measuring protein extraction yield, electrophoretic profiles and total phenol contaminations in aqueous extracts.

## IV.2.1.4. Results and discussion

### IV.2.1.4.1. Whole seed and press-cake composition

Dry matter, protein, lipid and ash contents were determined for whole seeds and crude hemp press-cakes. Whole seeds showed a dry matter content of 94.7% (w/w). The protein, lipid and ash contents were 22.5, 30.2 and 5.2% (w/w, dry basis) respectively (**Table 8**). These results are close to those found in the literature. For whole seeds, Callaway (2004) reported a 93.5% (w/w) dry matter and contents in protein, fat, and ash of 26.5, 38.0 and 6.0% (w/w, dry basis) respectively. House et al. (2010) found values of 25.5, 32.3 and 5.1% (w/w, dry basis) for the protein, lipid and ash contents respectively, and of 94.1% (w/w) for dry matter.

**Table 8: Composition of whole seeds and hemp press-cake.** All percentages are in w/w dry basis, except for the dry matter in w/w wet basis.

Components	Whole seed	Press-cake
<b>Dry Matter</b>	94.7%	95.9%
<b>Lipid</b>	30.2%	8.7%
<b>Ash</b>	5.2%	6.9%
<b>Protein</b>	22.5%	30.0%
<b>Other</b>	42.0%	54.4%

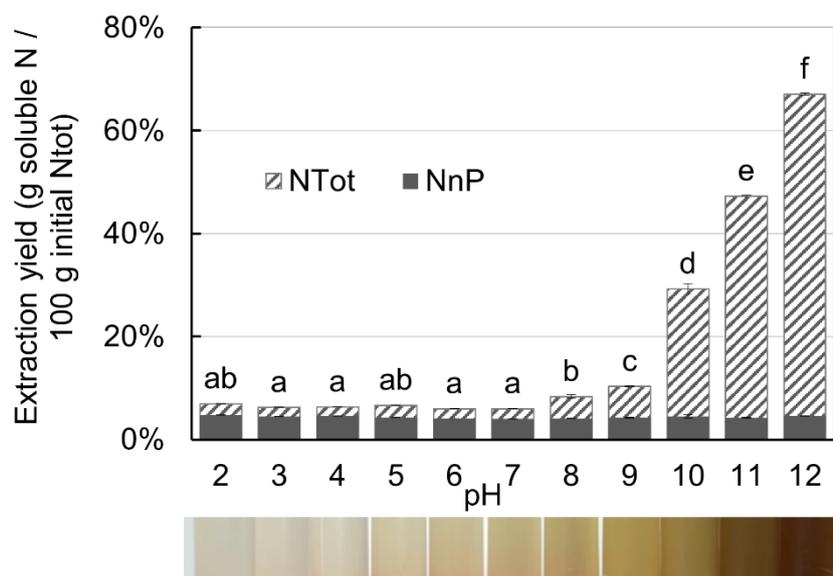
The same composition determination was done from the press-cake obtained after pressing of the whole seeds. The press-cake had a dry matter content of 95.9% (w/w), and protein, lipid and ash contents of 30.0, 8.7 and 6.9% (w/w, dry basis) respectively (**Table 8**). The pressing of the whole seeds allowed to remove most of the oil and thus to increase the contents of other constituents, including proteins.

The characteristics of the hemp press-cake were similar to those found by Callaway (2004). This author reported protein, oil and ash contents of 35.5, 11.8 and 7.6% (w/w, dry basis)

respectively, and 94.4% (w/w) dry matter. The results were also consistent with those of Pojić et al. (2014), who recorded values of 30.3, 12.8, 7.3% (w/w dry basis) and 93.3% (w/w) for protein, fat, ash and dry matter contents respectively. House et al. (2010) obtained similar lipid, ash and dry matter contents of 10.7, 7.0% (w/w, dry basis) and 95.1% (w/w) respectively.

#### IV.2.1.4.2. Effect of pH on protein solubilization

The yields of solubilized total and non-protein nitrogen as a function of the press-cake hydration pH are shown in **Figure 11**. Hydration was performed by dispersing 10% (w/w) of hemp press-cake in distilled water adjusted to different pH. The supernatant obtained after centrifugation was recovered and the amounts of solubilized total and non-protein nitrogen were measured. All the extraction yield values were expressed in % as g of soluble nitrogen in the supernatant per 100 g of initial total nitrogen. The extraction yield of solubilized non-protein nitrogen was constant regardless of the pH, with an average value of 4.3%. The extraction yield of solubilized total nitrogen was the lowest in the pH range of 2 to 7. No significant difference was observed between these pH conditions, with an average value of 6.4%. At higher pH, the extraction yield of solubilized total nitrogen increased with pH from 8.4% at pH 8 to 67.1% at pH 12.



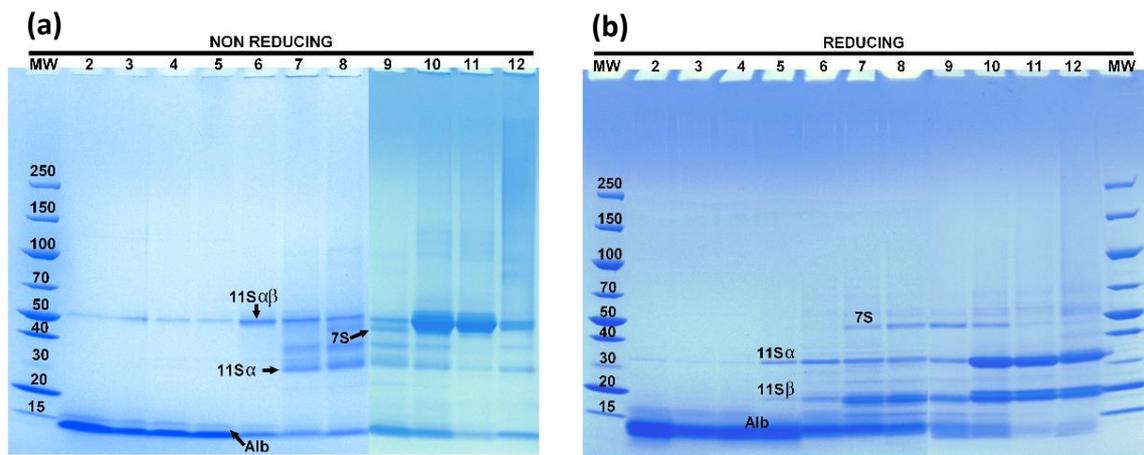
**Figure 11: Extraction yield of total and non-protein nitrogen, and aqueous extract color from hemp cake as a function of hydration pH.** NTot: total nitrogen and NnP: non-protein nitrogen. The color of the supernatants is shown under the histogram. Different letters represent significant differences at  $p < 0.05$ .

The higher the pH of hydration, the more the supernatants were colored and turbid, from a colorless and clear solution at pH 2 to a dark brown and murky solution at pH 12, suggesting solubilization and/or modification of phenolic compounds at alkaline pH (**Figure 11**).

Malomo and Aluko (2015b) measured the relative protein solubility (100% solubility corresponded to the amount of proteins solubilized in 0.1 M NaOH) for hemp press-cake dispersions from pH 3 to 9. The shape of the solubility curve as a function of pH was quite similar to that presented in this paper. The previous authors also observed constant solubility values between pH 3 and 5. However, they observed an increase in solubility from pH 6. According to Malomo and Aluko (2015a), the solubility of hemp albumins after isolation increased with pH (pH 3 to 9). Hemp globulins after isolation had a minimal solubility at pH 5. The solubility of globulins increased slightly towards the most acidic pH (pH 5 to 3) and increased strongly towards the most alkaline pH (pH 5 to 9). In the present case, the increase in extraction yield of the proteins from pH 8 is consistent with the increase in the solubility of both albumins and globulins above this pH. Globulins are the major fraction of hemp proteins representing 60 to 80% of the total hemp proteins (Park et al., 2012). In addition, the hemp globulin fraction was shown to present the greatest increase in solubility at alkaline pH (Malomo & Aluko, 2015a). These two data support the sharp increase in hemp protein extraction yield at alkaline pH as observed in **Figure 11**.

SDS-PAGE analysis was applied to soluble protein extracts obtained at the different hydration pH, under denaturing conditions, with or without DTT (non-reducing (**Figure 12a**) and reducing (**Figure 12b**) conditions). The amount of total nitrogen was standardized for all the wells.

The different characteristic subunits of hemp proteins have been observed. 11S ( $\alpha\beta$ ) edestin monomers were observed around 53 kDa, and formed the acid  $\alpha$  (11S  $\alpha$ ) and the basic  $\beta$  (11S  $\beta$ ) bands at 35 kDa and 18-20 kDa respectively, under reducing conditions. This indicated the contribution of disulfide bridge in the binding of these two polypeptides (Kim & Lee, 2011b). The 7S globulin subunit was determined at 48 kDa under non-reducing and reducing conditions (X.-S. Wang et al., 2008). Bands lower than 18 kDa can be attributed to albumins (Malomo & Aluko, 2015a). These bands seemed little affected in reducing conditions.



**Figure 12: Electrophoretic profiles of the aqueous extracts obtained after hydration at different pHs.** Electrophoresis gels under denaturing conditions (SDS), non-reducing (a) or reducing (b). MW: standard molecular weights; 2 to 12 as pH of hydration. 11S αβ: monomer of edestin; 11S α and 11S β: α and β edestin subunits; 7S: 7S globulin subunit and Alb: albumins.

Below pH 6, the albumins were solubilized preferentially, compared to globulins. From pH 7 to 10, all protein fractions were solubilized. Above pH 10, the 7S globulin band was not observed and albumin bands intensity decreased. From pH 10 to 12, dark trails becoming more and more pronounced with pH, appeared in the upper part of the gels, indicating the formation of aggregates of molecular weight higher than 200-250 kDa. These trails seemed to disappear under reducing conditions, showing the involvement of disulfide bridges in the formation of these aggregates. A later decrease in the pH of the supernatants obtained at pH 12 did not lead to a change in the electrophoretic profile, indicating the irreversible nature of aggregate formation (data not shown).

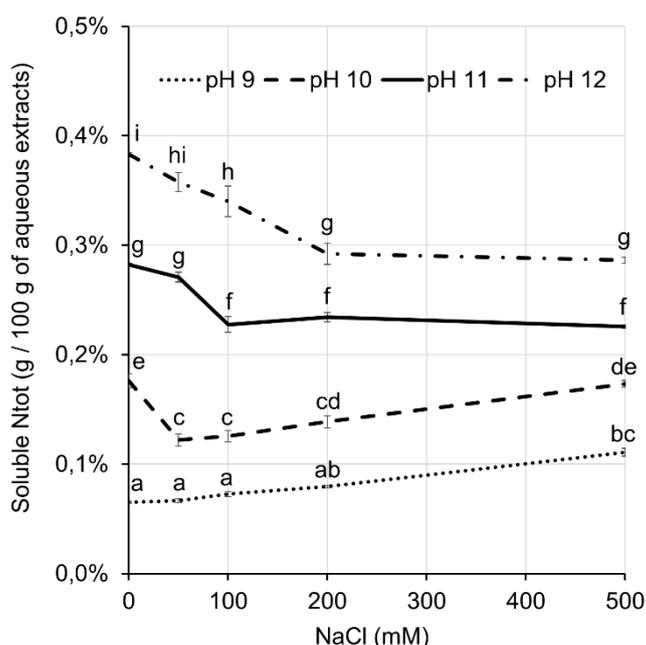
Jiang, Chen, and Xiong (2009), Valenzuela, Abugoch, Tapia, and Gamboa (2013), and Q. Wang, Jin, and Xiong (2018) observed for soybean, quinoa and hemp proteins respectively, that a shift to pH 12 caused protein unfolding through changes mainly in their tertiary structure. This unfolding allowed the exposure of hydrophobic groups, and the formation of large aggregates involving disulfide bonds (>1000 kDa for quinoa). The previous authors hypothesized that an alkaline medium induced the deprotonation of sulfhydryl groups and rendered easier the formation of disulfide bonds. A lowering to pH 7 following the shift to pH 12 did not completely restore the initial structure of the proteins.

It cannot be excluded that lipids and phenolic compounds were also involved in the formation of these aggregates. According to Swanson (1990), lipids can oxidize and form protein-lipid cross-linking during plant protein solubilization from flour at alkaline pH. According to

Matheis and Whitaker (1984) and Pourcel et al. (2007), the phenolic compounds can be oxidized to quinones by auto-oxidation or by the action of polyphenol oxidases or peroxidases in presence of oxygen. These quinones can thus bind to other phenols, quinones, or proteins via their amino or sulfhydryl groups. These large complexes usually form brown pigments. The binding of quinones to proteins is enhanced at alkaline pH (Matheis & Whitaker, 1984).

#### IV.2.1.4.3. Effect of ionic strength on protein solubilization

The impact of the ionic strength during hydration on the solubilized total nitrogen concentration was studied from pH 9 to 12. Hydration experiments were carried out with 10% (w/w) suspensions of press-cake in distilled water with addition of 50, 100, 200 and 500 mM NaCl respectively. Following extraction, the supernatants obtained after centrifugation were recovered and the solubilized total nitrogen concentration was determined as shown in **Figure 13**.



**Figure 13:** Total nitrogen content in aqueous extracts as a function of ionic strength at pH 9 to 12. Different letters represent significant differences at  $p < 0.05$ .

The addition of NaCl until 200 mM at pH 10, 11 and 12 tended to decrease the total nitrogen content in aqueous extracts. The addition of 500 mM NaCl did not cause a significant change in the total nitrogen content in aqueous extracts at pH 11 and 12, compared with 200 mM NaCl condition. On the other hand, the addition of 500 mM NaCl at pH 10 led to recover the total nitrogen content in aqueous extracts to values close to those obtained without NaCl. At pH 9, the total nitrogen content in aqueous extracts increased linearly with ionic strength. Addition of

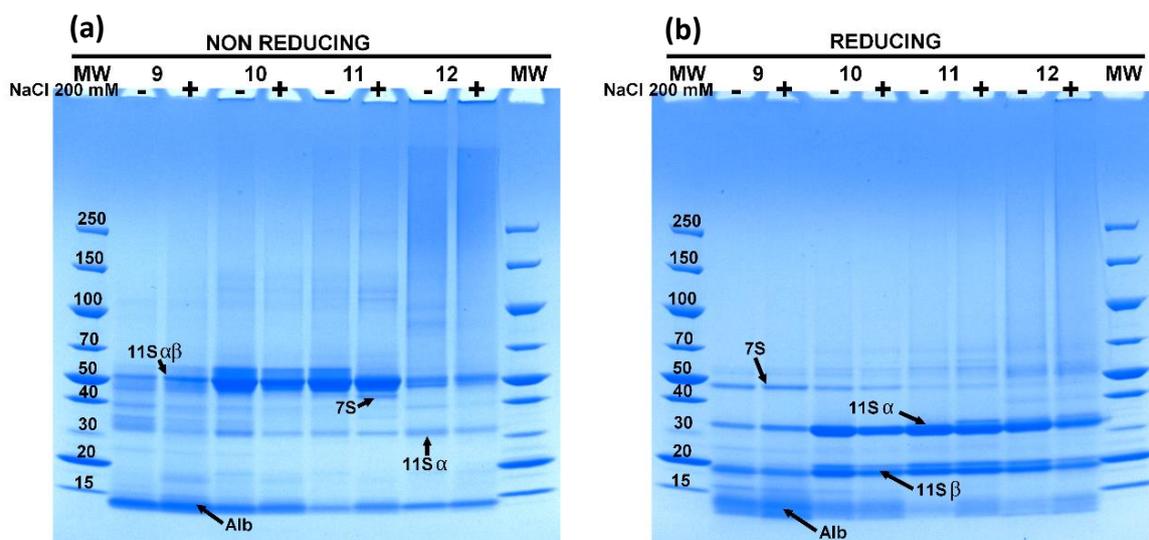
NaCl at this pH increased the total nitrogen content in aqueous extracts from 0.07% (without NaCl) to 0.11% (w/w) (500 mM NaCl). The impact of ionic strength on the nitrogen content in aqueous extracts of hemp proteins during press-cake hydration varied considerably with pH.

In theory, the addition of NaCl increases protein solubility by salting-in effect at low NaCl concentrations, and decreases it by salting-out effect at high NaCl concentrations. On the other hand, these effects seem to be dependent on the pH and surface properties of proteins, including their composition in hydrophilic and hydrophobic groups (Damodaran, 1997).

Several authors have reported that the effects of NaCl concentration on the solubility or extractability of oilseed proteins (sunflower, canola and sesame) was dependent on the pH (Achouri et al., 2012; Ivanova et al., 2012; Paulson & Tung, 1987; Pickardt et al., 2009). For canola and sunflower proteins, Paulson & Tung (1987) and Pickardt et al. (2009) showed an increase in protein solubility or extractability at acidic pH by adding NaCl up to about 500 mM, and a decrease at alkaline pH respectively.

In the present case of hemp protein extraction, total nitrogen content in aqueous extract increased slightly with NaCl concentration at pH 9, indicating a salting-in effect. Above this pH, the decrease in total nitrogen content in aqueous extracts by the addition of NaCl, all the more marked as alkaline the pH was, indicated a salting-out phenomenon. Far from the isoelectric point, the more alkaline the pH is, the more negatively charged the proteins are. It is then hypothesized that the screening of charges by counter ions, provided by NaCl, could have reduced the intramolecular electrostatic repulsion forces, contributing to the decrease in protein solubilization (Damodaran, 1997; Ferreira Machado et al., 2007).

In order to determine the effect of ionic strength on the solubilized protein types, SDS PAGE analyses were performed under denaturing conditions, without (**Figure 14a**) or with DTT (**Figure 14b**), at different alkaline pH between 9 to 12, with or without 200 mM NaCl. The presence of NaCl did not modify noticeably the type of solubilized proteins, nor the band intensity. Thus, NaCl was able to modify slightly the amounts of solubilized proteins but not their qualitative distributions.



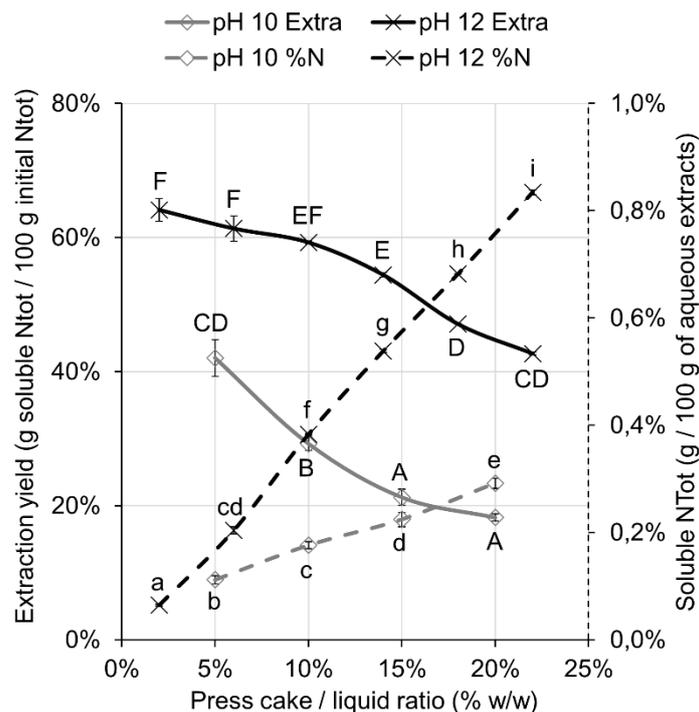
**Figure 14: Electrophoretic profiles of aqueous extracts after hydration with or without NaCl.** Electrophoresis gels under denaturing (SDS), non-reducing (a) and reducing (b) conditions. MW: standard molecular weights; 9 to 12: pH of hydration, with or without 200 mM NaCl (+ and - respectively). Total nitrogen amount standardized in all wells. 11S  $\alpha\beta$ : monomer of edestin; 11S  $\alpha$  and 11S  $\beta$ :  $\alpha$  and  $\beta$  edestin subunits; 7S: 7S globulin subunit and Alb: albumins.

The addition of NaCl during the hydration step was not efficient to improve protein extraction as it has no impact on polypeptide profiles and did not significantly change the total nitrogen content in aqueous extracts at pH 10, 11 and 12, nor substantially increased it at pH 9.

#### IV.2.1.4.4. Effect of press-cake/liquid ratio on protein extraction yield

The impact of the press-cake/liquid ratio during hydration on protein extraction yield was studied (**Figure 15**). For this purpose, the press-cakes were hydrated at various press-cake/liquid weight ratios, at pH 10 or 12 without NaCl addition. The hydration condition at pH 10 was selected because it offered the best compromise between extraction yield and complete polypeptide composition. Despite aggregation phenomena and the absence of 7S globulin in the aqueous extract, the hydration condition at pH 12 was also retained regarding the high extraction yield obtained at this pH (**Figure 11**).

The same behaviors were observed at pH 10 and pH 12. The soluble nitrogen concentration in aqueous extracts increased gradually with the press-cake/liquid ratio. The extraction yield had the opposite behavior, decreasing gradually with the increase in press-cake/liquid weight ratio. This result can be explained by the decrease in the recovered amount of supernatant after centrifugation of the aqueous extract when the press-cake/liquid ratio increased, despite higher concentration of solubilized proteins.



**Figure 15: Total nitrogen extraction yield and total nitrogen content in aqueous extracts as a function of the press-cake/liquid hydration ratio.** Extra: extraction yield after hydration at pH 10 or 12 (left ordinate). %N: total nitrogen in aqueous extracts after hydration at pH 10 or 12 (right ordinate). Different letters represent significant differences at  $p < 0.05$ .

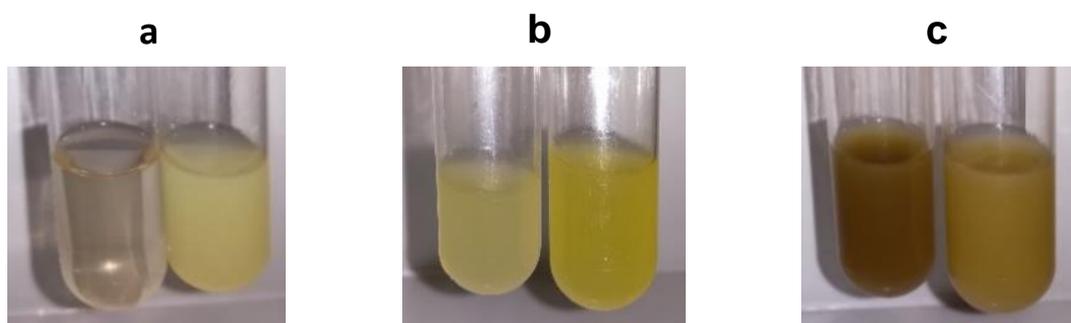
As no data are available relating such effect for hemp seed press-cake, the present results could be commented by comparison to other oilseed protein sources. For example, Nioi et al. (2012) and Yu, Ahmedna, & Goktepe (2007) investigated the effect of concentration of rapeseed press-cake and peanut flour respectively, on the amount of solubilized proteins during aqueous extraction at pH 2 or 10, respectively. In both cases, the authors observed an increase in the concentration of solubilized protein, proportional to the increase in flour or press-cake concentration. However, for peanut proteins, the extraction yield presented a maximum between 2 and 5% flour dispersions, and decreased from 5 to 10% flour dispersions. For rapeseed proteins, the extraction rate was constant for the aqueous dispersions below 12% press-cake concentration and decreased between 12% and 18% press-cake concentration, for the same reasons as indicated in the present work.

#### IV.2.1.4.5. Phenol observation and quantification in aqueous extracts

As observed from the previous results (Figure 11, 12 et 14), the significant coloration of aqueous extracts at alkaline pH and the formation of high molecular weight aggregates at pH 11 and 12, suggested the presence of phenolic compounds. Indeed, hemp seeds are rich in

phenolic compounds especially in hemp hull which is part of the hemp press-cake (Mattila, Pihlava, et al., 2018; Multari et al., 2016; Pihlanto et al., 2017; Pojić et al., 2014).

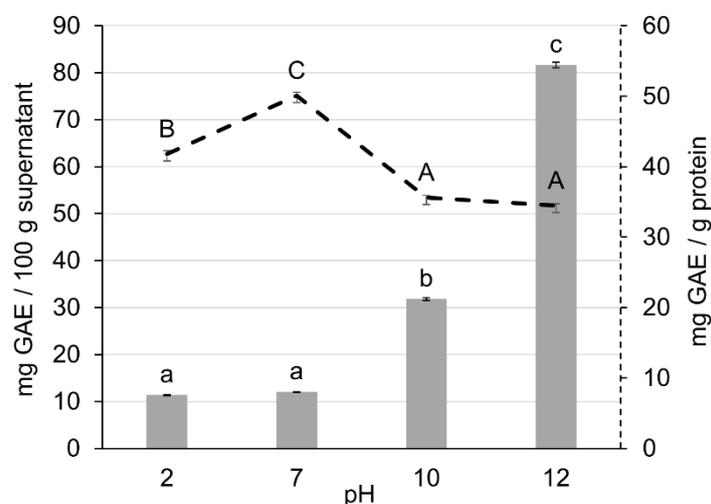
To evaluate the contamination in phenol compounds, other extraction experiments and total phenol assays were carried out. First, in order to assess if the increase in color with pH was caused by the chemical modification of phenolic compounds, 3 complementary experiments of extraction were achieved. The extractions were performed with a 10% (w/w) hemp press-cake suspension at pH 2, 7 and 12, then the pH of aqueous extracts were modified to observe any color changes (**Figure 16**). The shift of pH from 2 to 12 (**Figure 16a**) and from 7 to 12 (**Figure 16b**) resulted in a color turn of the protein samples, from uncolored to faint yellow and faint yellow to bright yellow, respectively. Conversely, decreasing the pH of the aqueous extract from 12 to 2 (**Figure 16c**) changed its color from dark brown to light brown.



**Figure 16:** Color observation of aqueous extracts under different pH conditions. After extraction at pH 2 (a), 7 (b) and 12 (c) (left tubes), pHs of aqueous extracts were shifted to 12, 12 and 2 respectively (right tubes).

It is known that the more stable forms of phenolic compounds are found under pH 7 and that an increase in pH is likely to change the coloring ability and reduce the biological activities of these molecules by chemical modifications (Cilliers & Singleton, 1989; Friedman & Jürgens, 2000; Matheis & Whitaker, 1984). In the present case, the color was affected by pH but increasing the pH of extraction led to increase the hue of the samples with probably gaining in pigment quantity as all the colors were different comparing the 3 samples at pH 12 (**Figure 16**). Moreover long extraction in alkaline conditions may produce condensation between phenolic compounds and proteins, leading to the generation of irreversible pigments, which is consistent with the SDS-PAGE results revealing the formation of covalent aggregates at pH>10 (Friedman & Jürgens, 2000; Matheis & Whitaker, 1984; Pourcel et al., 2007).

To obtain a semi-quantitative analysis of phenolic compounds, the Folin Ciocalteu method was applied to aqueous extracts at pH 2, 7, 10 and 12 (**Figure 17**). These assays showed that the amount of total phenolic compounds in the protein extracts was the lowest at pH 2 and 7 without significant difference between these samples (~12 mg of gallic acid equivalent / 100 g of aqueous extract). From pH 7, the phenol concentration in aqueous samples increased with pH to reach a maximum value at pH 12 (~82 mg gallic acid equivalent / 100 g of aqueous extract). These data may indicate a net increase in total phenolic compound content of the extracts with pH.



**Figure 17: Total phenolic content in aqueous extracts at different hydration pH.** GAE: gallic acid equivalent. Histograms with the left ordinate. Dotted curve with the right ordinate. Different letters represent significant differences at  $p < 0.05$ .

To compare the respective amounts of solubilized phenol and solubilized protein, the phenol concentrations were calculated in mg of gallic acid equivalent / g of protein. The total phenolic contents were 42 and 50 mg of gallic acid equivalent / g of protein at pH 2 and 7, respectively. The content values were the lowest at pH 10 and 12, without significant difference at approximately 35 mg of gallic acid equivalent / g of protein. Despite the increase in the amount of solubilized phenol with the hydration pH, hydration in an alkaline medium seemed to lead to higher ratios of solubilized protein/phenols.

According to literature data, hemp press-cakes contains about 1 to 3 mg of total phenols / g of protein (Galasso et al., 2016; Mikulec et al., 2019; Multari et al., 2016). In the present case, phenols have not been extracted from the aqueous protein extracts. The Folin Ciocalteu assay was performed directly on supernatants containing phenols and proteins. Hemp proteins, due to their antioxidant properties, may have contributed to the reduction of the Folin Ciocalteu

reagent (Ainsworth & Gillespie, 2007; Kim & Lee, 2011a; Teh et al., 2016). This may explain the higher values measured in the present work. On the other hand, protein concentrations had been standardized between all samples to limit this bias when applying the Folin Ciocalteu method. Thus, the assaying method made it possible to compare the samples with each other but not to determine the real quantity of total phenols.

#### **IV.2.1.5. Conclusion**

The present investigations regarding aqueous extraction of hemp protein from un-delipidated press-cakes indicated that the extraction yield was significantly enhanced at  $\text{pH} > 9$ . At these pH hemp globulins were preferentially extracted. At alkaline pH, the increase in salt content of press-cake suspensions did not lead to improve quantitatively and qualitatively the protein recovery, while initial 5-10% (w/w) press-cake suspension led to maximal extraction yield. The contamination of protein extracts by phenolic compounds was highlighted by strong pigmentation of the suspensions and net increase in total phenolic content with pH. The pH 11-12 condition appeared to be a limit for hemp protein extraction. Despite high extraction yield ( $>45\%$  (w/w)), high oxidation of phenolic compounds and their possible complexation with some hemp polypeptides at these pH could affect significantly the organoleptic and nutritional properties of the protein extract. Further protein isolation steps are necessary, for instance by membrane technology, to increase the purity of the protein extracts and to assess nutritional and techno-functional properties of hemp protein concentrates. This will also regulate the pH to an acceptable level from an organoleptic point of view.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté through the “plan d'actions régionales pour l'innovation” (PARI) and the European Union through the PO FEDER-FSE Bourgogne 2014/2020 programs (n° 2016-9205AAO033S03076 and BG0009561).

## IV.2.2. Extra article

### IV.2.2.1. Essais et comparaisons additionnels

#### IV.2.2.1.1. Coloration des surnageants de graines entières vs décortiquées

Afin de tester si la forte coloration des surnageants (**Figure 18**) est due à la présence de l'enveloppe des graines, des solubilisations ont été réalisées à pH 12 à partir d'un ratio massique tourteau de graines entières ou graines décortiquées/eau distillée de 10%.



**Figure 18** : Coloration des surnageants résultants de l'hydratation à pH 12 de tourteau de graines entières (à gauche) ou de graines décortiquées (à droite).

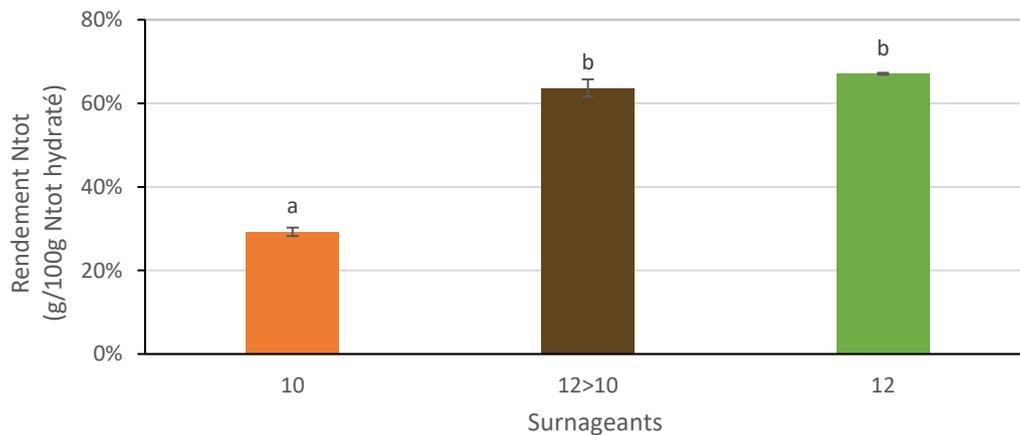
Les surnageants obtenus après centrifugation sont tous les deux opaques. En revanche, il est constaté que la couleur du surnageant est marron foncé dans le cas des tourteaux de graines entières, alors qu'elle est brun clair dans le cas des graines décortiquées. Ainsi un décorticage préalable des graines ne permettrait pas de résoudre significativement le problème de coloration.

La plus forte coloration observée dans le cas des tourteaux issus de graines entières, est cohérente avec le fait que la quantité de composés phénoliques est plus importante dans l'enveloppe des graines que dans la pulpe (Chen et al., 2012; Mattila, Pihlava, et al., 2018). Cette différence de coloration peut également être due aux différences de composition entre les composés phénoliques présents dans l'enveloppe et ceux présents dans la pulpe (Pihlanto et al., 2017; Pojić et al., 2014).

#### IV.2.2.1.2. Impact d'une diminution du pH post hydratation, sur le rendement d'extraction des protéines

Afin de tester s'il est possible de combiner les forts rendements d'extraction d'une hydratation avec un ratio massique tourteau/eau distillée de 10% à pH 12 (12), avec la qualité du profil

électrophorétique obtenue par une hydratation à pH 10 (10), un essai supplémentaire a été réalisé. Une hydratation à pH 12 a été effectuée, le pH du surnageant récupéré après centrifugation a été abaissé à 10 et une nouvelle centrifugation a été réalisée. Le surnageant a de nouveau été récupéré (12>10) et les rendements d'extraction ont été déterminés à chaque étape, par dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl. Les résultats sont présentés **Figure 19**.



**Figure 19 : Rendements d'extraction, après hydratation à pH 10 ou 12, et après abaissement successif du pH à 10, du surnageant obtenu après hydratation à pH 12. 10 et 12 les pH d'hydratation. 12>10 le surnageant obtenu suite à une hydratation à pH 12 et abaissement à pH 10. Ntot l'azote total. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .**

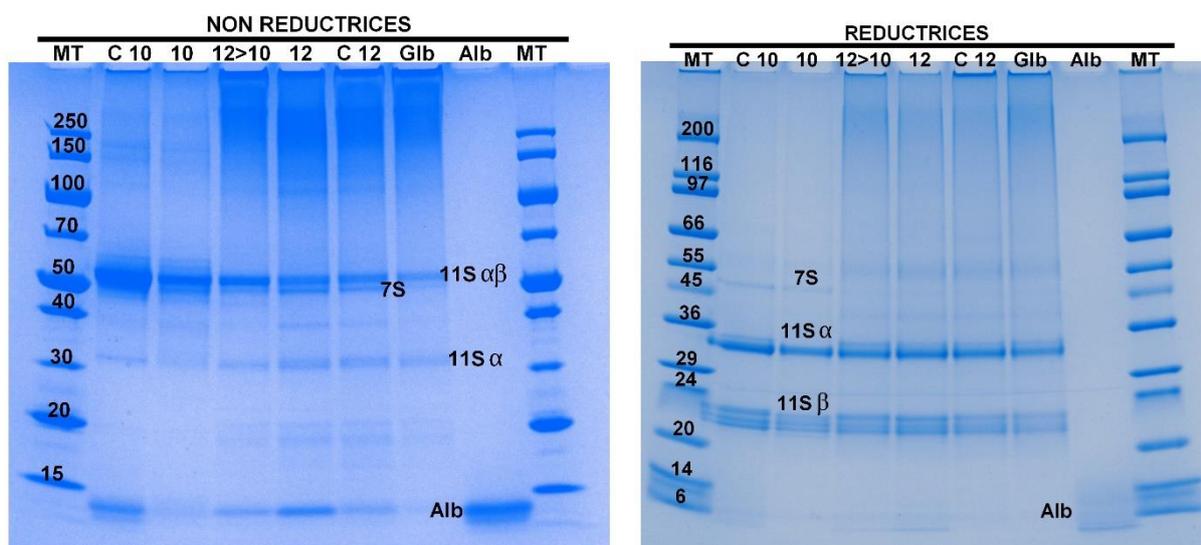
Abaisser le pH du surnageant de 12 à 10, n'entraîne pas de diminution significative du rendement d'extraction. Ainsi, des rendements d'extraction de 67% après hydratation à pH 12 (12), de 64% après hydratation à pH 12 et abaissement du pH à 10 (12>10), et de 17% après hydratation directe à pH 10 (10) sont constatés.

La nette différence de 35% de rendement d'extraction entre le surnageant protéique obtenu après hydratation à pH 10 (10) et celui obtenu après abaissement du pH à 10, successif à l'hydratation à pH 12 (12>10), montre que l'extractibilité des protéines ne dépend pas uniquement de leur solubilité. Si tel était le cas, le rendement d'extraction du surnageant obtenu à pH 12 et ajusté à pH 10 (12>10) aurait dû diminuer fortement pour atteindre un rendement d'extraction similaire à celui du surnageant obtenu après hydratation directe à pH 10 (10).

Pour permettre l'extraction des protéines, il est alors nécessaire d'avoir des conditions d'extraction permettant à la fois la libération des protéines des structures dans lesquelles elles sont contenues, ainsi que leur solubilisation. Un pH très alcalin peut en effet permettre à la fois la solubilisation des protéines et la déstabilisation des parois cellulaires (Bair, 1979; Jimenez-Lopez & Hernandez-Soriano, 2013; Sari et al., 2015; Young & Schadel, 1990).

### IV.2.2.1.3. Comparaison des profils électrophorétiques de divers extraits de protéines de chanvre

Les profils électrophorétiques de plusieurs échantillons ont été analysés (**Figure 20**). Ceux-ci incluent les surnageants de protéines totales obtenus après hydratation du tourteau à pH 10 ou 12 (notés 10 et 12), ceux obtenus après hydratation d'un isolat commercial à ces mêmes pH (notés C 10 et C 12), celui obtenu après hydratation du tourteau à pH 12, suivie d'un abaissement à pH 10 (noté 12>10), ainsi que les fractions de globulines et d'albumines séparées par précipitation au point isoélectrique (notées Glb et Alb) à la suite d'une extraction à pH 12.



**Figure 20 : Profils électrophorétiques de divers extraits de protéines de chanvre.** Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS), réductrices ou non réductrices (avec ou sans DTT). Dans les puits : MT le marqueur de taille ; C 10 et C 12 l'isolat commercial hydraté à pH 10 ou 12 ; 10 et 12 les surnageants de protéines totales après hydratation des tourteaux à pH 10 ou 12 ; 12>10 le surnageant obtenu après hydratation du tourteau à pH 12, abaissé à pH 10 ; Glb et Alb les surnageants de globulines et albumines résultants d'une extraction fractionnée au point isoélectrique. Quantité d'azote total standardisée dans tous les puits. 11S  $\alpha$  et 11S  $\beta$  les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'édestine 11S, et 11S  $\alpha\beta$  le monomère résultant de leur liaison. 7S la bande de globuline 7S et Alb les bandes d'albumines.

Aux pH respectifs, les isolats commerciaux (C10 et C12) et les surnageants de protéines totales obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 et 12 (10 et 12), présentent des profils électrophorétiques similaires. L'échantillon obtenu après hydratation du tourteau à pH 12 suivie d'un abaissement à pH 10 (12>10), montre un profil électrophorétique similaire au surnageant de protéines totales obtenu après hydratation du tourteau à pH 12 (12). Cela signifie l'absence de globuline 7S et la présence d'une bande d'agrégat à l'entrée des gels en conditions réductrices et non réductrices, indiquant la formation d'agrégats de plus de 200 kDa. La fraction de globulines (Glb) présente le même profil que le surnageant de protéines totales obtenu par hydratation du tourteau à pH 12 (12), avec également la présence d'agrégats, excepté l'absence des bandes d'albumines. Il est important de rappeler que pour l'obtention de la fraction de

globulines, l'hydratation du tourteau a également été réalisée à pH 12. La fraction d'albumines (Alb) quant à elle, présente uniquement les bandes d'albumines.

Il semblerait que lorsque les globulines passent par le pH 12, il y ait formation d'agrégats impliquant les globulines 7S. Ces agrégats sont certainement la résultante de complexations entre protéines et composés phénoliques. Cette agrégation ne semble pas être réversible ni par un abaissement de pH ultérieur, ni par l'ajout d'agent réducteur. Ceci suggère l'implication de liaisons covalentes dans la formation de ces complexes (Cilliers & Singleton, 1989; Friedman & Jürgens, 2000; Matheis & Whitaker, 1984; Ozdal et al., 2013; Pourcel et al., 2007). Jiang et al. (2009), Valenzuela et al. (2013) et Q. Wang et al. (2018), ont observé des comportements similaires pour les protéines de soja, de quinoa et de chanvre respectivement. En effet, un passage à pH 12 a entraîné leur dépliement et leur agrégation. De plus, Q. Wang et al. (2018), ont montré qu'abaisser le pH à 7 après un shift des globulines de chanvre à pH 12 pendant 60 min, ne permettait pas de restaurer complètement la structure initiale des protéines.

L'isolat commercial est annoncé comme ayant environ 66% (vérifié à 65,1%) de protéine et 14% de matière grasse. La présence de toutes les fractions protéiques dans cet isolat laisse penser qu'il a été obtenu par tamisage de tourteau de graines de chanvre. Les similarités de profils polypeptidiques avec les surnageants obtenus ici par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12, montrent que ces conditions d'hydratation peuvent fournir un produit similaire.

### **IV.3. Des extraits protéiques aux poudres protéiques**

#### **IV.3.1. Impact d'une étape de diafiltration et du mode de séchage**

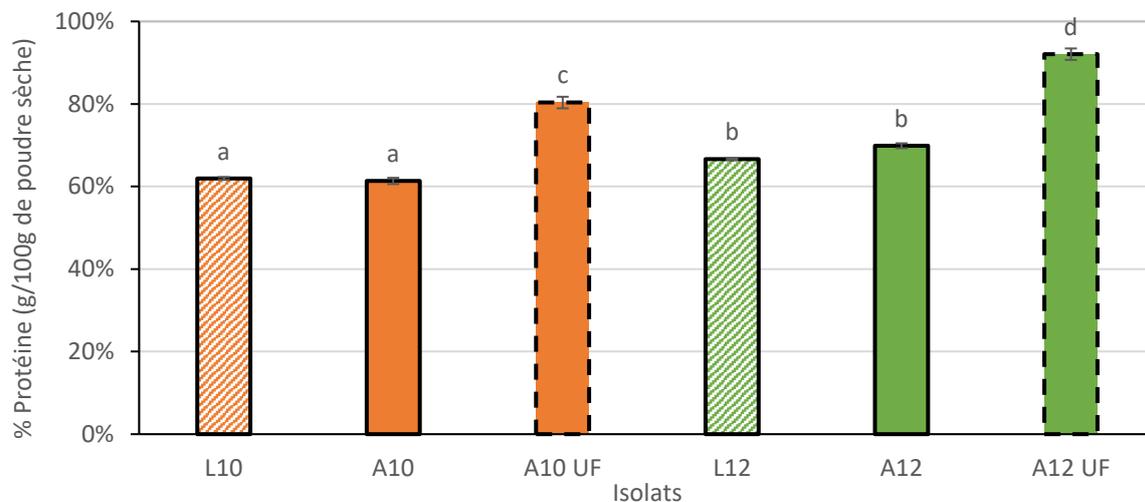
##### **IV.3.1.1. Pureté protéique des poudres**

###### **IV.3.1.1.1. Taux de protéine**

L'impact d'une étape de diafiltration sur système d'ultrafiltration à seuil de coupure de 5 kDa, par 5 diavolumes, sur le taux de protéines de poudres protéiques obtenues par lyophilisation ou atomisation a été étudié (**Figure 21**).

La teneur en protéines des différents isolats est comprise entre 61 et 92%. Aux mêmes conditions d'extraction, les teneurs en protéines des isolats obtenus à pH 12 sont plus élevées de 5 à 12%, par rapport à ceux obtenus à pH 10. L'étape de purification par ultrafiltration permet d'augmenter la teneur en protéines des isolats d'environ 20% (tout pourcentage en m/m, base sèche). Cette augmentation de la pureté protéique est certainement due à l'élimination de

composés <5 kDa, tels que les peptides, les minéraux et les oses. Le mode de séchage n'entraîne pas de modification significative de la pureté protéique.



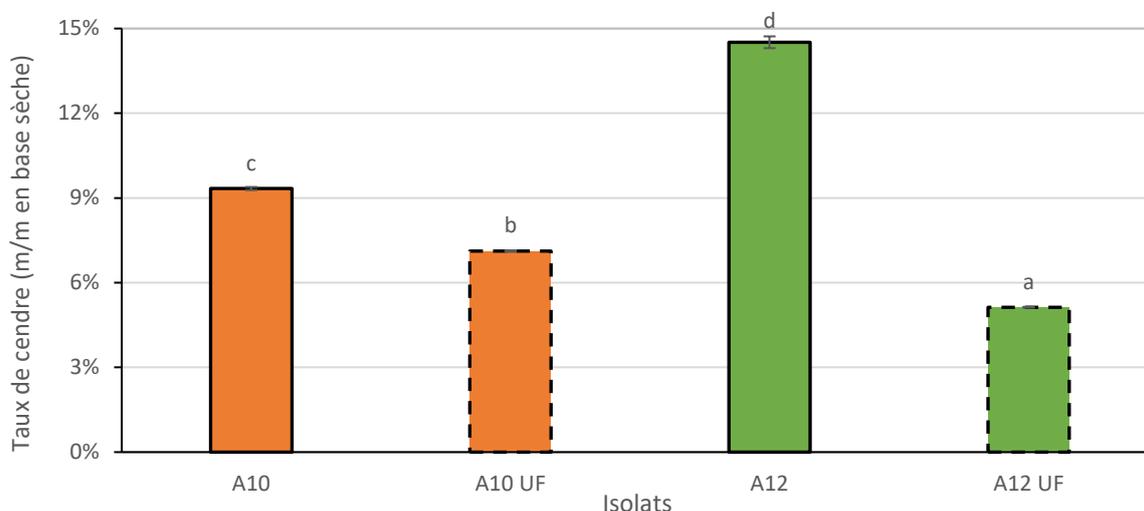
**Figure 21 : Taux de protéine des différents isolats.** La quantité de protéine a été déterminée par Kjeldahl après multiplication de l'azote total par 6,25. A et L : les isolats séchés par atomisation ou lyophilisation respectivement. 10 et 12 : les isolats obtenus après hydratation à pH 10 ou 12 respectivement. UF : les isolats obtenus après une étape de diafiltration (ultrafiltration à 5 kDa). Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Comme énoncé dans la partie bibliographique (**Chapitre I.2.1.3.1.4**), les protéines de chanvre sont généralement obtenues par solubilisation alcaline, précipitation au point isoélectrique des globulines puis lyophilisation. Sous ces conditions, les puretés protéiques des isolats de globuline de chanvre connues sont comprises entre 87 et 94% (Girgih et al., 2014, 2010; Hadnađev et al., 2018; Malomo & Aluko, 2016; Malomo et al., 2014; Mamone et al., 2019; Orio et al., 2017; Tang et al., 2006; Q. Wang et al., 2018; X.-S. Wang et al., 2009; Yin et al., 2008, 2007). Les auteurs, ayant appliqué une étape de dialyse avant celle de séchage par lyophilisation, ont obtenu des puretés protéiques comprises entre 93 et 94% (tous pourcentages m/m en base sèche)(Kim & Lee, 2011a; Ren et al., 2016; X.-S. Wang et al., 2008).

Ainsi, les isolats obtenus après hydratation à pH 12 et diafiltration, semblent présenter une pureté protéique comparable aux isolats de globulines de chanvre obtenus par la voie courante d'extraction au point isoélectrique en vigueur dans la littérature. Les plus faibles puretés protéiques, de valeurs 62% et 68% (m/m/ en base sèche), constatées sur nos isolats obtenus sans diafiltration et résultant d'extractions à pH 10 et 12 respectivement, peuvent être expliquées par le fait que l'étape de précipitation au point isoélectrique des globulines appliquée par les différents auteurs, permet certainement d'éliminer une partie des impuretés avec les surnageants d'albumines.

### IV.3.1.1.2. Taux de cendre

Le taux de cendre a été déterminé sur les différents isolats, obtenus à partir de tourteau hydraté à pH 10 ou 12, avec ou sans diafiltration et atomisation (**Figure 22**).



**Figure 22 : Taux de cendre des différents isolats.** A : les isolats obtenus par séchage par atomisation. 10 et 12 : les isolats obtenus après hydratation à pH 10 ou 12. UF : les isolats obtenus après une étape de diafiltration à l'ultrafiltration. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

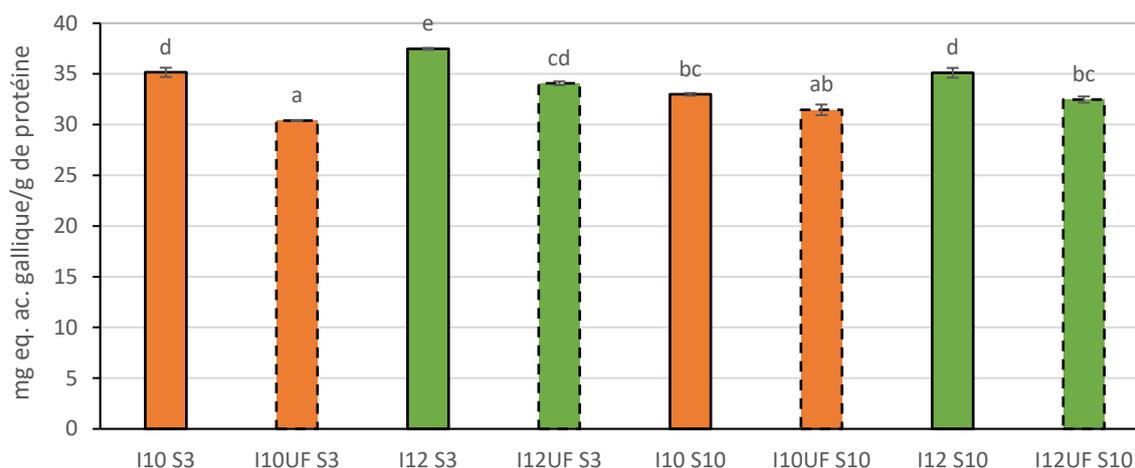
Le taux de cendre varie de 5,1% à 14,5%. Parmi les isolats obtenus sans diafiltration, ceux obtenus après hydratation à pH 10 ont un taux de cendre plus faible que ceux obtenus à pH 12 (9,3% contre 14,5%). L'étape de diafiltration permet de diminuer le taux de cendre passant à 6,9% pour les échantillons à pH 10 et à 5% (tous les pourcentages et suivants en m/m, base sèche) pour les échantillons à pH 12.

Des valeurs du taux de cendre d'isolats de protéine de chanvre, obtenues à partir de tourteau de graines décortiquées par solubilisation alcaline et précipitation au point isoélectrique, ont été rapportées dans la littérature. Ces valeurs sont comprises entre 0,51% et 2,71% (Mamone et al., 2019; Tang et al., 2006; X.-S. Wang et al., 2008). X.-S. Wang et al. (2008), ont ajouté une étape de dialyse avant la lyophilisation et ont rapporté un taux de cendre de 2,45%.

Ainsi, les taux de cendre relevés dans la littérature sont plus faibles que ceux obtenus dans notre étude. Dans les travaux antérieurs cités, une partie des minéraux a pu être éliminée avec le décorticage des graines ou dans les surnageants d'albumines obtenus suite à la précipitation isoélectrique des globulines. La diminution du taux de cendre suite à la diafiltration est cohérente avec l'augmentation de pureté protéique décrite au paragraphe précédent.

### IV.3.1.1.3. Phénols totaux

Les phénols totaux ont été dosés sur les surnageants de protéines solubles obtenus par solubilisation à pH 3 ou 10 des différents isolats séchés par atomisation. Tous les isolats ont été obtenus par hydratation de 10% de tourteau à pH 10 ou 12, avec ou sans diafiltration et séchage par atomisation. Les résultats sont présentés en mg équivalent d'acide gallique par g de protéine (**Figure 23**).



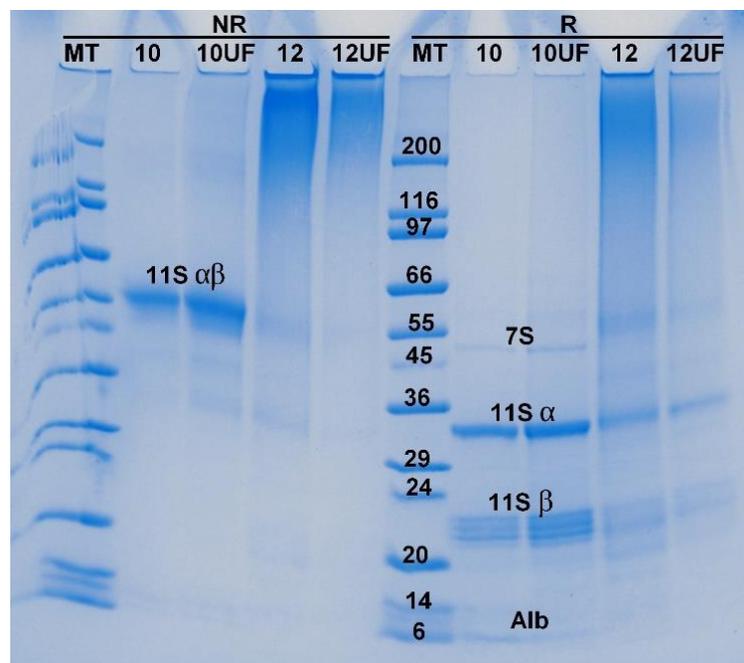
**Figure 23 : Impact du procédé de diafiltration par ultrafiltration sur la quantité de phénols totaux.** En ordonnée la quantité de phénols totaux en mg équivalent d'acide gallique par g de protéine. I10 et I12 : les isolats obtenus après hydratation des tourteaux à pH 10 ou 12. UF : les isolats obtenus après une étape de diafiltration. S3 et S10 : les surnageants de protéines solubles obtenus par solubilisation des isolats à pH 3 ou 10. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Les teneurs en phénols totaux sont comprises entre 30,4 et 37,5 mg eq. ac. gallique/g de protéine. Les isolats obtenus à pH 12 (I12) ont des quantités de phénols totaux légèrement plus élevées de 1 à 3,7 mg eq. ac. gallique/g de protéine, par rapport aux isolats obtenus à pH 10 (I10). L'étape de diafiltration avant séchage permet de diminuer la quantité de phénols de 1,5 à 4,8 mg eq. ac. gallique/g de protéine.

La teneur élevée en phénols totaux par rapport aux données existant dans la littérature a déjà été expliquée dans le **Chapitre IV.2.1.4.5** (Galasso et al., 2016; Hadnađev et al., 2018; Mikulec et al., 2019; Multari et al., 2016). L'augmentation de pureté des isolats protéiques après diafiltration semble alors due plus à l'élimination de composés solubles de petite taille comme des oses, des minéraux ou des peptides, qu'à l'élimination des phénols au vu des faibles quantités éliminées dans cette étape.

### IV.3.1.2. Profil électrophorétique

La composition polypeptidique des différents isolats séchés par atomisation a été analysée sur gel d'électrophorèse (**Figure 24**).



**Figure 24 : Profil électrophorétique des différents isolats.** Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS), réductrices (R) ou non réductrices (NR) (avec ou sans DTT). Dans les puits : MT le marqueur de taille ; 10 et 12 les isolats obtenus après hydratation à pH 10 ou 12 ; UF ceux obtenus après étape de diafiltration. Quantité d'azote total standardisée dans tous les puits. 11S  $\alpha$  et 11S  $\beta$  les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'édestine 11S, et 11S  $\alpha\beta$  le monomère résultant de leur liaison. 7S la bande de globuline 7S et Alb les bandes d'albumines.

Les isolats protéiques obtenus après hydratation à pH 10 présentent toutes les bandes caractéristiques de globulines 11S, 7S et d'albumines. Les isolats obtenus après hydratation à pH 12 ont des profils électrophorétiques moins nets. En effet, une bande sur la ligne de dépôt et des traînées à l'entrée des gels sont observées, témoignant de la formation d'agrégats. Ainsi, les bandes de globulines 11S et d'albumines sont moins intenses, et la bande de globuline 7S n'est pas détectée.

L'ajout d'une étape de diafiltration n'a pas d'impact sur les profils électrophorétiques, comparés à ceux des isolats obtenus dans les mêmes conditions expérimentales mais sans diafiltration. Le profil électrophorétique des différents isolats est alors similaire au profil électrophorétique observé lors des tests préliminaires sur les surnageants obtenus après hydratation des tourteaux à ces mêmes pH (**Chapitre IV.2.1.4.2**).

Les bandes d'agrégation pour les isolats extraits à pH 12 sont présentes en conditions non réductrices et réductrices. Il semblerait alors que la formation de ces agrégats implique d'autres

types de liaison que les liaisons hydrophobes et disulfures. Comme suggéré dans le **Chapitre IV.2.2.1.3**, ces agrégats résultent certainement de la complexation des protéines avec des composés phénoliques via des liaisons covalentes (Cilliers & Singleton, 1989; Friedman & Jürgens, 2000; Matheis & Whitaker, 1984; Ozdal et al., 2013; Pourcel et al., 2007). La plus faible intensité des bandes de globulines et d'albumines très marquée sur ce gel après extraction à pH 12, suggère une implication de l'ensemble des globulines et des albumines dans la formation de ces agrégats.

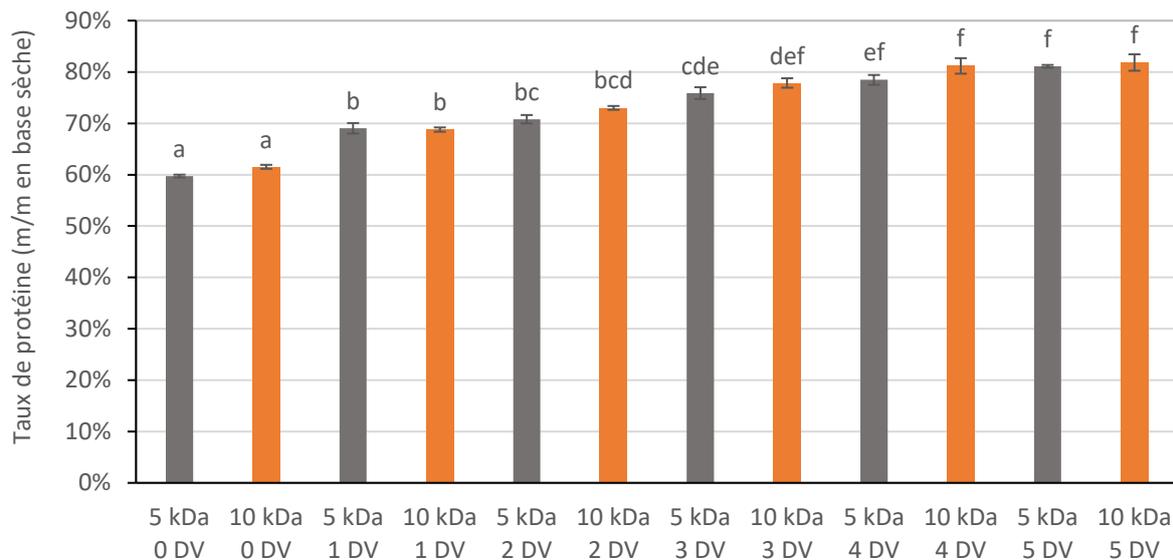
Contrairement à nous, Q. Wang et al. (2018), ont observé qu'un shift des protéines de chanvre de 60 min à pH 12, entraînait la formation d'agrégats impliquant d'autres types de liaisons qu'hydrophobes ou disulfures seulement à des températures de 50 à 80 °C, appliquées pendant le shift. A des températures pendant le shift de 20 à 40 °C, ces auteurs n'ont plus observé les agrégats en conditions réductrices, témoignant de l'implication de ponts disulfures. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que Q. Wang et al. (2018), ont préalablement délipidé le tourteau à l'hexane, diminuant ainsi la quantité de phénols et limitant la complexation des protéines et des phénols. Les agrégats qu'ils ont observés ont par conséquent dû être formés majoritairement par agrégation des protéines.

### **IV.3.1.3. Optimisation du procédé d'ultrafiltration : diavolumes et seuils de coupure des membranes**

#### **IV.3.1.3.1. Taux de protéine**

Afin de déterminer les conditions de filtration à appliquer pour purifier les surnageants protéiques, le surnageant de protéines obtenu par hydratation du tourteau à pH 10 a été filtré par 0 à 5 diavolumes (DV) avec un seuil de coupure des membranes d'ultrafiltration de 5 ou 10 kDa. Les solutions résultantes ont été séchées par lyophilisation et leur pureté protéique a été déterminée (**Figure 25**).

Pour un même nombre de diavolume (DV), aucune différence significative n'est observée entre le taux de protéines des isolats diafiltrés par ultrafiltration avec un seuil de coupure de 5 kDa et de 10 kDa. La pureté protéique des isolats varie de 59,7% à 81,8% (base sèche). Elle augmente avec l'augmentation du nombre de diavolume. Le taux de protéines maximal est atteint à partir de 3 diavolumes à 10 kDa, et à partir de 4 diavolumes à 5 kDa. Au-delà de ces diavolumes, jusqu'à 5 diavolumes, le taux de protéine reste maximal et constant.



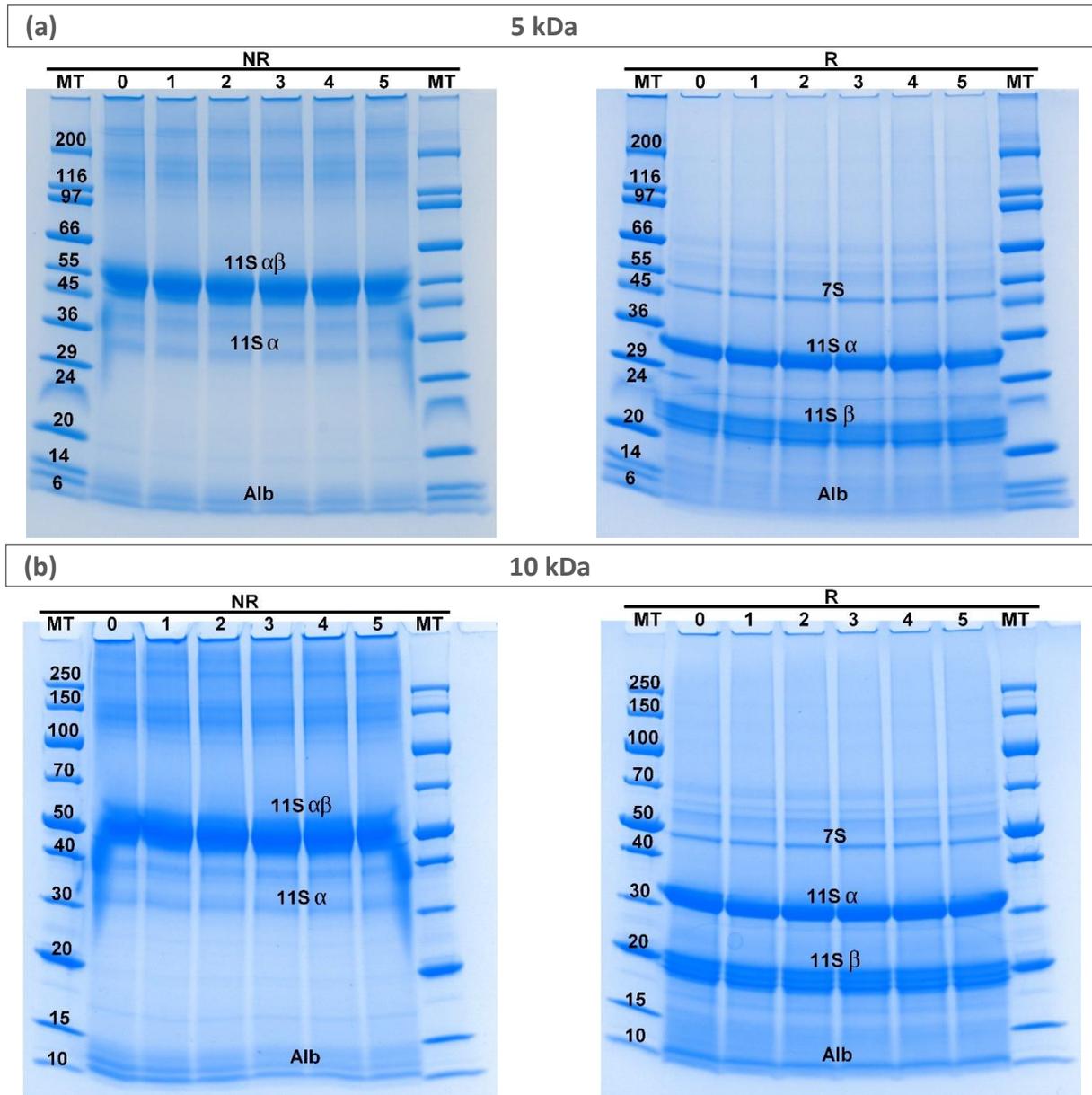
**Figure 25 : Taux de protéines des isolats en fonction du seuil de coupure et du nombre de diavolume.** DV, le nombre de diavolumes d'eau distillée à pH 10. 5 et 10 kDa, les seuils de coupure utilisés. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

#### IV.3.1.3.2. Profil polypeptidique

L'impact, du nombre de diavolume et du seuil de coupure des membranes d'ultrafiltration, a été étudié sur les profils électrophorétiques des isolats obtenus par hydratation des tourteaux à pH 10 et séchage par lyophilisation (**Figure 26**).

Les différentes bandes caractéristiques d'edestine 11S, de globulines 7S et d'albumines sont observées. Le nombre de diavolume n'a pas d'impact sur les profils électrophorétiques. De même, aucune différence de profil n'est constatée entre les isolats obtenus selon des seuils de coupure de 5 kDa et de 10 kDa. Mêmes les bandes d'albumines qui auraient pu être éliminées par l'application d'un seuil de coupure de 10 kDa, sont toujours présentes sur les gels d'électrophorèse.

Ainsi, pour la réalisation des pools d'isolats un seuil de coupure de 10 kDa a été choisi, étant donné qu'il n'entraîne pas de différences avec le seuil de coupure de 5 kDa et que la diafiltration s'effectue plus rapidement avec un seuil de coupure plus élevé. Le nombre de diavolume a été fixé à 4, puisqu'il permet d'obtenir le taux de pureté protéique le plus élevé. Deux principaux biais de l'ultrafiltration ont été constatés à l'échelle du laboratoire. Les débits au perméat sont très faibles, entraînant un procédé de purification très long (~1h30/L de solution de diafiltration). De plus au cours du passage du produit, les cassettes de membranes organiques d'ultrafiltration se colmatent fortement. Le débit de perméat diminue progressivement et n'est jamais restauré entièrement après le nettoyage des cassettes.



**Figure 26 : Profil électrophorétique en fonction du seuil de coupure et du nombre de diavolumes.** Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS), réductrices (R) ou non réductrices (NR) (avec ou sans DTT). (a) seuil de coupure de 5 kDa et (b) seuil de coupure à 10 kDa. Dans les puits : MT le marqueur de taille et 0 à 5 le nombre de diavolume d'eau distillée à pH 10. 11S  $\alpha$  et 11S  $\beta$  les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'édestine 11S, et 11S  $\alpha\beta$  le monomère résultant de leur liaison. 7S la bande de globuline 7S et Alb les bandes d'albumines. Quantité d'azote total standardisée dans tous les puits.

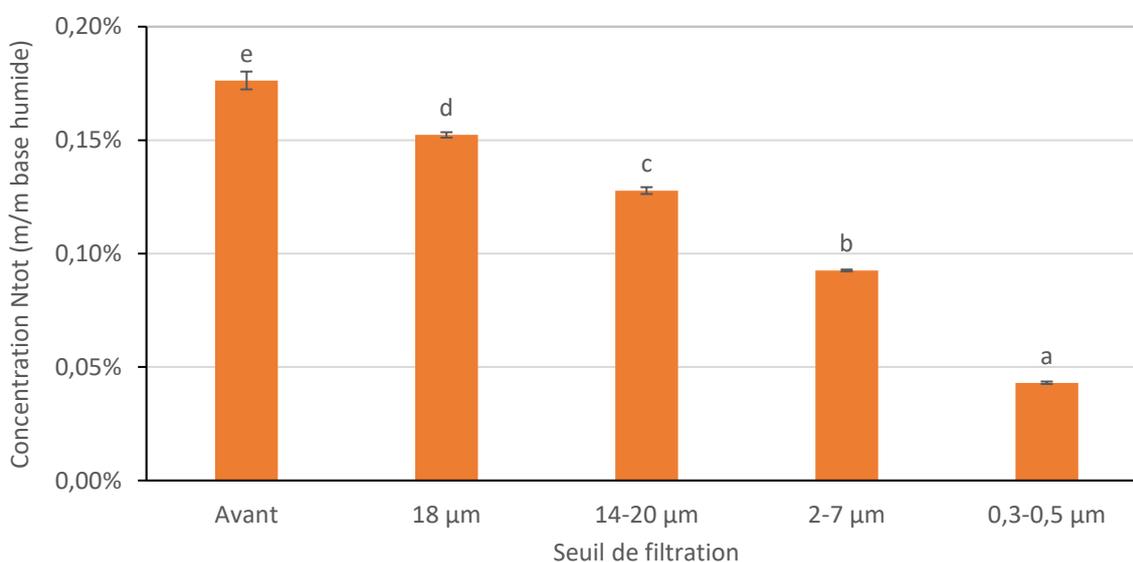
#### IV.3.1.4. Impact d'une étape supplémentaire de filtration frontale

L'ultrafiltration étant limitante, du fait du colmatage et de très faibles débits, la filtration frontale à plaques a été testée pour vérifier si ce procédé pouvait limiter le colmatage des cassettes d'ultrafiltration par élimination d'éléments colloïdaux. Les surnageants protéiques résultant de l'hydratation du tourteau à pH 10 ont ainsi été filtrés par filtration frontale, sous

différentes conditions et les concentrations en azote total et en phénols totaux des filtrats ont été analysés.

#### IV.3.1.4.1. Concentration en azote total en fonction du seuil de filtration

Différentes plaques de filtration, de seuil de filtration différents ont été testées. Les seuils de filtration étudiés ont été 18, 14-20, 2-7 et 0,3-0,5  $\mu\text{m}$ . Après la filtration, les surnageants sont devenus beaucoup plus limpides et moins colorés. Afin de savoir si cette clarification est due à une perte de protéines, la concentration en azote total a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (**Figure 27**).

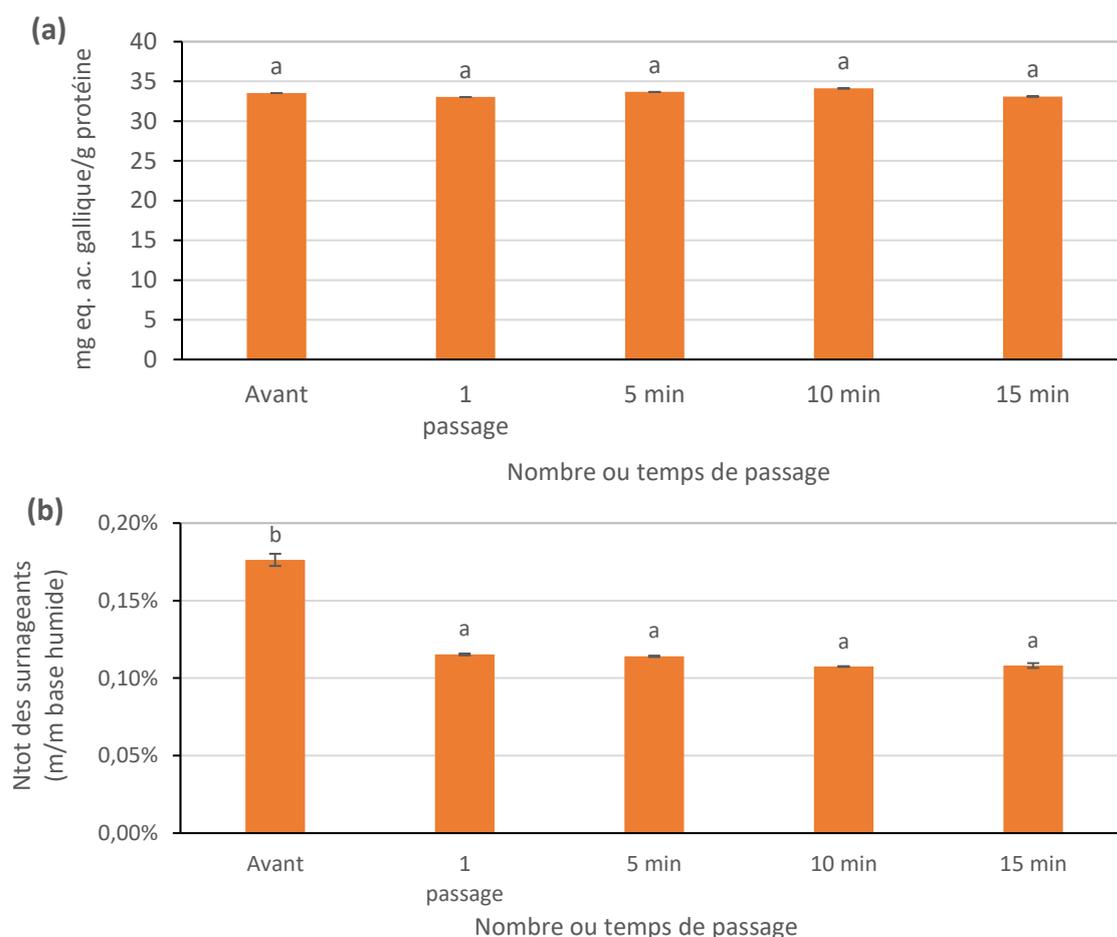


**Figure 27 : Concentration en azote total en fonction du seuil de filtration frontale.** En ordonnée la concentration en azote total (Ntot) des surnageants après filtration. Avant, le surnageant avant filtration. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

La concentration en azote total diminue proportionnellement à la diminution du seuil de filtration passant de 0,18% avant filtration à 0,04% après filtration avec un filtre de 0,3-0,5  $\mu\text{m}$ . Ainsi plus le seuil de filtration est faible, plus la perte en protéines est importante. La clarification des filtrats semble être majoritairement due à la diminution de la concentration protéique, probablement engendrée par une adsorption des protéines aux filtres, ou à la présence d'agrégats de taille supérieure au seuil de coupure. La présence de matière grasse dans les surnageants pourrait favoriser le colmatage des filtres.

### IV.3.1.4.2. Phénols totaux et concentration en azote total en fonction du temps de filtration

Afin de déterminer si la filtration frontale permettait une diminution de la quantité de phénols totaux, les surnageants de protéines à pH 10 ont été filtrés à 14-20  $\mu\text{m}$  et dosés au Folin Ciocalteu (**Figure 28a**). Sous les mêmes conditions, la quantité d'azote total a été déterminée par la méthode de Kjeldahl (**Figure 28b**). Différents temps de passage ont été étudiés, afin de voir l'impact sur le colmatage des filtres.



**Figure 28 : Phénols totaux et concentrations en azote en fonction du nombre ou du temps de passage à la filtration frontale.** (a) phénols totaux dosé au Folin Ciocalteu sur les surnageants protéiques après filtration. En ordonnée la quantité de phénols totaux en mg équivalent d'acide gallique par g de protéine. (b) concentration en azote total (Ntot) des surnageants après filtration. Avant, les surnageants avant filtration. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

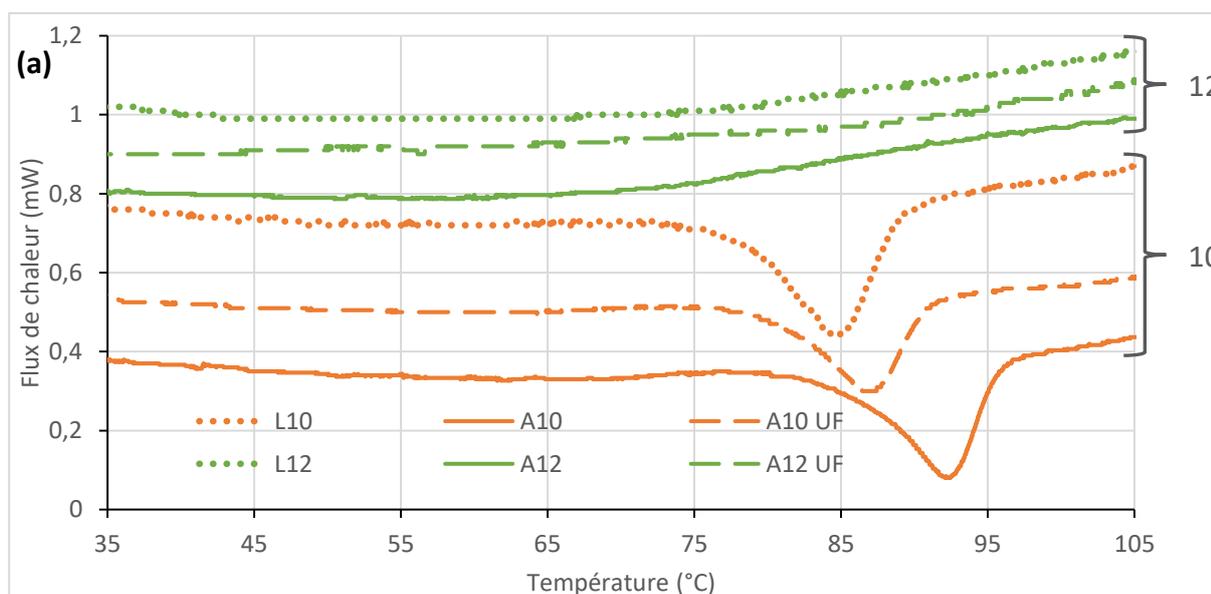
Aucune différence significative de la quantité de phénols totaux en mg équivalent d'acide gallique par g de protéine n'est observée, quel que soit le nombre de passage ou le temps de passage.

La concentration en azote total des surnageants quant à elle, diminue passant de 0,18% avant filtration à 0,11% en moyenne après filtration. Aucune différence significative n'est observée entre les différents temps de passage à la filtration frontale. La diminution proportionnelle de la concentration en azote et en phénol, renforce l'hypothèse que des phénols pourraient être complexés aux protéines.

Face à ces résultats négatifs, les investigations sur la filtration frontale n'ont pas été poursuivies. En effet, même si ce traitement préliminaire permettait de résoudre les problèmes de colmatage des cassettes d'ultrafiltration, la perte protéique n'est pas viable d'un point de vue économique. La filtration frontale a donc été écartée et l'ultrafiltration a été conservée telle quelle malgré ses limites.

### IV.3.1.5. DSC

Afin de tester le degré de dénaturation des protéines contenues dans les isolats, des analyses calorimétriques ont été effectuées par DSC (**Figure 29**).



(b)	Ton (°C)	Tof (°C)	Td (°C)	$\Delta H$ (J/g de protéine)
<b>A10</b>	86,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	94,6 ± 1,1 <sup>b</sup>	92,4 ± 0,2 <sup>c</sup>	11,4 ± 0,2 <sup>b</sup>
<b>A10UF</b>	80,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	91,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	87,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>a</sup>
<b>L10</b>	79,9 ± 1,3 <sup>a</sup>	88,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	84,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,3 <sup>a</sup>

**Figure 29 : Calorimétrie des différents isolats protéiques.** A, les isolats obtenus par atomisation et L, ceux obtenus par lyophilisation. 10 et 12, les isolats obtenus après hydratation des tourteaux à pH 10 ou 12. UF, les isolats obtenus après étape de diafiltration. (a) thermogrammes des isolats. (b) tableau des valeurs obtenues par DSC. Ton la température onset. Tof la température offset et Td la température de dénaturation.  $\Delta H$  l'enthalpie de dénaturation. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Seuls les isolats obtenus à pH 10 montrent un pic unique de dénaturation. Ceux obtenus à pH 12 ne présentent aucun pic de dénaturation, indiquant soit la présence de protéines dénaturées uniquement, soit un réarrangement des protéines avec des températures de dénaturation supérieures à 120 °C (maximum de température testé en DSC, non présenté ici). Ce réarrangement pourrait être lié à la formation d'agrégats au vu des profils électrophorétiques. La dénaturation pourrait être liée à une déstabilisation de la structure tertiaire des globulines due à de fortes forces de répulsions électrostatiques, comme suggéré par Jiang, Xiong, & Chen (2010), après constatation du même phénomène suite à un shift des globulines de soja à pH 12. Perutz (1974), a suggéré que la dénaturation alcaline des globulines était due au dépliement de ces dernières entraîné par une charge de surface élevée. Cette dernière entraîne dans le cœur des globulines de fortes répulsions électrostatiques et la formation d'enveloppes d'hydratation autour des groupes protéiques chargés qui à leur tour entraînent des répulsions d'hydratation. Sripad & Rao (1987), quant à eux, ont observé qu'un pH 12 entraînait la dissociation des sous unités de globulines 11S de tournesol puis leur dénaturation. Yin et al. (2008), ont constaté une nette diminution de l'enthalpie de dénaturation après hydrolyse des isolats de globuline de chanvre par la trypsine. Selon ces auteurs, ce traitement a entraîné la formation de petits peptides et d'agrégats solubles, diminuant les proportions de structures ordonnées des protéines et par conséquent, diminuant l'enthalpie de dénaturation. L'absence de pic de dénaturation des isolats obtenus après hydratation à pH 12 pourrait être due à ces phénomènes.

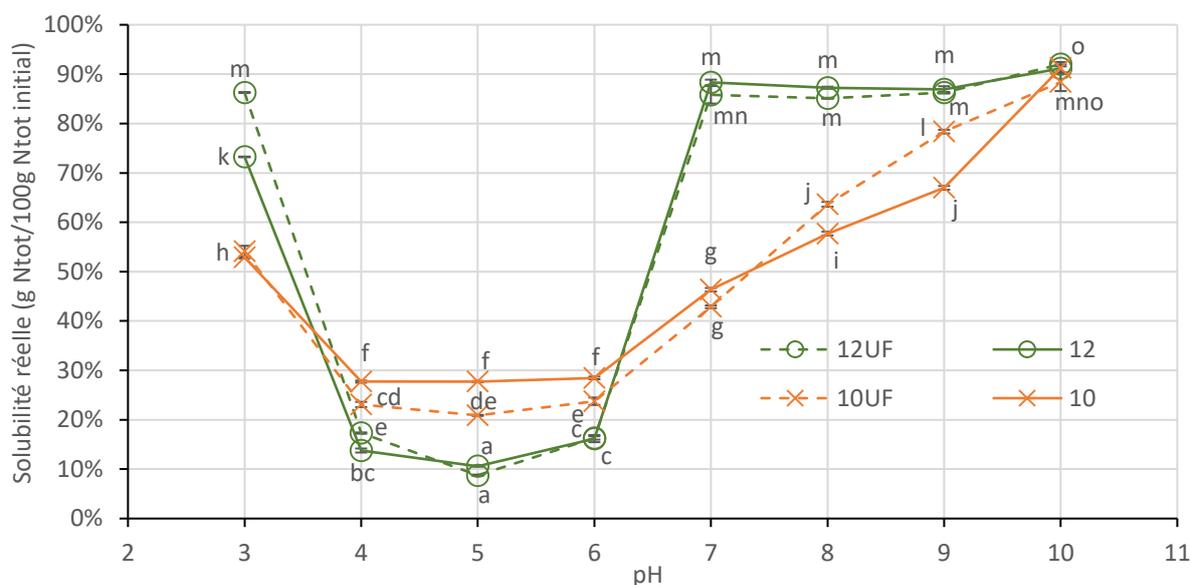
Concernant les isolats obtenus à pH 10 par atomisation (A10 et A10 UF), la température de dénaturation est plus élevée sans diafiltration (92 contre 97 °C). L'enthalpie de dénaturation est de 11,4 J/g de protéine sans diafiltration contre 9,3 J/g de protéine avec ultrafiltration. Afin de vérifier si le séchage par atomisation entraînait une dénaturation des protéines plus importante que le séchage par lyophilisation, un isolat obtenu par hydratation du tourteau à pH 10 et séché par lyophilisation a été réalisé (L10). Il possède une température de dénaturation de 84,4 °C et une enthalpie de dénaturation de 9,5 J/g de protéine. Cette enthalpie de dénaturation est du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les isolats réalisés au même pH et séchés par atomisation. Les conditions d'atomisation utilisées ici, ne semblent alors pas dénaturantes.

Ces résultats sont en adéquation avec les valeurs obtenues sur des isolats de globulines de chanvre séchés par lyophilisation dans la littérature. Hadnađev et al. (2018), Tang et al. (2006) et Yin et al. (2008), ont rapporté des températures de dénaturation comprises entre 93,5 et 95,1 °C et d'enthalpie de dénaturation comprises entre 11,8 et 11,9 J/g. X.-S. Wang et al. (2008), qui ont ajouté une étape de dialyse en cours d'extraction, ont rapporté des valeurs de

température de dénaturation de 92 °C, et d'enthalpie de 9.4 J/g. La dialyse, qui permet d'éliminer les sels, semble diminuer la température de dénaturation. Ceci est cohérent avec le fait que les sels peuvent jouer un rôle protecteur des protéines contre la dénaturation thermique (Damodaran, 1997; Jiang et al., 2010).

### IV.3.1.6. Solubilité

La solubilité des différents isolats séchés par atomisation en fonction du pH, a été déterminée à 0,5 g de protéine/100g de solution (**Figure 30**).



**Figure 30 :** Courbes de solubilité protéique en fonction du pH des différents isolats protéiques. En ordonnée la solubilité de l'azote total (Ntot) en g d'azote total récupéré dans le surnageant pour 100 g d'azote initial au cours de l'hydratation. 10 et 12, les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. UF, les isolats obtenus aux mêmes pH mais avec une étape de diafiltration additionnelle. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Un profil de solubilité classique en forme de U est obtenu, avec un minimum de solubilité au point isoélectrique constaté proche de pH 5 ; ce minimum est compris entre 6% pour les isolats obtenus à pH 12 et 28% pour l'isolat obtenu à pH 10 sans diafiltration. En s'éloignant de ce point isoélectrique, vers des pH plus acides et plus basiques, la solubilité augmente du fait de l'augmentation de la charge nette des protéines. Elle est la plus élevée à pH 10 avec 90% de solubilité, sans différence significative entre les différents isolats.

Quelques différences sont observées entre les isolats obtenus à pH 10 et ceux obtenus à pH 12. Ceux obtenus à pH 10 ont une solubilité plus faible à pH 3, 7, 8 et 9. La différence est la plus marquée à pH 3 avec des solubilités allant de 53% pour les isolats obtenus à pH 10 à 86% pour l'isolat obtenu à pH 12 avec diafiltration (12UF). En revanche, les isolats obtenus à pH 10 ont

une solubilité plus élevée aux pH 4, 5 et 6. Les isolats obtenus à pH 10 ont une solubilité qui augmente linéairement entre pH 6 et 10, alors que les isolats obtenus à pH 12 ont une augmentation importante de solubilité entre pH 6 et 7, qui se stabilise au maximum de solubilité entre pH 7 et 10. L'étape de diafiltration n'a pas de net impact sur les profils de solubilité.

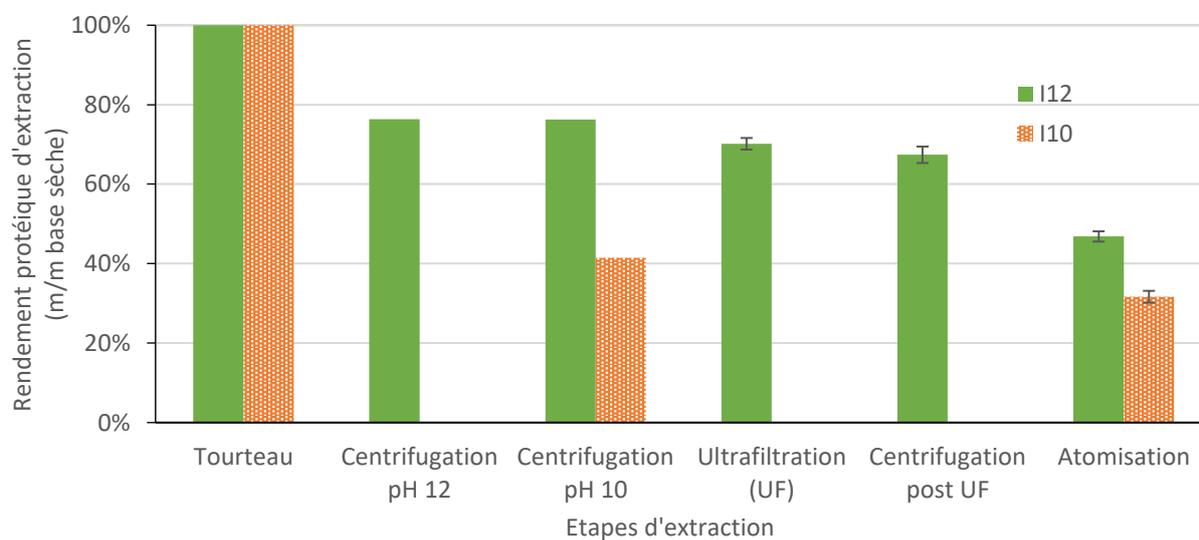
Jiang et al. (2010), ont observé les mêmes différences de profils de solubilité entre des glycinines 11S de soja natives et après un shift à pH 12. Après ce shift, ces auteurs ont constaté une nette augmentation de la solubilité entre pH 5,5 et pH 6, qui a atteint ~85% et est restée constante jusqu'au pH le plus alcalin étudié (pH 8). La solubilité des glycinines 11S natives a augmenté linéairement entre pH 5,5 (~10%) et pH 8 (~85%). Dans leur précédent article de 2009 (Jiang et al., 2009), ces auteurs ont observé que le shift à pH 12 entraînait un dépliement partiel des globulines, un clivage de quelques ponts disulfures et menait à une structure en « globule fondu » qui conserve la structure secondaire initiale des globulines et leur compacité, mais perd une partie de la structure tertiaire. Ces modifications seraient favorables à la solubilité des globulines. Etonnamment, Yin et al. (2008), ont obtenu après hydrolyse enzymatique des globulines de chanvre par la trypsine, des solubilités réelles identiques en termes de profils et de valeurs à celles obtenues sur nos isolats extraits à pH 12. Au regard de leurs différents résultats, ces auteurs ont attribué l'augmentation de solubilité suite à l'hydrolyse par la trypsine, à la formation conjointe de peptides et d'agrégats solubles. Il est probable que le réarrangement des protéines en agrégats à pH 12 constaté dans nos travaux (**Chapitres IV.2.1.4.2, IV.2.2.1.3 et IV.3.1.2**), ait favorisé l'exposition des groupements hydrophiles en surface des protéines, favorisant leur interaction avec les molécules d'eau et ainsi leur solubilité (Chihi, Mession, Sok, & Saurel, 2016; Clark, Kavanagh, & Ross-Murphy, 2001).

Les profils de solubilité obtenus ici pour l'ensemble des isolats sont relativement similaires à ceux obtenus pour des isolats de globuline de chanvre dans la littérature (Dapčević-Hadnađev et al., 2019; Hadnađev et al., 2018; Kim & Lee, 2011a; Malomo & Aluko, 2015b; Malomo et al., 2014; Tang et al., 2006; Q. Wang et al., 2018). Tous ces auteurs ont étudié les solubilités relatives. Cela signifie que la solubilité de leurs échantillons solubilisés dans du NaOH 0,1 M est considérée comme étant 100% de solubilité. La quantité d'azote soluble des échantillons aux différents pH est alors rapportée à celle correspondant au 100% de solubilité dans le NaOH 0,1 M. Ainsi, cette technique permet d'obtenir l'allure des courbes de solubilité mais sans indication directe sur les valeurs de solubilités réelles. Les seuls auteurs à avoir étudié la solubilité réelle des isolats de globulines de chanvre sont Yin et al. (2008; 2009). Comme pour nos isolats, sur la gamme de pH 3 à 10, ces auteurs ont obtenu un minimum de solubilité autour

de pH 5. En revanche, les valeurs de solubilité réelle que nous avons obtenues, ont été plus élevées à tous les pH que celles rapportées par ces auteurs. Ces derniers ont rapporté des solubilités de 31% à pH 3, de 2% à pH 5 et de 56% à pH 10. Les valeurs de solubilité réelle obtenues sur nos isolats sont comprises entre 53% et 86% à pH 3, entre 9% et 28% à pH 5 et entre 88% et 92% à pH 10. Cette différence peut s'expliquer par les procédés d'extraction différents, car les auteurs précédents ont appliqué une précipitation au point isoélectrique pour obtenir des isolats de globulines seulement. Or, les isolats que nous avons obtenus, sont constitués de globulines et d'albumines. Les albumines ont selon Malomo & Aluko (2015a), des solubilités relatives plus élevées que les globulines sur l'ensemble des pH. Il est également possible qu'après précipitation au point isoélectrique des globulines, une partie d'entre elles reste sous la forme d'agrégats insolubles, entraînant une diminution de la solubilité des isolats (Aluko, 2017).

### IV.3.2. Rendement d'extraction

Selon les conditions d'extractions définies pour la constitution des pools d'isolats protéiques (**Chapitre III.2.2.5**), les rendements d'extraction ont été déterminés après chaque étape. Les résultats sont présentés sur la **Figure 31**.



**Figure 31 : Rendements protéiques aux différentes étapes d'extraction.** I10 et I12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. UF l'étape de diafiltration par ultrafiltration.

Pour l'extraction à pH 12, après hydratation et centrifugation, 76% des protéines sont récupérées. Les protéines éliminées correspondent aux protéines non solubles, ainsi qu'à celles non extraites du tourteau. Après abaissement du pH à 10 et nouvelle centrifugation, aucune perte de protéine n'est constatée. L'étape d'ultrafiltration mène à un rendement protéique de

70%. Certaines protéines ont pu être éliminées dans le perméat, notamment des protéines <10 kDa, telles que les albumines. Une partie de la perte a certainement été occasionnée par l'adsorption de protéines sur les membranes d'ultrafiltration. A la suite de l'ultrafiltration et ajustement du pH, la centrifugation entraîne également une perte protéique, puisque le rendement passe à 67%. Une partie des protéines semble alors avoir été insolubilisée par l'ultrafiltration, certainement sous l'effet de la pression bien qu'inférieure à 2 bars. Enfin, l'atomisation fait passer le rendement protéique à 47%, du fait qu'une partie de la poudre protéique soit restée collée dans l'atomiseur. Ainsi, l'extraction par hydratation du tourteau à pH 12 a un rendement global de 47% (tout pourcentage en m/m, base sèche) à notre échelle de production.

Pour l'extraction à pH 10, suite à l'hydratation et centrifugation, 41% des protéines sont récupérées. Les rendements des étapes d'ultrafiltration et de centrifugation post ultrafiltration n'ont pas été déterminés. Le rendement global de l'extraction à pH 10 à la suite de l'atomisation est de 32% (tout pourcentage en m/m, base sèche).

Hadnađev et al. (2018), Malomo et al. (2014) et Orio et al. (2017), ont réalisé l'extraction des protéines de chanvre par solubilisation alcaline à pH 10 et précipitation au point isoélectrique des globulines à pH 5, suivi d'une lyophilisation. Ces auteurs ont indiqué des rendements d'extraction de 37,9%, 34% et 50,6%, respectivement. Selon les mêmes conditions d'extraction X.-S. Wang et al. (2008), ont obtenu un rendement d'extraction étonnamment élevé de 73%. La méthode d'extraction des protéines de chanvre par micellisation proposée par Hadnađev et al. (2018), a conduit à un rendement d'extraction de 40,2%. Les rendements d'extraction de 32% et 47% obtenus selon notre méthode à pH 10 et 12, respectivement, sont alors du même ordre de grandeur que ceux rapportés dans la littérature.

#### **IV.4. Conclusion partielle**

Dans ce chapitre, il a été possible d'observer l'impact des conditions d'extraction sur la qualité et la quantité des protéines extraites, de même que sur la quantité de phénols totaux extraits. Seuls des pH alcalins ont permis d'atteindre une extractabilité conséquente des protéines, certainement par augmentation de solubilité des protéines de chanvre et la déstabilisation des parois cellulaires à ces pH. De plus, la solubilisation conjointe des globulines et des albumines n'a été possible qu'à ces pH. La force ionique à pH faiblement alcalin a entraîné un effet de « salting in », mais n'a pas augmenté de manière importante l'extractabilité des protéines.

L'augmentation du ratio tourteau/eau a entraîné une diminution proportionnelle des rendements d'extraction, en raison des quantités de surnageant récupérées plus faibles. Ainsi, seule une hydratation à pH fortement alcalin ( $\geq 10$ ), peut permettre d'atteindre des rendements d'extraction supérieurs à notre objectif ( $\geq 40\%$ ). Cependant des pH très alcalins ( $> 11$ ) entraînent de fortes colorations brunes dues à l'extraction de phénols et à leur complexation probable aux protéines impliquant des liaisons covalentes. Ils entraînent également la dénaturation des protéines, mais ces phénomènes ne semblent pas impacter la solubilité des protéines de chanvre. Au contraire, des modifications de structure des protéines auraient amélioré leur solubilité. La dénaturation des globulines à pH alcalin pourrait être due à une forte charge de surface qui entraîne de fortes forces de répulsions électrostatiques et d'hydratation des globulines dans leur cœur, menant à leur dépliement et à des dissociations des sous unités. Les globulines adopteraient ensuite une structure en « globule fondu ».

Les poudres protéiques obtenues par hydratation à pH 10 sans filtration, ont montré une faible pureté protéique ( $\sim 60\%$ ), plus faible que la pureté annoncée ( $\sim 66\%$ ) de l'isolat commercial testé dans ce chapitre. Une étape de diafiltration a permis d'améliorer la pureté des poudres protéiques en éliminant les composés de faible taille, tels que les oses et les minéraux, sans impacter les profils polypeptidiques. Ainsi après diafiltration, les poudres protéiques obtenues par hydratation à pH 10 et 12 ont eu des puretés protéiques  $\geq 80\%$ , permettant de répondre à l'objectif fixé à 80%. Le seuil de coupure (5 ou 10 kDa) n'a pas montré d'impact sur les puretés protéiques ou les compositions polypeptidiques. Le point limitant de cette étape a été un colmatage progressif des membranes de filtration. L'ajout d'une étape de filtration frontale pour remédier à ce problème a été envisagé, mais cette dernière a entraîné une perte de protéine. Cette piste a donc été écartée. Le séchage des extraits protéiques par atomisation a permis d'obtenir une qualité de protéines comparable au séchage par lyophilisation.

Les paramètres d'extraction et de préparation des isolats protéiques ont pu être fixés grâce à ces résultats. Les pH 10 et 12 d'hydratation ont été retenus pour la suite de l'étude. Le pH 10 a été sélectionné, car c'est celui qui a permis la solubilisation de toutes les fractions protéiques avec le plus grand rendement d'extraction, tout en préservant le caractère natif des protéines. Le pH 12 a été choisi car il a permis le rendement d'extraction le plus élevé, malgré la formation d'agrégats et l'absence de pic de dénaturation en DSC. Le ratio massique tourteau/liquide de 10% a été préféré comme compromis entre rendement d'extraction et concentration protéique. En effet si les protéines sont fortement diluées, le séchage d'une faible quantité de protéine sera énergivore et coûteux. Malgré les problèmes de colmatage une étape de diafiltration par

ultrafiltration a été conservée pour l'augmentation de la pureté protéique. Le seuil de 10 kDa a été préféré pour un gain de temps de filtration, sans impact sur la pureté et la composition en protéines. Le nombre de diavolume d'eau distillée à pH 10 a été fixé à 4 car étant le volume minimum pour atteindre le maximum de pureté. Enfin, le séchage par atomisation a été retenu pour un gain de temps de préparation et également de coût, car il est plus rapide et moins énergivore que la lyophilisation.



# **Chapitre V : Caractérisations physico-chimiques et nutritionnelles des isolats protéiques bruts et fonctionnalisés par agrégation thermique**



## V.1. Introduction du chapitre

Après définition des paramètres d'extraction des protéines de chanvre au cours du **Chapitre IV**, des stocks d'isolats protéiques ont été constitués à partir des extraits obtenus à pH 10 et pH 12. Ce chapitre est consacré dans un premier temps à la caractérisation de ces pools d'isolats. Leurs propriétés physicochimiques sont ensuite étudiées. L'objectif premier étant de comprendre les propriétés qui régissent la solubilité des protéines de chanvre. Le second objectif est l'étude préliminaire de leurs propriétés qui pourront impacter leurs propriétés émulsifiantes. Les futures émulsions seront réalisées à pH 3 et 7,5 (**Chapitre VI**). Les analyses physicochimiques sont donc réalisées à ces pH. Les propriétés nutritionnelles de ces protéines sont également évaluées par mesure de la digestibilité *in vitro*. Ces caractérisations sont réalisées sur les protéines brutes, ou après traitement de fonctionnalisation des protéines par la réalisation d'agrégats thermiques.

## V.2. Caractérisation des poudres protéiques

### V.2.1. Composition des isolats protéiques

La composition des différents isolats protéiques a été déterminée (**Tableau 9**). Les isolats protéiques extraits à pH 10 et 12 sont composés respectivement de 84,5% et 87,7% de protéines, 9,4% et 3,5% de lipides, 2,8% et 4,3% de minéraux, de 3,3% et 4,5% (tout % m/m en base sèche) d'autres composés non dosés et ont respectivement des matières sèches de 95,6% et 95,1% (% m/m en base humide). Ainsi, les compositions des isolats obtenus suite à l'hydratation à pH 10 ou à pH 12 sont relativement proches. Des différences significatives sont tout de même observées sur le taux de lipides qui est plus important pour les isolats obtenus par hydratation à pH 10 et sur les taux de minéraux et de protéines qui sont plus élevés pour les isolats obtenus par hydratation à pH 12.

**Tableau 9 : Composition des pools d'isolats protéiques.** pH 10 et 12, les pH d'hydratation du tourteau. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

% (m/m)	pH 10		pH 12	
<b>Protéines</b> (base sèche)	84,5	± 0,7 <sup>a</sup>	87,7	± 0,8 <sup>b</sup>
<b>Lipides</b> (base sèche)	9,4	± 0,4 <sup>b</sup>	3,5	± 0,2 <sup>a</sup>
<b>Cendres</b> (base sèche)	2,8	± 0,2 <sup>a</sup>	4,3	± 0,1 <sup>b</sup>
<b>Autres</b> (base sèche)	3,3		4,5	
<b>MS</b> (base humide)	95,6	± 0,2 <sup>a</sup>	95,1	± 0,3 <sup>a</sup>

L'extraction des lipides a pu être moins dépendante du pH que l'extraction de protéines. En effet, en cours d'hydratation en solution aqueuse, du fait de la plus faible densité des lipides, ces derniers ont pu remonter en surface et se retrouver systématiquement dans les surnageants (Rosenthal, Pyle, & Niranjana, 1996). Ceci expliquerait le ratio lipides/protéines plus important dans l'isolat obtenu par hydratation du tourteau à pH 10. Le taux de cendres plus important dans l'isolat obtenu à pH 12, peut être lié au fait que les ajustements de pH ont nécessité de plus grandes quantités de NaOH, apportant ainsi plus de sels. Les paramètres de diafiltration ont été optimisés pour l'extraction à pH 10 (**Chapitre IV.3.1.3**) et appliqués tels quels pour l'extraction à pH 12. Un nombre de diavolume plus important aurait pu être nécessaire pour atteindre des taux de cendres similaires. Les autres composés non dosés sont certainement majoritairement des glucides, et plus particulièrement des fibres solubles. En effet les graines entières de chanvre sont composées de 27,6% à 32,1% (m/m en base sèche) de glucides dont la quasi-totalité sont des fibres (Callaway, 2004; Mattila, Mäkinen, et al., 2018). Mamone et al. (2019), ont dosé un taux de glucides de 12% (m/m base humide) dans leur isolat de protéines de chanvre obtenu par solubilisation alcaline et précipitation au point isoélectrique des globulines.

Les teneurs en matière sèche déterminées dans la littérature sur les isolats de protéines de chanvre obtenus par solubilisation alcaline, précipitation au point isoélectrique des globulines et lyophilisation, sont plus faibles que celles que nous avons obtenues. En effet des teneurs en matière sèche de 97,9%, 97,2% et 96,1% (m/m) ont été rapportées (Mamone et al., 2019; Tang et al., 2006; X.-S. Wang et al., 2008). La lyophilisation permettrait alors un séchage légèrement plus efficace que l'atomisation sous les conditions employées ici. Seuls X.-S. Wang et al. (2008), ont dosé la teneur en lipides de leur isolat de protéines de chanvre obtenu par solubilisation alcaline et précipitation au point isoélectrique des globulines. La teneur en lipides de cet isolat de 0,4% (m/m en base humide) a été très faible puisque ces auteurs ont réalisé l'extraction à partir de tourteau préalablement délipidé au CO<sub>2</sub> supercritique.

Les taux de cendres obtenus sur les pools d'isolats produits à pH 10 ou 12 sont plus faibles que lors des essais préliminaires (**Chapitre IV.3.1.1.2**). En effet lors des essais préliminaires, les isolats obtenus par hydratation à pH 10 et 12 ont eu respectivement des taux de cendres de 6,9% et 5,0%, contre 2,8% et 4,3% sur les pools d'isolats (m/m en base sèche). Les taux de protéines ont également légèrement varié entre les essais préliminaires et les pools d'isolats. Lors des essais préliminaires, les isolats obtenus par hydratation à pH 10 et 12 ont eu respectivement des taux de protéines de 80,3% et 92,1%, contre 84,5% et 87,7% sur les pools d'isolats (m/m en base sèche). Ces différences peuvent être dues aux différents paramètres d'ultrafiltration utilisés.

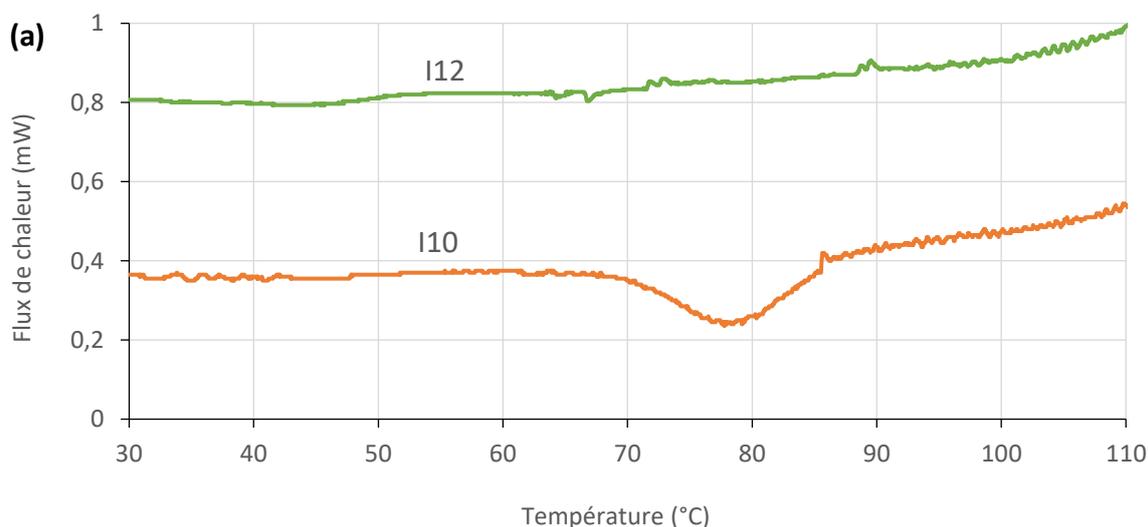
Lors des essais préliminaires, l’ultrafiltration avait été réalisée à 5 kDa, avec 5 diavolumes d’eau distillée à pH 10, contre 10 kDa et 4 diavolumes d’eau distillée à pH 10 pour la réalisation des pools d’isolats. De plus, lors de la réalisation du pool d’isolat, pour l’extraction à pH 10, une concentration de 2 fois en volume a été ajoutée après la diafiltration.

Les pools d’isolats obtenus suite à l’extraction par hydratation à pH 10 ou 12 ont été caractérisés par gel d’électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes (SDS) réductrices ou non (avec ou sans DTT). Les résultats sont similaires à ceux obtenus lors des études préliminaires au **Chapitre IV.3.1.2** et figurent donc en **Annexe 4**.

## V.2.2. Caractérisations physico-chimiques et nutritionnelles des protéines brutes et agrégées

### V.2.2.1. DSC

Les pools d’isolats obtenus par hydratation à pH 10 ou pH 12 ont été caractérisés par DSC (**Figure 32**). Comme lors des essais préliminaires (**Chapitre IV.3.1.5**), seul l’isolat obtenu par hydratation à pH 10 présente un pic de dénaturation. Ceci témoigne de la dénaturation préalable des protéines de chanvre pendant l’hydratation à pH 12, ou le réarrangement des protéines en agrégats à grande résistance à la dénaturation thermique.



(b)	Ton (°C)	Tof (°C)	Td (°C)	$\Delta H$ (J/g)
I10	72,4 ± 2,3	86,8 ± 1,4	79,3 ± 0,9	9,0 ± 1,0

**Figure 32 : Calorimétrie des pools d’isolats protéiques.** (a) thermogrammes des différents isolats. (b) valeurs calorimétriques. I10 et I12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. Ton, Tof et Td, les températures de début, de fin et au maximum du pic de dénaturation, en °C, respectivement.  $\Delta H$  l’enthalpie de dénaturation en J/g.

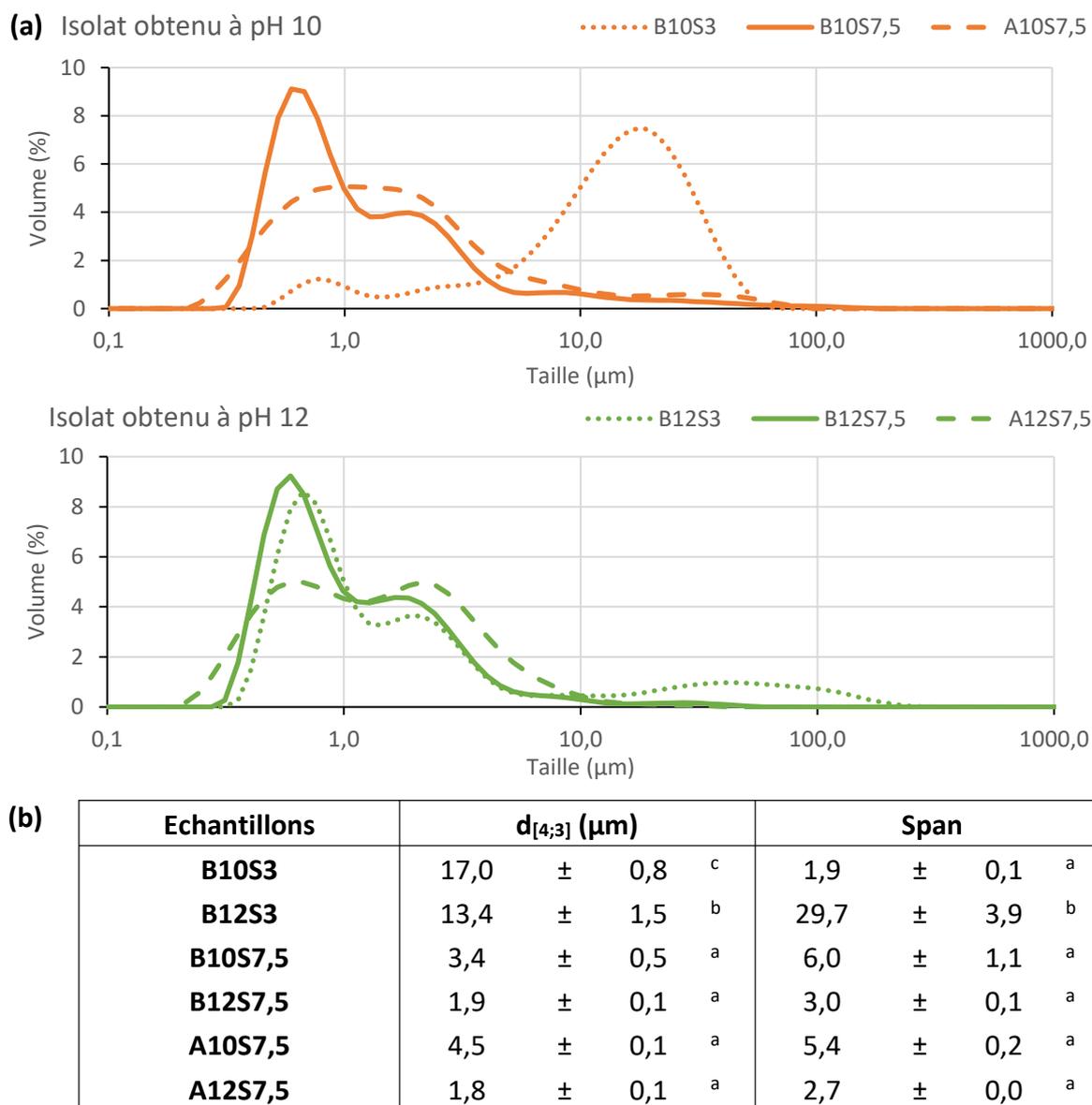
Les températures de début de pic ( $T_{on}$ ), de fin de pic ( $T_{of}$ ) et de dénaturation ( $T_d$ ) sont plus faibles que lors des essais préliminaires. En effet, la valeur de  $T_{on}$  est plus faible de 8,1 °C, la valeur de  $T_{of}$  de 4,2 °C et la  $T_d$  de 7,8 °C. Ces plus faibles valeurs de température peuvent être dues, encore une fois aux différences de composition liées aux modifications des paramètres d'ultrafiltration. En particulier, le taux de cendres plus faible obtenu lors de la constitution du pool d'isolat issu de l'extraction à pH 10, permettrait d'expliquer une valeur plus faible de  $T_d$ , étant donné l'effet protecteur des sels contre la dénaturation thermique (Damodaran, 1997). L'enthalpie de dénaturation est semblable à celle obtenue lors des essais préliminaires.

### V.2.2.2. Taille des particules

Le diamètre moyen  $d_{[4;3]}$ , la largeur de distribution (span)(**Figure 33b**) et la distribution des tailles (**Figure 33a**) des protéines en suspension à pH 3 (S3) ou à pH 7,5 (S7,5), ont été déterminés par granulométrie laser sur des suspensions de protéines brutes (B) ou agrégées thermiquement (A) provenant d'isolats de protéines de chanvre obtenus par hydratation à pH 10 (10) ou à pH 12 (12).

La distribution des tailles des particules (**Figure 33a**) est plurimodale avec la présence de deux à trois populations caractéristiques par échantillon. Les protéines brutes présentent toutes 2 pics centrés à 0,6-0,7  $\mu\text{m}$  et 1,7-2,1  $\mu\text{m}$  (B10S7,5, B12S3, B12S7,5), sauf les protéines brutes issues d'isolat obtenu à pH 10 en solution à pH 3 (B10S3) qui présentent 2 pics centrés à 0,8  $\mu\text{m}$  et 18,7  $\mu\text{m}$ . Les protéines brutes issues d'isolat obtenu à pH 12 en solution à pH 3 (B12S3) ont un 3<sup>ème</sup> pic centré à 40,1  $\mu\text{m}$ . Il semblerait alors qu'une solubilisation à pH 3 entraîne la formation de gros agrégats, certainement à cause d'une diminution des forces de répulsions électrostatiques entre les protéines.

La présence de ces gros agrégats entraîne une augmentation du diamètre moyen  $d_{[4;3]}$ , qui est plus élevé pour les protéines brutes issues d'isolat obtenu à pH 10 que pour celles issues d'isolat obtenu à pH 12 (17,0  $\mu\text{m}$  vs 13,4  $\mu\text{m}$ ) (B10S3>B12S3). Les protéines brutes issues d'isolat obtenu à pH 12 en solution à pH 3 (B12S3) ont une largeur de distribution (span) plus importante que le reste des échantillons du fait de la présence des 3 populations de taille. Tous les échantillons en solution à pH 7,5 (B10S7,5, A10S7,5, B12S7,5 et A12S7,5) ont des  $d_{[4;3]}$  et des spans similaires avec des valeurs moyennes respectives de 2,9  $\mu\text{m}$  et 4,3. Ainsi peu de différences sont observées entre les isolats obtenus à pH 10 et ceux obtenus à pH 12. De même, le traitement thermique ne semble pas entraîner la formation de gros agrégats.



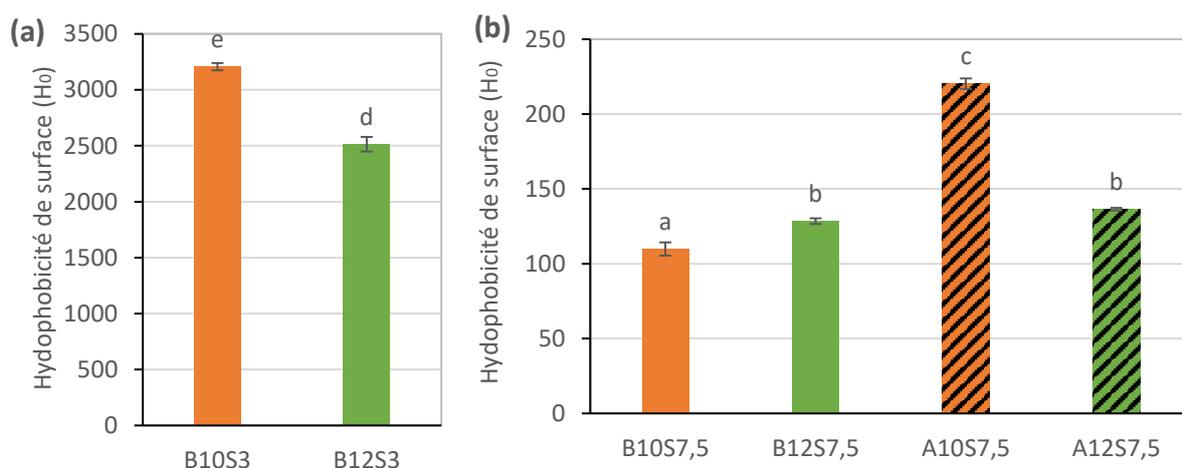
**Figure 33 : Résultats de granulométrie laser, des protéines brutes et agrégées thermiquement, issues des différents pools d'isolats protéiques.** (a) distribution des tailles des particules. (b) diamètre moyen d<sub>[4;3]</sub> (µm) et span. 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de solubilisation des protéines. Les lettres représentent les différences significatives à p<0,05.

Il est à noter que la granulométrie ne permet pas d'observer les particules <0,1 µm. Or, les globulines natives ont des tailles de l'ordre de 10-60 nm (Liu & Tang, 2013; Oliete et al., 2018). Ces derniers auteurs ont par exemple observé par DLS (Dynamic Light Scattering = diffusion dynamique de la lumière), qu'un traitement thermique de globulines de soja ou de pois entraînait la disparition du pic de globulines natives et formait un nouveau pic d'agrégats vers 100-150 nm. Il n'est donc pas à exclure que le traitement thermique des protéines de chanvre puisse entraîner des modifications dans ces classes de taille. Les particules observées en granulométrie correspondent plus certainement majoritairement à des agrégats insolubles.

### V.2.2.3. Hydrophobicité de surface

L'hydrophobicité de surface est liée à la quantité d'acides aminés hydrophobes exposés à la surface des protéines. Elle a une influence sur les interactions intermoléculaires protéines-protéines ou encore protéines-lipides (López, Ingrassia, Busti, Wagner, et al., 2018). L'adsorption des protéines aux interfaces huile/eau lors de la formation d'émulsions est alors soumise aux interactions hydrophobes entre les lipides et les protéines (Timilsena, Adhikari, Barrow, & Adhikari, 2016). Une augmentation d'hydrophobicité de surface résulte souvent d'une dénaturation des protéines. Sous l'effet d'un traitement thermique par exemple, les liaisons hydrogènes des globulines sont rompues, entraînant leur dépliement et l'exposition des groupements hydrophobes initialement contenus dans leur cœur (Chihi et al., 2016; Kinsella & Melachouris, 1976). Une dénaturation préalable des protéines peut augmenter la flexibilité des protéines et donc leur aptitude à se déployer aux interfaces huile/eau (McClements, 1998). Ainsi, étudier l'hydrophobicité de surface des protéines peut renseigner sur l'état de dénaturation des protéines et sur leur aptitude potentielle à se déployer aux interfaces huile/eau lors de la formation d'émulsions.

L'hydrophobicité de surface ( $H_0$ ) à l'ANS, a été mesurée sur les protéines brutes provenant d'isolats obtenus par hydratation à pH 10 (B10) ou à pH 12 (B12), mis en solution à pH 3 (S3) (**Figure 34a**), ou à pH 7,5 (S7,5) (**Figure 34b**). L'hydrophobicité de surface des agrégats obtenus par traitement thermique de ces mêmes isolats à pH 7,5 (A10S7,5 et A12S7,5) a également été déterminée (**Figure 34b**).



**Figure 34 : Hydrophobicité de surface ( $H_0$ ) des protéines brutes et agrégées thermiquement, provenant des différents pools d'isolats protéiques.** (a) hydrophobicité de surface des protéines en solution à pH 3 (S3). (b) hydrophobicité de surface des protéines en solution à pH 7,5 (S7,5). 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

L'hydrophobicité de surface est 10 fois plus élevée à pH 3 qu'à pH 7,5. Ainsi à pH 3, les valeurs d'hydrophobicité de surface sont comprises entre 2514 et 3207 alors qu'à pH 7,5 elles sont comprises entre 110 et 220. Alizadeh-Pasdar & Li-Chan (2000), ont montré qu'à pH acide, l'hydrophobicité de surface mesurée à l'ANS a tendance à être surévaluée. En effet, la sonde ANS anionique peut se fixer sur les sites cationiques. Cela peut expliquer pourquoi à pH acide, c'est à dire sous le point isoélectrique des protéines où leur charge est positive, l'hydrophobicité de surface a tendance à être surévaluée du fait de la fixation non ciblée de l'ANS. Cette hypothèse permet d'expliquer en partie la différence significative entre les échantillons mis en solution à pH 3 et ceux mis en solution à pH 7,5. Ainsi, la comparaison des hydrophobicités de surface entre pH 3 et pH 7,5 est délicate mais la comparaison entre plusieurs échantillons au même pH est possible.

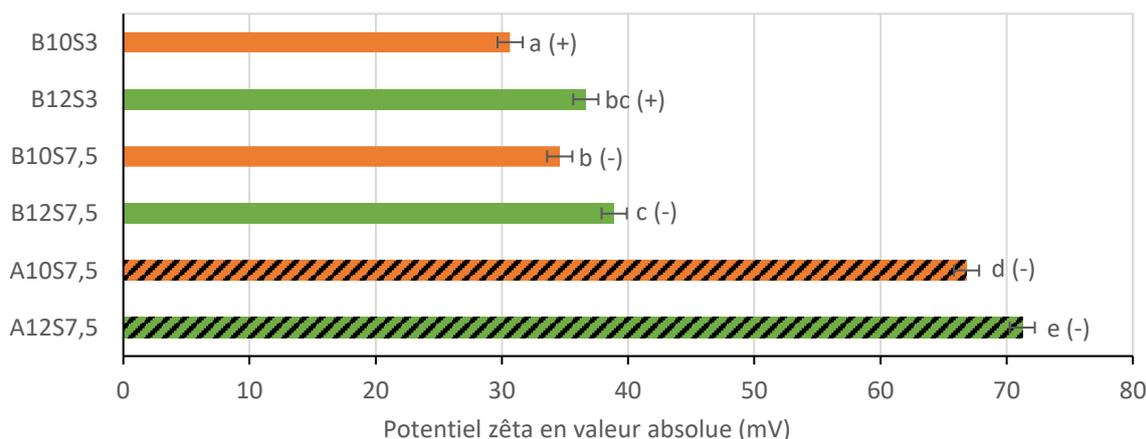
Mises en solution à pH 3, les protéines brutes provenant d'isolat obtenu par hydratation à pH 10, ont significativement une plus grande hydrophobicité de surface que celles provenant d'isolat obtenu par hydratation à pH 12 (3207 vs 2514) (B10S3>B12S3). En revanche, en solution à pH 7,5 l'inverse est observé (110 vs 129) (B10S7,5<B12S7,5). Des valeurs d'hydrophobicité de surface à pH 7 de 75, 89 et 179 ont été rapportées pour des globulines de chanvre obtenues par solubilisation alcaline (pH 10) et précipitation au point isoélectrique (pH 4,5-5) (Teh et al., 2016; Q. Wang et al., 2018; X.-S. Wang et al., 2009). Q. Wang et al. (2018), ont également observé une augmentation de l'hydrophobicité de surface à pH 7 après un shift des globulines de chanvre à pH 12 pendant 5 min (186 après un shift à 20 °C et 218 après un shift à 60 °C). Jiang et al. (2009), ont aussi observé une très nette augmentation de l'hydrophobicité de surface à pH 7 après un shift des globulines de soja à pH 12 ou 10, à 20 °C pendant 4 h, passant de ~150 sans shift à ~350 et ~450 après un shift à pH 10 et 12 respectivement. Ces derniers auteurs ont montré que le shift à pH 12 entraînait un dépliement partiel des globulines de par de fortes forces de répulsions électrostatiques, impactant uniquement leur structure tertiaire et permettant l'exposition des groupements hydrophobes. Comme observé en granulométrie (**Chapitre V.2.2.2**), la plus faible hydrophobicité de surface à pH 3 des isolats obtenus à pH 12, pourrait résulter de l'agrégation de ces dernières par liaisons hydrophobes du fait de plus faibles répulsions électrostatiques, diminuant ainsi la quantité de groupements hydrophobes en surface (Zayas, 1997).

A pH 7,5 pour les isolats obtenus par hydratation à pH 10, le traitement thermique permet d'augmenter significativement l'hydrophobicité de surface (110 vs 220) (B10S7,5<A10S7,5). Pour les isolats obtenus par hydratation à pH 12, le traitement thermique n'entraîne pas de

modification significative de l'hydrophobicité de surface (129 vs 136) (B12S7,5 vs A12S7,5). Les protéines d'isolat obtenu à pH 10 sont plus proches de l'état natif, comme observé par DSC au **Chapitre V.2.2.1**. Ainsi, le traitement thermique à 95 °C, supérieur à la température de dénaturation des globulines de chanvre a permis leur dépliement, entraînant l'exposition en surface des groupements hydrophobes initialement contenus dans leur cœur. L'augmentation d'hydrophobicité de surface semble indiquer que tous les groupements hydrophobes nouvellement exposés ne sont pas impliqués dans la formation d'agrégats par liaisons hydrophobes (Bryant & McClements, 1998; Chihi et al., 2016; Kinsella & Melachouris, 1976). He et al. (2013) et Liu & Tang (2015), ont également constaté une augmentation de l'hydrophobicité de surface des globulines de colza et de soja, respectivement, suite à l'application d'un traitement thermique de 80 à 100 °C pendant 15 à 30 min. Comme observé par l'absence de pic de dénaturation sur les thermogrammes en DSC, l'extraction des protéines de chanvre à pH 12 entraîne leur dénaturation. Ainsi, le traitement thermique ne semble pas avoir entraîné d'impact majeur sur leur structure.

#### V.2.2.4. Charge de surface

La charge de surface des protéines en solution à pH 3 ou 7,5 (S3 ou S7,5), brutes ou agrégées (B ou A), issues des isolats de protéines de chanvre obtenus par hydratation à pH 10 ou 12 (10 ou 12), a été déterminée par mesure du potentiel zêta. Les résultats en valeur absolue sont présentés **Figure 35**.



**Figure 35 : Potentiel zêta (en mV), en valeur absolue, des protéines brutes et agrégées thermiquement, issues des différents pools d'isolats protéiques.** 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de solubilisation des protéines. (+) et (-), les signes du potentiel zêta. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Le potentiel zêta mesure le déplacement des particules en suspension, après soumission à un courant électrique. Plus les particules vont être de petites tailles et chargées électriquement, plus ces dernières vont se déplacer et plus elles auront une valeur absolue de potentiel zêta importante. Par conséquent, plus des particules en suspension vont être chargées électriquement, plus ces dernières vont avoir tendance à se repousser les unes des autres par répulsions électrostatiques. Ceci aura pour effet d'améliorer l'aptitude des particules à rester en suspension.

Tous les échantillons en solution à pH 3 (B10S3 et B12S3) ont un potentiel zêta positif (+), alors que tous les échantillons en solution à pH 7,5 (B10S7,5, A10S7,5, B12S7,5 et A12S7,5) ont un potentiel zêta négatif (-). Le point isoélectrique des globulines de chanvre étant proche de 5, lorsqu'elles sont en solution à pH inférieur au point isoélectrique elles sont majoritairement chargées positivement et inversement (Hadnadev et al., 2018; Yin et al., 2008).

Les protéines brutes ont des valeurs absolues de potentiel zêta comprises entre 30,7 et 38,9 mV. Elles ont un potentiel zêta en valeur absolue légèrement plus élevé d'en moyenne 3,1 mV lorsqu'elles sont en suspension à pH 7,5 (B10S7,5 et B12S7,5) qu'à pH 3 (B10S3 et B12S3). Ces valeurs absolues sont plus élevées que celle de -9,2 mV rapporté à pH 7 par Teh et al. (2016), sur des globulines de chanvre obtenues par solubilisation alcaline et précipitation isoélectrique. Elles sont plus proches des ~-40 mV obtenues à pH 7,5 pour des globulines de colza ou de soja (Paulson & Tung, 1987; Tran & Rousseau, 2013). Ces auteurs ont également obtenu des valeurs absolues de potentiel zêta plus faibles à pH 3-4, comprises entre +15 et +25 mV.

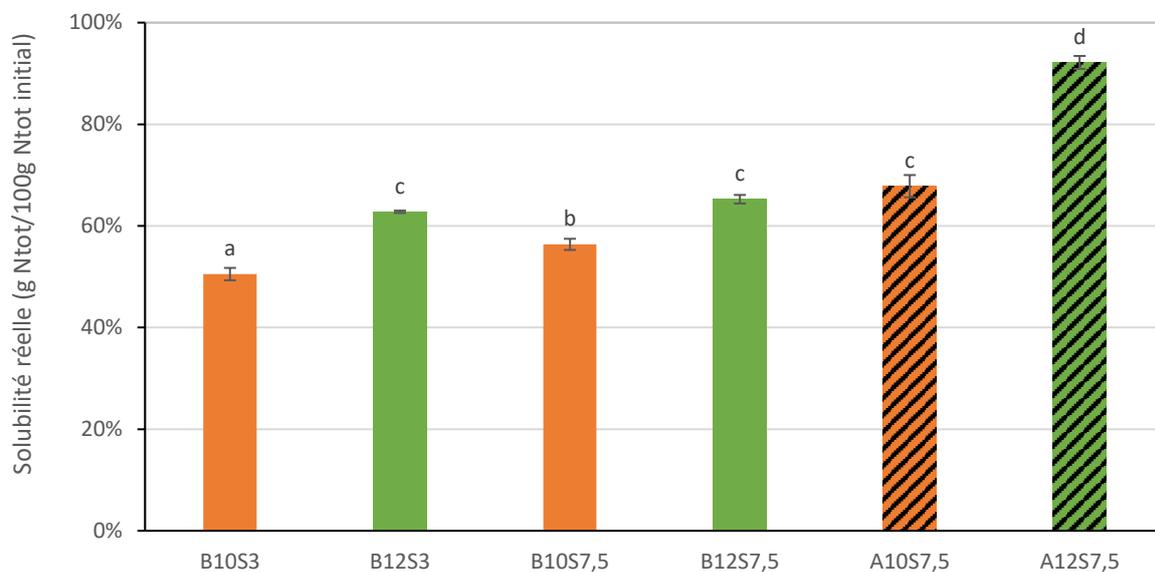
Les protéines issues d'isolat obtenu à pH 10 (B10S3, B10S7,5 et A10S7,5) ont un potentiel zêta en valeur absolue plus faible d'en moyenne 4,9 mV que celui des protéines issues d'isolat obtenu à pH 12 (B12S3, B12S7,5 et A12S7,5). La dénaturation des protéines par l'extraction à pH 12 semble alors avoir entraîné un dépliement partiel et des réarrangements qui augmentent l'exposition des acides aminés chargés (Jiang et al., 2009; Perutz, 1974; Sripad & Rao, 1987).

Le traitement thermiques (A10S7,5 et A12S7,5) entraîne une augmentation moyenne de potentiel zêta en valeur absolue de 32,3 mV, par rapport aux protéines brutes dans les mêmes conditions (B10S7,5 et B12S7,5). Liu & Tang (2015), ont également constaté sur des globulines de soja, qu'un traitement thermique de 90 à 100 °C pendant 30 min à pH 7 entraînait une augmentation de valeur absolue du potentiel zêta, passant de ~-30 mV à ~-40 mV. Ces auteurs ont estimé que cela devait résulter d'une augmentation de la densité des groupes chargés à la

surface des protéines, à la suite d'un réarrangement structurel des protéines pour former des structures plus stables et compactes. Avec du recul, il semblerait que les valeurs de -66,8 mV et -71,2 mV obtenues sur les agrégats thermiques (A10S7,5 et A12S7,5) dans notre étude soient anormalement élevées. Ces mesures mériteraient d'être répétées sur un autre zêta-mètre.

### V.2.2.5. Solubilité

La solubilité à pH 3 et pH 7,5 (S3 et S7,5) des protéines brutes (B) ou fonctionnalisées par agrégation thermique (A), d'isolats obtenus par hydratation à pH 10 ou pH 12 (10 et 12), a été étudiée (**Figure 36**).



**Figure 36 : Solubilité réelle des différents pools d'isolats protéiques.** N<sub>Tot</sub> l'azote total déterminé par Kjeldahl. 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de solubilisation des protéines. Les lettres représentent les différences significatives à p<0,05.

La solubilité protéique varie de 51% à 92%. Comme lors des essais préliminaires (**Chapitre IV.3.1.6**), les protéines d'isolats obtenus par hydratation à pH 12 (B12S3, B12S7,5 et A12S7,5), sont 1,2 à 1,4 fois plus solubles que les protéines d'isolats obtenus par hydratation à pH 10 (B10S3, B10S7,5 et A10S7,5). La solubilité des protéines brutes d'isolat obtenu par hydratation à pH 10 est plus faible à pH 3 (51%) (B10S3) qu'à pH 7,5 (56%) (B10S7,5). Aucune différence significative n'est observée entre les solubilités des protéines brutes d'isolat obtenu par hydratation à pH 12 (B12S3 et B12S7,5), avec en moyenne 64% de solubilité à pH 3 et 7,5.

Jiang et al. (2010), ont également observé une augmentation de la solubilité à pH 3 et 7,5, d'un facteur 1,2-1,3 après un shift des globulines de soja à pH 12 pendant 1 h à 20 °C. Ces auteurs ont également constaté des valeurs de solubilité similaires à pH 3 et 7,5 après le shift à pH 12.

Le dépliement partiel, la rupture de ponts disulfures, la réorganisation en « globule fondu », et la dissociation des sous unités des globulines 11S engendrés par le pH 12, seraient favorables à la solubilité des globulines (Jiang et al., 2009; Perutz, 1974; Sripad & Rao, 1987). Ces résultats sont en accord avec les plus faibles diamètres  $d_{[4;3]}$  et les plus fortes charges de surfaces des protéines d'isolat extrait à pH 12 (B12S3, B12S7,5 et A12S7,5), comparés à ceux des protéines d'isolat extrait à pH 10 (B10S3, B10S7,5 et A10S7,5) (**Chapitres V.2.2.2 et V.2.2.4**). Il est plus difficile d'établir une relation entre les résultats d'hydrophobicité de surface (**Chapitre V.2.2.3**) et les résultats de solubilité. Ceci laisse présager d'une dominance des forces répulsives (dont électrostatiques) sur les forces attractives (dont hydrophobes) (Hayakawa & Nakai, 1985; Zayas, 1997).

Les valeurs de solubilité des protéines brutes d'isolat extrait à pH 12 (63-65%) (B12S3 et B12S7,5) sont étonnamment beaucoup plus faibles que lors des essais préliminaires (86-88%) (**Chapitre IV.3.1.6**). Cette différence peut être due à la différence de pureté protéique (87,7% vs 92,1%) occasionnée par les différences de conditions de diafiltration (4 diavolumes à 10 kDa vs 5 diavolumes à 5 kDa) et/ou à une complexation des phénols aux protéines plus importante entraînant une diminution de la solubilité (Ozidal et al., 2013).

A pH 7,5 l'agrégation thermique permet d'améliorer la solubilité pour les 2 isolats obtenus par hydratation à pH 10 et pH 12. Pour celui obtenu à pH 10, la solubilité augmente d'un facteur 1,2 (B10S7,5 vs A10S 7,5) pour atteindre 68% de solubilité, et pour celui obtenu à pH 12, elle augmente d'un facteur 1,4 (B12S7,5 vs A12S7,5) pour atteindre 92% (tout pourcentage m/m) de solubilité. Contrairement à ces observations, Raikos, Duthie, & Ranawana (2015), Q. Wang & Xiong (2019) et Yin et al. (2008), ont constaté une diminution de la solubilité des globulines de chanvre obtenues par solubilisation alcaline (pH 10) et précipitation isoélectrique (pH 4,5-5) après un traitement thermique de 80 à 100 °C pendant 10 min, de par la formation de larges agrégats insolubles. Cette différence avec nos résultats peut être expliquée par le fait que nous avons réalisé la dénaturation par montée progressive de la température. Ainsi, les globulines ont pu se déplier progressivement. Les groupements hydrophobes ont été exposés progressivement, limitant le déséquilibre brutal entre forces attractives et répulsives et limitant la formation d'agrégats particuliers de grande taille. Des agrégats fractals de petite taille ont ainsi pu être formés (Bryant & McClements, 1998; Clark et al., 2001; Nicolai, Britten, & Schmitt, 2011). L'absence de formation d'agrégats de grande taille, et la non implication de tous les groupements hydrophobes nouvellement exposés dans des liaisons, comme suggéré dans les **Chapitres V.2.2.2 et V.2.2.3**, appuient cette hypothèse. La taille et la densité des

agrégats seraient assez faibles pour ne pas qu'ils sédimentent, et l'augmentation de la charge de surface (**Chapitre V.2.2.4**) favoriserait les répulsions électrostatiques et leur solubilité (Damodaran, 1997; Hayakawa & Nakai, 1985; Zayas, 1997).

### V.2.2.6. Digestibilité *in vitro*

Le pourcentage d'hydrolyse des protéines brutes et agrégées, issues des différents isolats a été déterminé et la digestibilité *in vitro* des protéines a été calculée **Tableau 10**.

**Tableau 10 : Hydrolyse, et digestibilité *in vitro* des protéines de chanvre par la pancréatine (en % m/m).** 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A les protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de solubilisation des protéines. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Echantillon	Hydrolyse (%)				Digestibilité (%)			
		±				±		
Caséine	103,4	±	2,6	d	100,0	±	2,5	d
Tourteau	67,7	±	5,3	a	65,5	±	5,2	a
B10S7,5	92,2	±	5,3	cd	89,2	±	5,2	cd
B12S7,5	81,7	±	1,0	bc	79,0	±	1,0	bc
A10S7,5	75,8	±	5,8	ab	73,4	±	5,6	ab
A12S7,5	99,2	±	2,5	d	95,9	±	2,4	d

Des valeurs de digestibilité *in vitro* des protéines de chanvre comprises entre 65,5% et 95,9% ont été obtenues. La valeur de digestibilité *in vitro* la plus faible est constatée pour les protéines de chanvre issues du tourteau. Dans la littérature, des digestibilités *in vitro* de 84,85% (Malomo & Aluko, 2015b) et *in vivo* de 86,7% (House et al., 2010) ont été rapportées pour des tourteaux de chanvre. Les premiers auteurs ont éliminé la fraction du tourteau contenant l'enveloppe des graines avant de mesurer la digestibilité. Les seconds auteurs n'ont pas précisé si les tourteaux employés avaient été obtenus à partir de graines de chanvre entières ou décortiquées. En revanche, le pourcentage important de protéines mesuré dans leurs tourteaux semble représentatif de tourteaux de graines décortiquées. House et al. (2010), ont déterminé qu'un décorticage préalable des graines de chanvre, augmentait leur digestibilité *in vivo* d'environ 10%. Il est alors probable que la plus faible digestibilité *in vitro* obtenue dans nos travaux, soit due à la présence de l'enveloppe de graines riches en fibres et en composés phénoliques (Chen et al., 2012; House et al., 2010; Mattila, Pihlava, et al., 2018). La présence de fibres non digestibles est en effet connue pour diminuer la digestibilité des protéines (House et al., 2010). Des interactions entre divers phénols et protéines peuvent également avoir le même effet. Les tanins condensés, dont certains sont présents dans les graines de chanvre sont connus pour

pouvoir interagir avec les protéines et diminuer leur digestibilité (Mattila, Pihlava, et al., 2018; Ozdal et al., 2013; Skrabanja, Lærke, & Kreft, 2000; Valeris, Melton, & Shahidi, 2018).

Les protéines brutes issues d'isolat extrait à pH 12 sont légèrement moins digestibles que celles issues d'isolat extrait à pH 10 (79% vs 89,2%) (B12S7,5<B10S7,5). Les changements structuraux entraînés par le pH 12 seraient alors défavorables à la digestibilité des protéines, certainement par un masquage des sites protéolytiques, ou à cause des interactions covalentes avec les phénols (Jiang et al., 2009; Ozdal et al., 2013; Skrabanja et al., 2000; Sosulski, 1979; Yin et al., 2008). Ces valeurs de digestibilité *in vitro* sont similaires à celles retrouvées dans la littérature pour des isolats de globulines de chanvre obtenues par solubilisation alcaline et précipitation au point isoélectrique (85,12%), ou sur des concentrats de protéines de chanvre obtenus après digestion enzymatique du tourteau par un mélange de cellulase, d'hémicellulase, de xylanase et de phytase (89,00%) (Malomo & Aluko, 2015b).

Les agrégats thermiques issus d'isolat obtenu par hydratation à pH 12 sont plus digestibles que ceux issus d'isolat obtenu par hydratation à pH 10 (95,9% vs 73,4%) (A12S7,5>A10S7,5). Cela est cohérent avec la plus forte solubilité des agrégats issus d'isolat extrait à pH 12, observée au **Chapitre V.2.2.5**, qui facilite l'accès des enzymes aux protéines. Le traitement thermique des isolats extraits à pH 10 diminue leur digestibilité (89,2% à 73,4%) (B10S7,5>A10S7,5), alors que pour les isolats extraits à pH 12, il produit l'effet inverse (79,0% à 95,9%) (B12S7,5<A12S7,5). Raikos et al. (2015) et Yin et al. (2008), ont également constaté une diminution de la digestibilité des globulines natives de chanvre obtenues par solubilisation alcaline (pH 10) et précipitation isoélectrique (pH 5) après un traitement thermique de 80 à 100 °C pendant 10 min. Ces auteurs ont attribué cette diminution de digestibilité à des modifications structurales des protéines qui entraînent un masquage des sites protéolytiques. Comme constaté dans les précédents paragraphes de ce chapitre, les protéines extraites à pH 12 étant déjà dénaturées avant le traitement thermique, ce dernier semble avoir eu de moindres effets sur leur structure. L'augmentation de solubilité que le traitement thermique a entraîné (**Chapitre V.2.2.5**) pourrait être la cause de l'augmentation de digestibilité en facilitant l'accès des enzymes aux protéines. Cette augmentation de digestibilité pourrait également être attribuée à la dénaturation thermique des inhibiteurs de trypsine et donc à leur inactivation. Des inhibiteurs de trypsine ont en effet été identifiés dans des graines et tourteaux de chanvre (Galasso et al., 2016; Mattila, Pihlava, et al., 2018; Pihlanto et al., 2017; Pojić et al., 2014).

### V.3. Conclusion partielle

A travers ce chapitre, l'impact du mode d'extraction des protéines de chanvre et d'un traitement de fonctionnalisation des protéines par réalisation d'agrégats thermiques, sur leurs propriétés physico-chimiques et leur digestibilité, a été étudié.

Les pools d'isolats protéiques extraits à pH 10 et 12 ont eu respectivement des puretés protéiques de 84,5% et 87,7%, supérieures à l'objectif fixé à 80%. La solubilité de ces isolats bruts aux pH alimentaires de 3 et 7,5 a été comprise entre 51 et 65%. Elle semble avoir été majoritairement gouvernée par les diamètres granulométriques  $d_{[4;3]}$  et la charge de surface des protéines. Des  $d_{[4;3]}$  faibles et des charges de surface élevées favorisent la solubilité en limitant la sédimentation et en augmentant les forces de répulsions électrostatiques entre les protéines. Dans les mêmes conditions, les isolats extraits à pH 12 ont été plus solubles que ceux extraits à pH 10, certainement grâce à la dénaturation des protéines lors de l'extraction à pH 12 qui a entraîné des modifications de structures des globulines, favorisant l'exposition de leurs acides aminés chargés. La digestibilité *in vitro* des isolats a également été importante avec une valeur moyenne de 87%.

Le traitement thermique à 95 °C a entraîné une nette augmentation de la solubilité, liée à une augmentation de la charge de surface. Des agrégats fractals pourraient avoir été formés de par une balance entre les forces répulsives électrostatiques et attractives hydrophobes favorables. Cette hypothèse est appuyée par l'absence de formation de grands agrégats insolubles. Elle l'est également par le fait que pour les protéines brutes d'isolat obtenu à pH 10, le traitement thermique a permis leur dépliement et une augmentation d'hydrophobicité de surface. Ceci témoigne que tous les groupements hydrophobes nouvellement exposés n'ont pas été impliqués dans la formation d'agrégats par liaisons hydrophobes. Ces réarrangements pour les isolats extraits à pH 10 auraient entraîné un masquage des sites protéolytiques et une baisse de digestibilité *in vitro*. Le traitement thermique des protéines d'isolat extrait à pH 12 n'a pas entraîné de modification de l'hydrophobicité de surface, probablement du fait que ces dernières aient été déjà dénaturées pendant l'extraction. Il a amélioré leur digestibilité potentiellement grâce à un gain de solubilité ou à l'inactivation d'inhibiteurs de trypsine par la chaleur.

# **Chapitre VI : Propriétés émulsifiantes des protéines de chanvre brutes et traitées thermiquement**



## VI.1. Introduction du chapitre

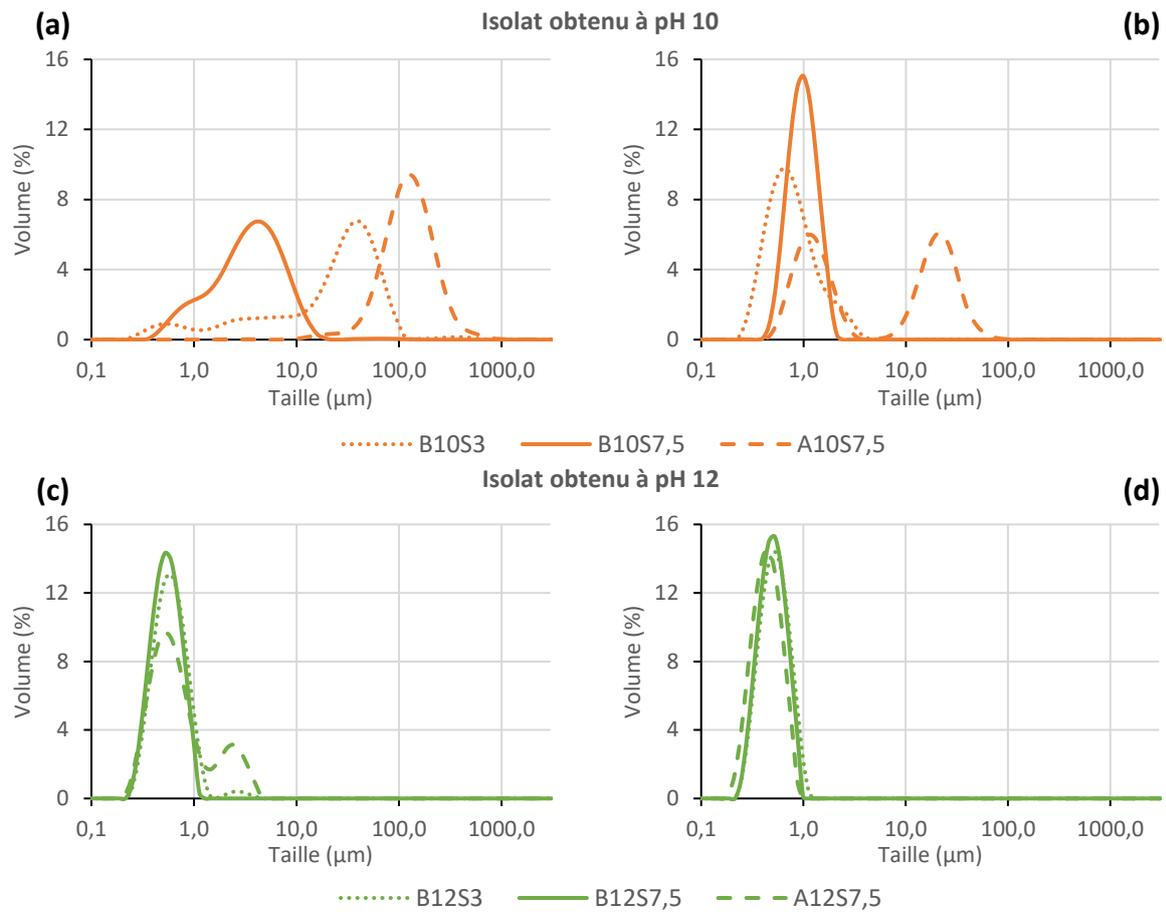
Ce chapitre est consacré à l'étude des propriétés émulsifiantes des protéines brutes ou agrégées thermiquement, issues des différents isolats. Dans un premier temps, des émulsions en conditions « témoins », à faible ratio protéine/matière grasse, ont été préparées pour faciliter la confrontation avec la littérature scientifique. Les propriétés émulsifiantes sont confrontées aux propriétés physicochimiques des protéines de chanvre évaluées au **Chapitre V**, afin de comprendre les mécanismes de formation et de stabilisation de ces émulsions.

Puis ces propriétés ont été vérifiées sur un système modèle dont la composition peut se rapprocher d'un lait de soja avec 3,2% de protéine et 2% de matière grasse. Pour se rapprocher de conditions opératoires industrielles, où des traitements thermiques de pasteurisation ou de stérilisation sont appliqués, les émulsions « modèles » ont été formées à partir d'agrégats thermiques. L'impact de la pression d'homogénéisation par microfluidisation, sur ces émulsions est également étudié. Les propriétés des émulsions « modèles » sont discutées par rapport aux propriétés des émulsions « témoins ».

## VI.2. Emulsions « témoins » : protéines brutes vs traitées thermiquement

### VI.2.1. Granulométrie des émulsions « témoins »

Les propriétés émulsifiantes des protéines brutes et agrégées thermiquement, issues des isolats obtenus par hydratation à pH 10 ou 12, ont été étudiées. Des émulsions « témoins » ont été réalisées à partir de solution protéique à 1% de protéine, avec un ratio solution protéique/Mygliol de 90/10. La distribution de taille des particules a été déterminée par granulométrie laser à t0 avec (**Figure 37b et d**) ou sans SDS (**Figure 37a et c**). L'ajout de SDS permet de rompre les liaisons hydrophobes, ce qui inhibe le phénomène de floculation et permet l'observation de la taille des gouttelettes lipidiques, individuellement (Liang & Tang, 2013). Les distributions de taille après 24 h de stockage à 4 °C figurent en **Annexe 5**. Les données chiffrées obtenues par les résultats de granulométrie laser, à 0 h et 24 h, avec et sans SDS figurent dans le **Tableau 11**.



**Figure 37 : Distribution des tailles des gouttelettes lipidiques des différentes émulsions « témoins » à t0.** (a) et (b), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 10 (10). (c) et (d), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 12 (12). (a) et (c), distribution sans SDS. (b) et (d), distribution avec SDS. B et A, les émulsions formées de protéines brutes ou agrégées thermiquement. S3 et S7,5, les pH 3 et pH 7,5 de formation des émulsions.

**Tableau 11 : Données chiffrées fournies par granulométrie laser, des émulsions « témoins ». t0 et t24, les données prises juste après formation des émulsions ou après 24 h à 4 °C. SDS-, les données en présence de SDS.  $d_{[4;3]}$ , les diamètres moyens en  $\mu\text{m}$ . Span la largeur de distribution de taille. IF et IC, les indices de floculation et de coalescence. 10 et 12, les émulsions formées à partir d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B et A, les émulsions formées à partir de protéines brutes ou agrégées thermiquement issues de ces isolats. S3 et S7,5, les pH 3 et pH 7,5 de formation des émulsions. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .**

Echantillon	t0			t24		
	SDS -		SDS +	IF		IC
	Span	$d_{[4;3]}$ ( $\mu\text{m}$ )				
<b>B10S3</b>	3,22 <sup>d</sup>	35,80 <sup>c</sup>	0,96 <sup>ab</sup>	36,33 <sup>e</sup>	18,90 <sup>d</sup>	0,17 <sup>b</sup>
<b>B12S3</b>	1,03 <sup>b</sup>	0,70 <sup>ab</sup>	0,58 <sup>ab</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	0,27 <sup>ab</sup>	0,00 <sup>a</sup>
<b>B10S7,5</b>	2,07 <sup>c</sup>	4,82 <sup>ab</sup>	1,09 <sup>ab</sup>	3,41 <sup>ab</sup>	2,53 <sup>ab</sup>	0,04 <sup>a</sup>
<b>B12S7,5</b>	0,88 <sup>a</sup>	0,60 <sup>ab</sup>	0,55 <sup>ab</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>
<b>A10S7,5</b>	1,51 <sup>b</sup>	154,77 <sup>d</sup>	13,20 <sup>b</sup>	12,41 <sup>c</sup>	4,20 <sup>b</sup>	2,18 <sup>c</sup>
<b>A12S7,5</b>	3,18 <sup>d</sup>	1,02 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>

### VI.2.1.1. Emulsions formées à partir d'isolat obtenu à pH 10 (B10S3, B10S7,5 et A10S7,5)

- **Protéines brutes (B10S3 vs B10S7,5)**

En absence de SDS, les émulsions formées à pH 3 (B10S3) ont un pic principal de taille plus importante que celles formées à pH 7,5 (B10S7,5) (**Tableau 11**). Ceci se traduit par un  $d_{[4;3]}$  des floculats (sans SDS) de 35,80  $\mu\text{m}$  à pH 3 (B10S3) et de 4,82  $\mu\text{m}$  à pH 7,5 (B10S7,5) (**Tableau 11**). L'ajout de SDS diminue considérablement la taille de ces pics (**Figure 37**), donnant un  $d_{[4;3]}$  moyen des gouttelettes individuelles de 1,02  $\mu\text{m}$  sans différence significative entre les 2 pH (**Tableau 11**). Ceci témoigne de la présence de floculation, confirmée par des indices de floculation à  $t_0$  (IF) de 36,33 à pH 3 (B10S3) et de 3,41 à pH 7,5 (B10S7,5) (**Tableau 11**).

Les protéines brutes d'isolat obtenu à pH 10 semblent avoir des propriétés de diffusion et d'adsorption similaires à pH 3 (B10S3) et pH 7,5 (B10S7,5). La microfluidisation appliquée pour homogénéiser les émulsions permet généralement de former des gouttelettes lipidiques  $<1 \mu\text{m}$  (Paquin & Giasson, 1989). La diffusion et l'adsorption de ces protéines aux interfaces huile/eau semble alors avoir été rapide. La présence de grands agrégats non solubles à pH 3 (**Chapitres V.2.2.2 et V.2.2.5**) pourrait avoir mené à de la floculation par déplétion. La déplétion intervient lorsqu'une particule colloïdale se situe entre plusieurs gouttelettes lipidiques. Ceci va créer une différence de potentiel osmotique entre la zone qui entoure les gouttelettes lipidiques et la phase continue. Cette différence de potentiel osmotique va mener à l'expulsion de la particule colloïdale par rapprochement des gouttelettes lipidiques (McClements, 1998; Walstra, 2002). La présence de floculats sur des émulsions formées à partir de protéines de chanvre obtenues par solubilisation alcaline (pH 10) et précipitation isoélectrique (pH 5), a précédemment été rapportée dans la littérature (Dapčević-Hadnađev et al., 2019; Teh et al., 2013). Dapčević-Hadnađev et al. (2019), ont observé la présence d'agrégats protéiques entre les gouttelettes lipidiques par microscopie confocale à balayage laser. Ces auteurs en ont déduit que la floculation semblait alors due à une floculation de pontage. La floculation de pontage se produit lorsqu'un biopolymère s'adsorbe sur la surface de plus d'une gouttelette via ses groupements hydrophobes. Elle intervient principalement lorsque la concentration en biopolymère n'est pas suffisante pour couvrir toutes les interfaces huile/eau (McClements, 1998).

L'émulsion formée à pH 3 (B10S3) présente également de la coalescence après 24 h à 4 °C, avec un indice de coalescence (IC) de 0,17. Par ailleurs, sa floculation diminue au bout de 24 h à 4 °C, avec un indice de floculation (IF) passant à 18,90 (**Tableau 11**). La floculation aurait favorisé le rapprochement des gouttelettes lipidiques et mené à de la coalescence après rupture des films interfaciaux. La largeur de distribution (span) est légèrement plus importante à pH 3 (B10S3) qu'à pH 7,5 (B10S7,5) avec des valeurs respectives de 3,22 et 2,07 (**Tableau 11**). Yin et al. (2008), ont également mis en évidence un indice d'activité émulsifiante plus faible à pH 3 qu'à pH 7 pour des globulines de chanvre extraites par solubilisation alcaline (pH 10) et précipitation isoélectrique (pH 5) mais n'ont pas commenté cette différence.

- **Protéines agrégées thermiquement (A10S7,5 vs B10S7,5)**

La dénaturation thermique affecte considérablement les propriétés émulsifiantes à pH 7,5 des protéines issues d'isolat obtenu à pH 10 (A10S7,5). Elle entraîne une augmentation de taille du pic principal de floculats (sans SDS) et la formation d'un second pic de gouttelettes individuelles (avec SDS) de taille supérieure centré à 21,2 µm (**Figure 37**). Cela se traduit par des  $d_{[4;3]}$  de floculats (sans SDS) et de gouttelettes individuelles (avec SDS) de 154,77 et 13,20 µm, respectivement (**Tableau 11**). La présence de gouttelettes individuelles de taille élevée indique soit que la concentration en protéine n'a pas été assez importante pour couvrir toutes les interfaces huile/eau, soit que toutes les protéines n'ont pas été capables de se déployer à ces interfaces. Dans la seconde hypothèse, le traitement thermique pourrait avoir mené à la formation d'agrégats fractals (Bryant & McClements, 1998; Clark et al., 2001; Nicolai et al., 2011). En s'adsorbant aux interfaces huile/eau ces derniers entraîneraient des encombrements stériques, bloquant l'adsorption de nouvelles protéines aux interfaces. Il est également possible que les modifications structurales engendrées par le traitement thermique aient diminué la flexibilité des protéines. La conséquence serait un ralentissement de leur adsorption, entraînant la coalescence des gouttelettes lipidiques avant que les films interfaciaux ne soient créés (Dickinson, 1996; Graham & Phillips, 1979; McClements, 1998).

Les émulsions formées d'agrégats (A10S7,5) présentent plus de floculation à t0 que celles formées de protéines brutes (B10S7,5), avec des valeurs d'indices de floculation (IF) respectifs de 12,41 et 3,41 (**Tableau 11**). Cette augmentation de la floculation peut être la résultante de l'augmentation de l'hydrophobicité de surface suite au traitement thermique (**Chapitre V.2.2.3**). Celle-ci favoriserait les forces attractives entre les gouttelettes lipidiques et la formation de liaisons hydrophobes entre les protéines des films interfaciaux de plusieurs gouttelettes. Shao

& Tang (2014), ont également constaté une augmentation de la floculation après application d'un traitement thermique des protéines de soja de 95 °C pendant 15 min à pH 7. Ces auteurs ont justifié cette floculation par le fait que le traitement thermique entraînait la dénaturation complète et/ou l'agrégation des protéines qui sont très favorables aux interactions inter-gouttelettes. La dénaturation thermique entraîne la formation de coalescence après 24 h à 4 °C, avec un indice de coalescence (IC) de 2,18 (**Tableau 11**). La floculation aurait favorisé la coalescence en entraînant le rapprochement des gouttelettes lipidiques. La diminution de floculation après 24 h à 4 °C indique qu'une partie des floculats coalescent après rupture des films interfaciaux (**Tableau 11**). Une perte de flexibilité suite au traitement thermique pourrait avoir limité les réorganisations des protéines aux interfaces huile/eau diminuant leur capacité à former des films viscoélastiques résistants à la coalescence. (Graham & Phillips, 1979; McClements, 1998; Tadros, 2013).

### **VI.2.1.2. Emulsions formées à partir d'isolat obtenu à pH 12 (B12S3, B12S7,5 et A12S7,5)**

- **Protéines brutes (B12S3 vs B12S7,5)**

La distribution de taille des gouttelettes lipidiques des émulsions formées à partir de protéines brutes d'isolat obtenu par hydratation à pH 12 est similaire à pH 3 (B12S3) et pH 7,5 (B12S7,5), avec et sans SDS (**Figure 37**). Ceci se traduit par des  $d_{[4;3]}$  de floculats (sans SDS) et de gouttelettes individuelles (avec SDS) moyens sans différences significatives de 0,61 µm (**Tableau 11**). Ces protéines brutes semblent avoir de très bonnes capacités de diffusion et d'adsorption permettant de former des films interfaciaux qui réduisent la tension interfaciale très rapidement. Aucune floculation ni aucune coalescence ne sont observées pour ces émulsions témoignant d'une dominance des forces répulsives sur les forces attractives entre les gouttelettes lipidiques. Les protéines brutes d'isolat obtenu à pH 12 (B12S3 et B12S7,5) semblent alors avoir de meilleures propriétés émulsifiantes que celles d'isolat obtenu à pH 10 (B10S3 et B10S7,5), puisqu'elles tendent à former des émulsions avec de plus petites gouttelettes, moins de floculation et moins de coalescence.

Jiang et al. (2009) et Q. Wang et al. (2018), ont également observé qu'un shift à pH 12 des protéines de soja et de chanvre entraînait une augmentation de l'indice d'activité émulsifiante et une réduction de la taille des floculats. Ces auteurs ont attribué cela à l'augmentation d'hydrophobicité de surface et à l'augmentation et de la solubilité. Jiang et al. (2009), ont également montré que le shift des protéines de soja à pH 12 entraînait une dissociation des ponts

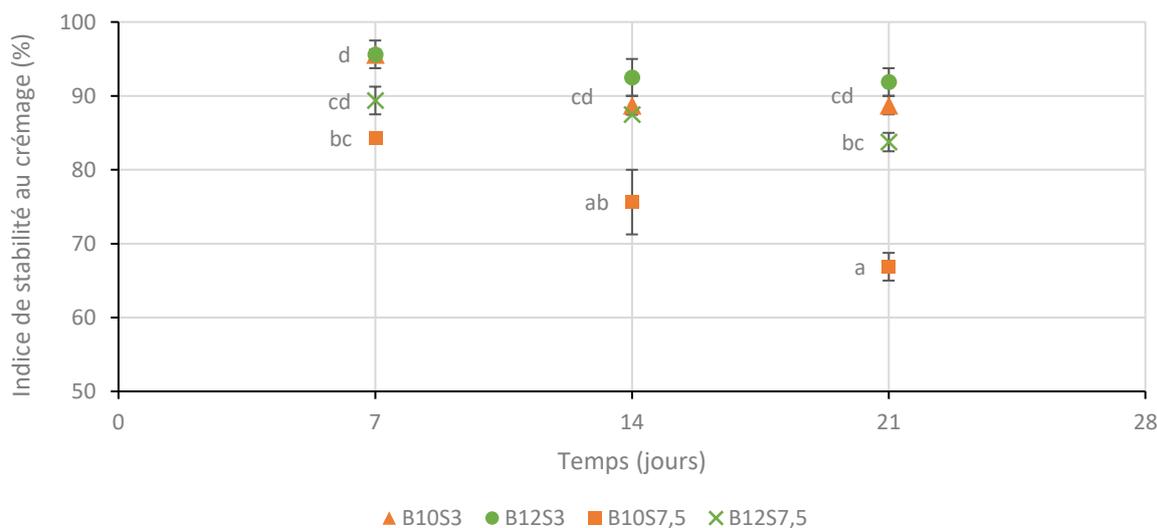
disulfures. Cette dissociation pourrait être favorable à la flexibilité des protéines, donc à leur aptitude à se déployer aux interfaces huile/eau. Dans notre étude, la présence de grands complexes entre protéines et phénols que nous soupçonnons, pourrait favoriser la formation de films interfaciaux épais et résistants et favoriser les répulsions stériques entre les gouttelettes lipidiques (McClements, 1998; Tadros, 2013).

- **Protéines agrégées thermiquement (A12S7,5 vs B12S7,5)**

L'application d'un traitement thermique aux isolats obtenus à pH 12, n'a aucun impact significatif sur les propriétés émulsifiantes, si ce n'est qu'une légère augmentation de la largeur de distribution (span) des émulsions (**Tableau 11**). Il a été présumé dans le **Chapitre V** que le traitement thermique devait avoir des effets modérés sur la structure des protéines d'isolat obtenu à pH 12 (A12S7,5) étant donné qu'elles sont déjà dénaturées au cours de l'extraction (**Chapitres III.3.7 et V.2.2.1**). Ceci a été déduit du fait que le traitement thermique n'a pas modifié l'hydrophobicité de surface (**Chapitre V.2.2.3**) et n'a pas entraîné la formation de grands agrégats insolubles (**Chapitres V.2.2.2 et V.2.2.5**).

## VI.2.2. Stabilité au crémage

L'indice de stabilité au crémage, a été déterminé sur les émulsions formées à pH 3 ou 7,5, à partir de protéines brutes issues d'isolat obtenu à pH 10 ou 12, après 7, 14 et 21 jours à température ambiante (**Figure 38**).



**Figure 38 : Indice de stabilité au crémage (%), des émulsions « témoins ».** 10 et 12 les émulsions formées à partir d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. B les émulsions formées à partir de protéines brutes issues de ces isolats. S3 et S7,5 les pH 3 et pH 7,5 de formation des émulsions. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Les émulsions formées à partir d'isolat obtenu à pH 12 (B12S3 et B12S7,5) ont une forte stabilité au crémage, constante après 7, 14 et 21 jours de stockage à température ambiante, avec une valeur moyenne de 90,1%. Cette stabilité est compréhensible de par les très faibles tailles de gouttelettes lipidiques et l'absence de coalescence observée **Chapitre VI.2.1**.

La stabilité au crémage de l'émulsion formée à pH 3 à partir d'isolat obtenu à pH 10 (B10S3) est également élevée sans différence significative avec les émulsions formées à partir d'isolat obtenu à pH 12 (B12S3 et B12S7,5), avec une valeur moyenne de 91%. En revanche, la stabilité au crémage de l'émulsion formée à pH 7,5 à partir d'isolat obtenu à pH 10 (B10S7,5) diminue au cours du temps, passant de 84,4% après 7 jours, à 66,9% après 21 jours de stockage à température ambiante. Pourtant, les émulsions formées à pH 3 à partir d'isolat obtenu à pH 10 (B10S3) présentent plus de coalescence et de floculation (**Chapitre VI.2.1**). Il est probable que la floculation importante ait permis la formation d'un réseau tri-dimensionnel de floculats, empêchant la remontée en surface des gouttelettes lipidiques comme expliqué par McClements (1998). Tang & Liu (2013), ont également observé qu'une floculation importante pouvait favoriser la stabilité au crémage d'émulsions de protéines de soja. Ces auteurs ont attribué l'augmentation de stabilité à la formation d'un réseau semblable à un gel faible. La floculation modérée de l'émulsion formée à pH 7,5 à partir d'isolat obtenu à pH 10 (B10S7,5), suggère que peu de gouttelettes lipidiques sont liées les unes aux autres. Les floculats ont alors eu une taille effective plus importante que les gouttelettes lipidiques individuelles, favorisant le crémage (McClements, 1998).

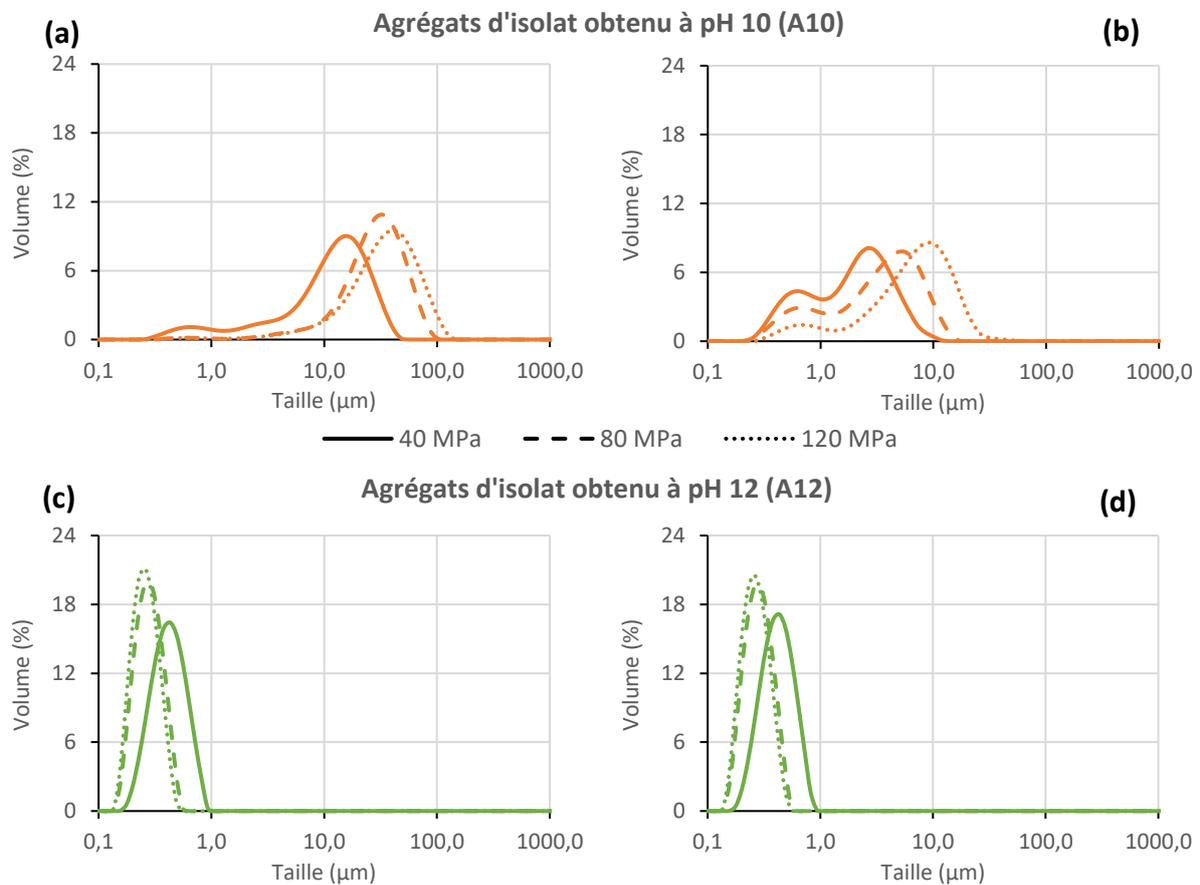
Comme dans notre étude, Jiang et al. (2009) et Q. Wang et al. (2018), ont également constaté après un shift des protéines de soja ou de chanvre à pH 12, une augmentation de la stabilité des émulsions à pH 7, permise par des tailles de gouttelettes lipidiques faibles. Ces auteurs ont également émis l'hypothèse que le dépliement des globulines par le shift à pH 12 pourrait mener à une conformation plus étendue avec plus de flexibilité.

## **VI.3. Emulsions « modèles »**

### **VI.3.1. Granulométrie des émulsions « modèles »**

Suite à l'étude des propriétés émulsifiantes des protéines de chanvre dans des émulsions « témoins », des émulsions « modèles » se rapprochant des conditions retrouvées dans des boissons végétales ont été formées. Celles-ci ont été préparées à pH 7,5 à partir de protéines dénaturées thermiquement et issues d'isolats obtenus à pH 10 (A10) ou à pH 12 (A12), avec

3,2% de protéines et 2% de lipides. Différentes pressions d'homogénéisation par microfluidisation (40, 80 et 120 MPa) ont été appliquées dans l'optique d'améliorer les propriétés émulsifiantes des protéines d'isolat obtenu à pH 10. La microfluidisation entraîne des forces de cavitation, de cisaillement et de turbulence pouvant réduire la taille des gouttelettes lipidiques et/ou modifier la structure des agrégats (Oliete et al., 2018; Paquin & Giasson, 1989). Des mesures par granulométrie ont été effectuées. La distribution de taille à t0 des floculats (sans SDS) et des gouttelettes lipidiques individuelles (avec SDS) est présentée **Figure 39**. La distribution de taille après 24 h de stockage à 4 °C figure en **Annexe 6**. Les données chiffrées issues des résultats de granulométrie à t0 et après 24 h de stockage à 4 °C sont présentées **Tableau 12**.



**Figure 39 : Distribution des tailles des gouttelettes lipidiques des différentes émulsions « modèles » à t0.** (a) et (b), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 10. (c) et (d), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 12. (a) et (c), distribution sans SDS. (b) et (d), distribution avec SDS. A10 et A12 les émulsions formées d'agrégats issus d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 40, 80 et 120 MPa, les pressions d'homogénéisation des émulsions par microfluidisation.

**Tableau 12 : Données chiffrées fournies par granulométrie laser des émulsions « modèles ».** t0 et t24, les données prises juste après formation des émulsions ou après 24 h à 4°C. SDS-, les données en absence de SDS.  $d_{[4;3]}$ , les diamètres moyens en  $\mu\text{m}$ . Span, la largeur de distribution de taille. IF et IC, les indices de floculation et de coalescence. A10 et A12, les émulsions formées d'agrégats issus d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 40, 80 et 120 MPa, les pressions d'homogénéisation des émulsions par microfluidisation. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Echantillon	Pression (MPa)	t0			t24		
		SDS -		SDS +	IF		IC
		Span	$d_{[4;3]} (\mu\text{m})$				
A10	40	1,94 e	13,40 d	2,36 b	4,71 c	1,11 ab	0,20 a
	80	1,52 c	31,38 e	4,04 b	7,32 d	1,77 b	2,74 b
	120	1,72 d	39,30 f	8,09 c	4,00 c	0,08 a	13,09 c
A12	40	0,92 b	0,44 a	0,43 a	0,01 a	-0,01 a	-0,50 a
	80	0,74 a	0,29 a	0,29 a	-0,01 a	-0,01 a	-0,61 a
	120	0,70 a	0,26 a	0,27 a	-0,04 a	-0,01 a	-0,62 a

### VI.3.1.1. Emulsions formées à partir d'isolat obtenue à pH 10 (A10)

Les émulsions formées à partir d'isolat obtenu à pH 10 (A10) présentent une distribution bimodale (**Figure 39**) en absence ou en présence de SDS. Les  $d_{[4;3]}$  des floculats (sans SDS) sont compris entre 13,4 et 39,3  $\mu\text{m}$ , et les  $d_{[4;3]}$  des gouttelettes individuelles (avec SDS) sont compris entre 2,36 et 8,09  $\mu\text{m}$  (**Tableau 12**). Comme dans les conditions « témoins » (**Chapitre VI.2.1**), ces émulsions présentent de la floculation avec des indices de floculation (IF) à t0 compris entre 4 et 7,32 (**Tableau 12**). Elles présentent également de la coalescence après 24 h à 4 °C avec des indices (IC) compris entre 0,2 et 13,09. La floculation diminue après 24 h à 4 °C témoignant d'une rupture des films interfaciaux menant à de la coalescence (**Tableau 12**). A la même pression d'homogénéisation de 40 MPa, les émulsions en conditions « modèles » ont des  $d_{[4;3]}$  plus faibles, moins de floculation et moins de coalescence que les émulsions en conditions « témoins » (**Chapitre VI.2.1**). L'augmentation du ratio protéine/huile semble favorable au recouvrement des interfaces huile/eau. Cependant les agrégats issus d'isolat obtenu à pH 10 (A10), ne semblent toujours pas aptes à former des émulsions à 40 MPa, étant donné les tailles de gouttelettes lipidiques individuelles (avec SDS) toujours élevées qui sont observées.

L'augmentation de pression de 40 à 120 MPa augmente proportionnellement la taille des gouttelettes individuelles (avec SDS) (**Tableau 12**). La pression entraînerait alors des modifications structurales des protéines et/ou de leur forme agrégée, défavorables à leur

déploiement aux interfaces huile/eau. L'augmentation de pression entraîne également une augmentation proportionnelle des  $d_{[4;3]}$  des floculats (sans SDS) et la coalescence (IC). Une pression de 80 MPa favorise la floculation, qui à son tour favorise la coalescence. La floculation à  $t_0$  (IF) augmente à 80 MPa mais pas à 120 MPa. Pourtant, à 120 MPa la taille des floculats (sans SDS) augmente (**Tableau 12**). Il est envisageable qu'une pression de 80 MPa, ait modifié la structure des agrégats présents dans les isolats, favorisant les forces attractives entre protéines de plusieurs films interfaciaux (Paquin & Giasson, 1989). Elle a peut-être permis de casser une partie des agrégats, diminuant leur taille et limitant les répulsions stériques. Elle a pu entraîner une augmentation de l'hydrophobicité de surface ou une diminution de la charge de surface. Une pression élevée de 120 MPa, a pu entraîner des modifications de structures excessives, limitant les forces répulsives entre les protéines qui ont pu s'agréger via les groupements hydrophobes, leur faisant perdre leur affinité pour les gouttelettes lipidiques et/ou entraînant la formation d'agrégats insolubles. Les réarrangements ont également pu mener à des structures moins flexibles. Les interfaces huile/eau ne seraient alors pas entièrement recouvertes et la collision des gouttelettes lipidiques mènerait à de la coalescence directe (Damodaran, 1997; Dickinson, 1996; McClements, 1998; Oboroceanu et al., 2011; Tadros, 2013). Par exemple, Shen & Tang (2012), ont traité thermiquement des protéines de soja à 75-95 °C pendant 30 min à pH 7 et les ont soumises ou non à une pression de microfluidisation de 120 MPa. Ces auteurs ont constaté que la pression de 120 MPa entraînait une augmentation de l'hydrophobicité de surface et que cette dernière menait à la formation d'émulsions avec des tailles de floculats plus importantes en favorisant les interaction hydrophobes inter-gouttelettes. Oliete et al. (2018), ont montré que l'application d'une pression de microfluidisation de 70 ou 130 MPa a des agrégats solubles de globulines de pois formés à 90 °C pendant 1 h à pH 7,2, entraînait une diminution de leur taille et de leur hydrophobicité de surface.

### **VI.3.1.2. Emulsions formées à partir d'isolat obtenu à pH 12 (A12)**

Les émulsions « modèles » formées d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12 (A12), présentent une distribution monomodale (**Figure 39**) et ne montrent pas de floculation (IF) et de coalescence (IC) (**Tableau 12**). Les valeurs d'indice de floculation et de coalescence négatives que nous avons obtenues, sont dues à de très légères variations de détections de taille  $<0,01 \mu\text{m}$ . Elles sont donc le fruit de la limite de précision de la granulométrie. Elles sont alors considérées comme nulles. A la même pression d'homogénéisation de 40 MPa, les agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12 (A12) montrent des comportements similaires en conditions « témoins » (**Chapitre VI.2.1**) et en conditions « modèles ». Ceci prouve que dans les conditions

« témoins » les protéines étaient déjà en concentration suffisante pour couvrir toutes les interfaces huile/eau. L'augmentation de pression d'homogénéisation de 40 à 120 MPa, n'a pas d'impact significatif sur les propriétés des émulsions si ce n'est, une légère homogénéisation de la taille des floculats, constatée par une diminution du span par des pressions de 80 et 120 MPa, sans différence significative entre ces 2 pressions (**Tableau 12**). Les structures de ces protéines ne semblent alors pas altérées par des pressions d'homogénéisation élevées. La microfluidisation aurait alors principalement impacter les grands agrégats insolubles. Etant donné la solubilité importante de 92% des agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12 (A12S7,5) constatée au **Chapitre V.2.2.5**, cette hypothèse expliquerait l'absence d'effet significatif de la pression d'homogénéisation. Oliete et al. (2018), ont d'ailleurs conclu leur article portant sur l'impact de la pression d'homogénéisation sur les propriétés émulsifiantes d'agrégats thermiques solubles de globulines de pois, en disant que la microfluidisation permettait de partiellement inverser les effets négatifs de l'agrégation thermique sur les propriétés émulsifiantes (plus de floculation de coalescence et moins de stabilité au crémage). Il est également envisageable que la formation de liaisons covalentes entre les protéines et les phénols ait renforcé la résistance de ces complexes aux fortes pressions.

### VI.3.2. Viscosité dynamique des émulsions « modèles »

La viscosité des émulsions « modèles » fraîchement préparées, a été mesurée à 25 °C (**Tableau 13**).

**Tableau 13 : Viscosité dynamique à 25 °C des émulsions « modèles ».** A10 et A12, les émulsions formées d'agrégats issus d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 40, 80 et 120 MPa, les pressions d'homogénéisation des émulsions par microfluidisation. Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .

Echantillon	Pression (MPa)	Viscosité (mPa.s)		
<b>A10</b>	40	2,66	± 0,08	a
	80	7,07	± 0,24	b
	120	7,87	± 0,56	b
<b>A12</b>	40	2,17	± 0,09	a
	80	2,60	± 0,04	a
	120	2,38	± 0,14	a

Les émulsions se comportent toutes comme des fluides Newtoniens, avec une augmentation linéaire de la force de cisaillement, en fonction de la vitesse de cisaillement comme constaté par Dapčević-Hadnadev et al. (2019), pour des émulsions formées de protéines de chanvre

obtenues par solubilisation alcaline et précipitation isoélectrique ou par micellisation. La viscosité est donc constante.

Les émulsions formées à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12 (A12), ont une viscosité faible, sans différence significative entre les pressions de microfluidisation appliquées, avec une valeur moyenne de 2,38 mPa.s. Cette faible viscosité peut s'expliquer par les très faibles tailles de gouttelettes lipidiques et l'absence de floculation (**Chapitre VI.3.1**). L'émulsion formée à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 10 (A10) à 40 MPa ne montre pas de différence significative avec les émulsions formées d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12 (A12), avec une valeur de viscosité de 2,66 mPa.s.

Pour les émulsions formées à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 10 (A10), la viscosité augmente avec l'augmentation de pression d'homogénéisation, sans différence significative entre 80 et 120 MPa avec une valeur moyenne de 7,47 mPa.s. Cette augmentation de viscosité est cohérente avec la présence de floculats de grandes tailles et de floculation dans ces émulsions (**Chapitre VI.3.1**). Desrumaux & Marcand (2002), ont en effet montré une forte corrélation positive entre la taille des gouttelettes lipidiques et la viscosité des émulsions, qui se retrouve dans notre étude.

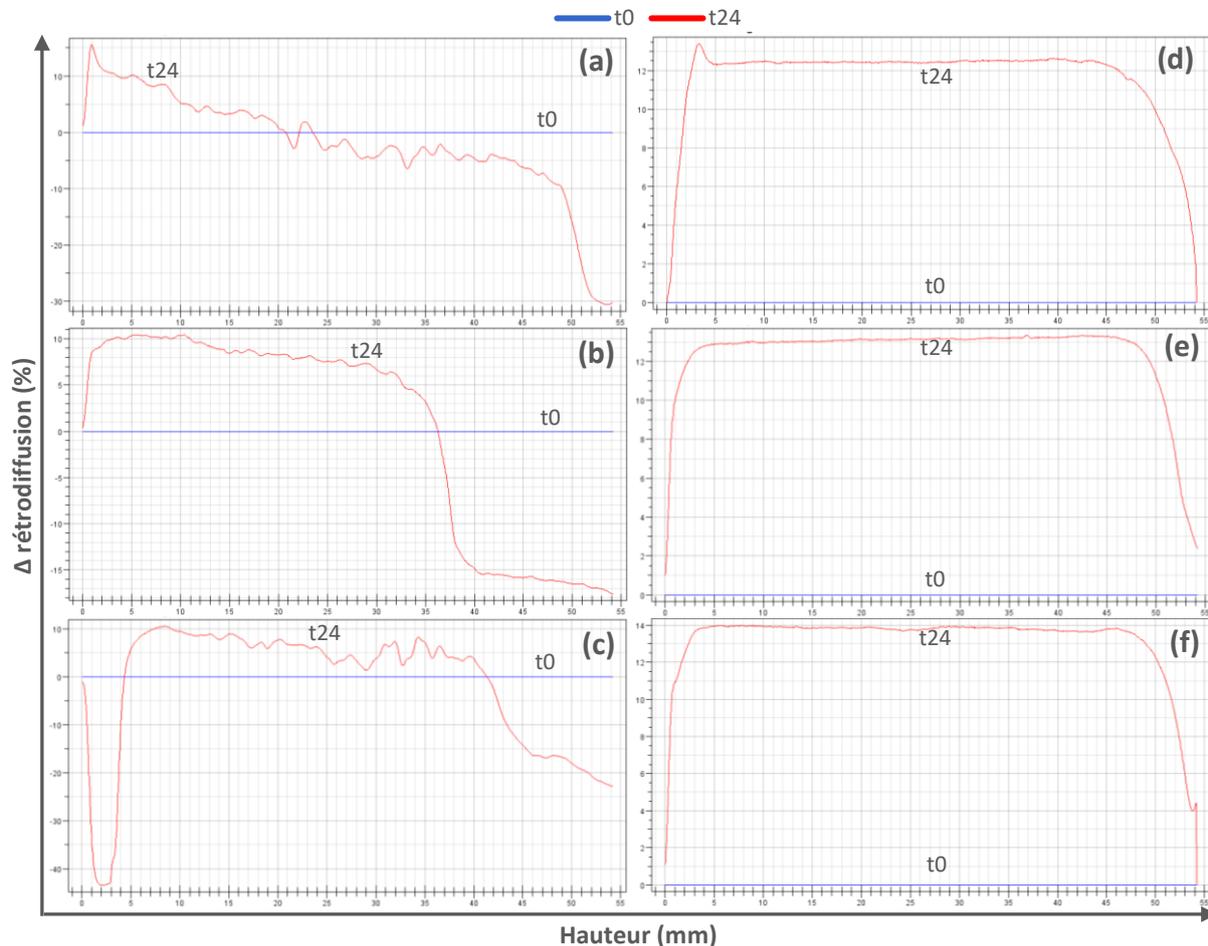
### **VI.3.3. Evolution de la rétrodiffusion**

La rétrodiffusion des émulsions « modèles » a été observée au Turbiscan, juste après formation des émulsions ( $t_0$ ), ou après 24 de stockage à température ambiante ( $t_{24}$ ) (**Figure 40**). Toutes les émulsions montrent des évolutions au cours des 24 h de stockage à température ambiante.

#### **VI.3.3.1. Emulsions formées à partir d'isolat obtenu à pH 10 (A10)**

Pour les émulsions formées à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 10 (A10), la rétrodiffusion sur la partie haute des émulsions diminue, témoignant d'une clarification. La rétrodiffusion de la partie basse de ces émulsions augmente. Un phénomène de sédimentation est alors présent. La présence d'agrégats insolubles (**Chapitres V.2.2.2 et V.2.2.5**) a pu favoriser la floculation et la formation d'une structure de type gel. Le réseau tridimensionnel ainsi formé serait plus dense que la phase aqueuse et aurait tendance à sédimenter. Des agrégats insolubles non impliqués dans ce réseau pourraient également sédimenter (Liu & Tang, 2016; McClements, 1998). La hauteur de la zone de clarification des émulsions tend à diminuer avec l'augmentation de pression d'homogénéisation. Ceci laisse penser à une amélioration de la

stabilité des émulsions par des pressions élevées d'homogénéisation. Cela est peut-être corrélé à l'augmentation de viscosité (**Chapitre VI.3.2**) qui diminuerait les mouvements des particules en suspension et limiterait leur sédimentation (Damodaran, 1997; McClements, 1998; Tadros, 2013).



**Figure 40 : Evolution de la rétrodiffusion des émulsions « modèles », après 24h à température ambiante.** (a), (b) et (c), les émulsions formés à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 10. (d), (e) et (f), les émulsions formés à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12. (a) et (d) les émulsions homogénéisées à 40 MPa, (b) et (e) à 80 MPa et (c) et (f), à 120 MPa. t0 et t24 les données prises juste après formation des émulsions ou après 24 h à température ambiante.

### **VI.3.3.2. Emulsions formées à partir d'isolat obtenu à pH 12 (A12)**

La rétrodiffusion des émulsions formées à partir d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12 (A12) augmente fortement sur toute la hauteur des émulsions. Cette augmentation est d'autant plus importante que la pression de formation des émulsions est élevée. En fait, après 24 h à température ambiante des gels se sont formés de façon spontanée, expliquant cette augmentation de la rétrodiffusion. L'augmentation de rétrodiffusion d'autant plus importante que la pression d'homogénéisation des émulsions est importante, peut signifier la formation d'un réseau de protéines plus dense à forte pression. La formation de gels à froid par

microfluidisation correspond réellement à la formation d'émulsions de type gel. Ce type de gel se forme généralement partir d'agrégats protéiques. Ces derniers vont mener à une forte floculation et à la formation d'un large réseau tridimensionnel de floculats très visqueux (Liu & Tang, 2016; Luo, Liu, & Tang, 2013; Oliete et al., 2018; Tang & Liu, 2013). Liu & Tang (2016), ont réalisé des émulsions à pH 7 à partir de globulines 11S de soja natives ou agrégées thermiquement à 100 °C pendant 30 min à pH 7, par homogénéisation par microfluidisation à 40 MPa. Ces auteurs ont également observé la formation de gels seulement pour les émulsions à base d'agrégats. Plus les concentrations en huile et/ou en protéine ont été importantes, plus des gels visqueux ont été formés. Pourtant, ces auteurs ont obtenu des plus petites tailles de gouttelettes lipidiques pour les émulsions à base d'agrégats. Ces derniers ont observé que la formation de gels était étroitement liée à un pourcentage élevé de protéines adsorbées à l'interface, ou piégées dans le réseau. Il est possible que dans notre cas, la formation de gels soit gouvernée par les mêmes phénomènes.

## **VI.4. Conclusion partielle**

Ce chapitre a permis de mettre en évidence des propriétés émulsifiantes bien distinctes, entre les protéines brutes et agrégées thermiquement issues des différents isolats.

Les isolats formés à partir de protéines issues d'isolat obtenu à pH 12, ont montré de fortes propriétés émulsifiantes en conditions « témoins » ou « modèles », quel que soit le pH (3 ou 7,5), l'état des protéines (brutes ou agrégées thermiquement), ou la pression d'homogénéisation (40, 80 ou 120 MPa). Ces émulsions ont en effet présenté des tailles de gouttelettes lipidiques très faibles (<1 µm) et n'ont présenté ni de floculation ni de coalescence. Ces émulsions ont par conséquent été très stables face au crémage. La dénaturation et les réarrangements structuraux engendrés par l'extraction à pH 12, pourraient avoir augmenté la flexibilité des protéines, favorisant leur déploiement rapide aux interfaces huile/eau et favorisant la création d'un film interfacial viscoélastique résistant à la coalescence. Les grands complexes protéines/phénols probablement formés via des liaisons covalentes, pourraient avoir favorisé les répulsions stériques entre les gouttelettes et limiter la floculation. En conditions « modèles », les émulsions formées d'agrégats thermiques ont créé des gels différés au bout de 24 h à température ambiante, certainement par la formation d'une grande structure tridimensionnelle de floculats reliés par ces agrégats.

Les émulsions formées à partir de protéines brutes d'isolat obtenu à pH 10 ont eu plus de floculation et de coalescence que celles formées à partir d'isolats obtenu à pH 12. La présence d'agrégats insolubles (surtout à pH 3) pourrait avoir favorisé une floculation par déplétion ou par pontage. Le rapprochement des gouttelettes par la floculation a ensuite favorisé la coalescence suite à une rupture des films interfaciaux. La stabilité au crémage des protéines brutes d'isolat obtenu à pH 10 semble avoir été dépendante de la floculation. A pH 3, une floculation importante aurait créé un réseau tridimensionnel de floculats, limitant le crémage. A pH 7,5, la floculation modérée aurait entraîné une augmentation du diamètre apparent des gouttelettes lipidiques, favorisant le crémage. La dénaturation thermique des protéines d'isolat obtenu à pH 10 a entraîné une grande diminution de leurs propriétés émulsifiantes. Les protéines dénaturées n'ont pas permis d'émulsifier rapidement les gouttelettes lipidiques dont les  $d_{[4;3]}$  (avec SDS) ont été compris entre 2,36 et 13,20  $\mu\text{m}$ . Ceci témoigne d'une faible capacité de diffusion et d'adsorption. Le traitement thermique a également conduit à une augmentation de la floculation et de la coalescence. Cette perte de propriétés émulsifiantes peut être due à des réorganisations des protéines en agrégats via des liaisons hydrophobes, diminuant leur affinité pour les gouttelettes lipidiques. Elle peut être due également à une diminution de la flexibilité des protéines, diminuant leur vitesse d'adsorption et leur aptitude à former un film interfacial viscoélastique résistant à la coalescence. L'exposition des groupements hydrophobes aurait favorisé l'apparition d'une floculation très importante. Dans les conditions « modèles » l'augmentation de pression d'homogénéisation a augmenté la floculation et la coalescence. Ceci a été occasionné certainement par des modifications de structures des agrégats, modifiant l'équilibre entre forces attractives et répulsives et limitant l'aptitude des protéines à se déployer et à stabiliser les interfaces huile/eau. Les émulsions sont restées liquides après 24 h à température ambiante et se sont déstabilisées principalement par sédimentation. Cela a probablement été dû à une forte densité des réseaux de floculats formés ou à une sédimentation des agrégats insolubles non impliqués dans la formation de ces derniers. L'augmentation de pression d'homogénéisation a favorisé la stabilité des émulsions potentiellement grâce à l'augmentation de leur viscosité.



# **Conclusion générale et perspectives**



## Conclusion générale

Les objectifs principaux de cette thèse étaient dans un premier temps, de définir et comprendre les conditions d'extraction des protéines de chanvre à partir de tourteau brut, permettant d'obtenir des isolats protéiques avec des rendements et des puretés protéiques importants. Dans un second temps, ils étaient de comprendre les effets de ces conditions d'extraction sur les propriétés physico-chimiques et émulsifiantes des protéines de chanvre. Pour répondre à ces objectifs, le travail a été divisé en trois axes : la définition des conditions d'extraction, l'étude des propriétés physicochimiques des protéines de chanvre extraites selon les conditions définies et l'étude de leurs propriétés émulsifiantes. Il n'existe pas sur le marché de réels isolats de protéines de chanvre à forte pureté protéique. Les produits trouvés sont généralement issus de tourteau broyé, parfois raffiné et ont des teneurs en protéines de ~50-65%. Ces faibles taux protéiques impliquent la présence d'impuretés telles que des fibres, des phénols, des lipides et d'autres composés antinutritionnels qui peuvent altérer les propriétés techno-fonctionnelles, nutritionnelles et organoleptiques des protéines. Les travaux que nous avons menés dans cette étude ont permis d'obtenir de réels isolats avec des rendements qui seraient probablement économiquement viables. En revanche, ces derniers sont extraits à pH alcalins pouvant altérer la structure des protéines et entraîner des complexations avec les phénols. Bien que nos études préliminaires semblent concluantes sur les propriétés techno-fonctionnelles et nutritionnelles des isolats obtenus, il reste à poursuivre les expérimentations avant de pouvoir conclure sur le réel potentiel industriel de ces isolats.

- **Conditions d'extraction**

Nous nous sommes imposés plusieurs objectifs pour l'extraction. Le premier a été de ne pas déliper les tourteaux au solvant, pour des motifs écologiques, économiques et pour combler un manque de donnée de la littérature. Nous avons voulu éviter la précipitation isoélectrique pour éviter de fortes interactions entre les protéines qui pourraient en insolubiliser une partie de manière irréversible. Ce choix a également été fait pour ne pas éliminer les albumines qui semblent présenter des intérêts technologiques et nutritionnels. Enfin, nous nous sommes fixés des objectifs de rendement de solubilisation de plus de 40% et de pureté protéique de plus de 80%.

Les rendements d'extraction protéique ont été les meilleurs aux faibles ratios massiques tourteau/eau (5-10%). L'extractabilité des protéines a été élevée uniquement aux pH alcalins.

Elle a été d'autant plus élevée que le pH l'a été, certainement grâce à une augmentation de la solubilité des protéines couplée à une déstabilisation des parois cellulaires. De plus, les globulines ont commencé à être solubilisées simultanément aux albumines, uniquement à ces pH. Cependant des composés phénoliques ont aussi été solubilisés. Ces derniers ont engendré des colorations jaunâtres à brunâtres d'autant plus intenses que le pH est élevé, probablement à cause de leur oxydation. Ils semblent avoir formé de grands complexes avec les protéines aux pH très alcalins (11-12) impliquant probablement des liaisons covalentes. L'ajout de NaCl n'a pas permis d'améliorer suffisamment l'extractabilité des protéines à pH moins alcalin (pH 9) pour pouvoir atteindre notre objectif de rendement de solubilisation. Une extraction à pH alcalin a alors été contrainte.

Le pH 10 a été sélectionné car il semble être la limite avant des complexations importantes entre protéines et phénols. Le pH 12 a été sélectionné pour le rendement d'extraction maximal qu'il a offert malgré la formation d'agrégats et la dénaturation des protéines par ce pH. Une étape de filtration par ultrafiltration a été nécessaire pour augmenter la pureté protéique des isolats au-delà de l'objectif de pureté protéique fixé, sans effet sensible sur l'élimination des composés phénoliques. L'atomisation a permis une qualité protéique similaire à la lyophilisation. Les paramètres d'extraction à 10% massique de tourteau dans de l'eau distillée à pH 10 ou 12, sans NaCl, avec une dia-filtration par ultrafiltration par 4 dia-volumes d'eau distillée à pH 10 et séchage par atomisation, ont alors été choisis. Les isolats protéiques bruts obtenus sous ces conditions ont eu une digestibilité *in vitro* moyenne de 84,1% plus importante que la digestibilité *in vitro* initiale des protéines de tourteau de 65,5%. L'augmentation de pureté, par élimination de fibres et/ou de composés antinutritionnels a certainement été responsable de cette augmentation de digestibilité.

- **Protéines extraites à pH 10**

L'extraction à pH 10 a permis d'obtenir des protéines natives. A ce pH d'extraction, il ne semble pas y avoir eu d'importantes complexations avec les phénols via des liaisons covalentes. La solubilité de ces protéines à pH 3 et 7,5 a été respectivement de 51 et 56%. La solubilité a été gouvernée majoritairement par la charge de surface et les diamètres granulométriques des protéines. Des faibles diamètres granulométriques auraient limité la sédimentation, tandis que des fortes charges de surface auraient favorisé les répulsions électrostatiques. La solubilité n'a pas montré de relation avec l'hydrophobicité de surface, laissant envisager une dominance des forces répulsives sur les forces attractives. Le traitement thermique des protéines extraites à pH

10 a entraîné le dépliement des globulines menant à une exposition des groupements hydrophobes initialement contenus dans leur cœur. La constatation de l'augmentation d'hydrophobicité de surface laisse envisager que tous ces groupements nouvellement exposés n'ont pas été impliqués dans la formation d'agrégats. Il est possible que des agrégats fractals se soient formés. Ces réarrangements en agrégats fractals pourraient avoir masqué les sites protéolytiques, expliquant la diminution de digestibilité *in vitro* de 89,2 à 73,4%.

Les émulsions formées à partir de protéines brutes ont eu de faibles tailles de gouttelettes lipidiques témoignant d'une bonne capacité de diffusion et d'adsorption des protéines. Ces émulsions ont montré de la floculation et une légère coalescence. La floculation a pu être entraînée par déplétion engendrée par de grands agrégats insolubles (surtout pour les émulsions formées à pH 3). La floculation, par le rapprochement des gouttelettes lipidiques a favorisé la coalescence suite à une rupture des films interfaciaux. Les émulsions formées à pH 3 ont été stables face au crémage, certainement grâce à la formation d'un réseau tridimensionnel de floculats. A pH 7,5, la floculation modérée aurait augmenté le diamètre apparent des gouttelettes lipidiques et favorisé le crémage.

La dénaturation thermique des protéines extraite à pH 10 leur ont fait perdre leurs propriétés émulsifiantes. Les émulsions formées de ces agrégats ont eu de grandes tailles de gouttelettes lipidiques individuelles, une forte floculation et de la coalescence. L'augmentation d'hydrophobicité de surface par le traitement thermique aurait favorisé la floculation. La formation d'agrégats via ces groupements hydrophobes pourrait avoir limité l'affinité des protéines pour les gouttelettes lipidiques et/ou augmenté leur rigidité. Les agrégats n'auraient alors plus l'aptitude de se déployer rapidement aux interfaces huile/eau ni de former des films viscoélastiques résistants à la coalescence.

Dans les conditions « modèles » l'application de fortes pressions d'homogénéisation jusqu'à 120 MPa n'a pas permis d'améliorer les propriétés émulsifiantes de ces agrégats. L'augmentation de pression a au contraire entraîné une augmentation de la floculation et de la coalescence. Ceci a potentiellement été entraîné par des modifications de la structure des agrégats, modifiant l'équilibre entre forces répulsives et forces attractives et limitant leur aptitude à se déployer aux interfaces huile/eau et à stabiliser ces dernières. Les émulsions « modèles » sont restées liquides après 24 h à température ambiante et se sont déstabilisées par sédimentation. La formation d'un réseau de floculats de forte densité et la sédimentation des agrégats insolubles non impliqués dans la formation de ce réseau ont pu en être la cause.

L'augmentation de pression d'homogénéisation semble avoir amélioré la stabilité des émulsions, peut être grâce à une augmentation de leur viscosité.

- **Protéines extraites à pH 12**

L'extraction à pH 12 a entraîné une dénaturation des protéines certainement via une forte charge de surface. Cette dernière aurait mené à de fortes forces de répulsions électrostatiques et d'hydratation dans le cœur des globulines, entraînant leur dépliement et potentiellement des dissociations des sous unités. Ce pH fortement alcalin pourrait avoir engendré des ruptures de ponts disulfures. Les globulines adopteraient ensuite une structure en « globules fondus ». Ces modifications de structures et potentiellement les complexations avec les phénols semblent avoir amélioré la solubilité des protéines de chanvre à pH 3 et 7,5, certainement via une exposition accrue en surface des groupes chargés. Comme pour les protéines extraites à pH 10, la solubilité a été gouvernée majoritairement par la charge de surface et les diamètres granulométriques des protéines. L'hydrophobicité de surface semble également avoir eu des effets limités sur la solubilité des protéines. La solubilité des protéines brutes à pH 3 et 7,5 a ainsi été supérieure à 60%. Le traitement thermique semble avoir eu des effets limités sur ces protéines déjà dénaturées. Il n'a pas entraîné de modification de l'hydrophobicité de surface mais à tout de même permis une augmentation de la solubilité à pH 7,5 probablement par une augmentation de la charge de surface. A ce pH, la solubilité est passée à plus de 90%. Le traitement thermique a amélioré la digestibilité *in vitro* de ces protéines passant de 79 à 95,9%, probablement grâce au gain de solubilité ou à l'inactivation d'inhibiteurs de trypsine par la chaleur.

Les modifications structurales des protéines par le pH 12 et/ou les complexations avec les phénols ont amélioré les propriétés émulsifiantes des protéines de chanvre. Ces dernières ont montré de fortes propriétés émulsifiantes en conditions « témoins » et « modèles », à l'état brut et agrégé, à pH 3 et 7,5 et à toutes les pressions d'homogénéisation (40, 80 et 120 MPa). Ces émulsions ont eu des tailles de gouttelettes <1 µm et n'ont pas présenté de floculation ni de coalescence. Elles ont donc été très stable face au crémage. Les modifications structurales des protéines par le pH 12 et les complexations avec les phénols via des liaisons covalentes pourraient avoir augmenté leur flexibilité et favorisé les répulsions stériques et électrostatiques entre les gouttelettes lipidiques. En conditions « modèles », après 24 h à température ambiante les émulsions ont évolué en une structure de type gel certainement par la création d'un large

réseau tridimensionnel de flocculats via les agrégats protéiques probablement complexés à des phénols.

## Perspectives de recherche

Comme souvent en recherche scientifique, les réponses obtenues lors de cette thèse ont soulevé de nombreuses autres questions et de nombreuses perspectives de travail. Cette partie dresse une liste non exhaustive des travaux qui pourraient être réalisés afin d'améliorer la compréhension des résultats de cette étude et de poursuivre les recherches.

La solubilisation des protéines dépend à la fois de leur solubilité mais également de la déstabilisation des parois cellulaires dans lesquelles elles sont incluses. Les pH très alcalins peuvent altérer les protéines. Dans ce sens, il serait intéressant de chercher à augmenter la solubilisation des protéines à plus faibles pH par l'utilisation d'ultrasons, de champs électriques pulsés, par hydrolyse enzymatique des glucides ou par tout autre procédé pouvant déstabiliser les parois cellulaires. L'impact du temps et de la température d'hydratation (en restant inférieure à la température de dénaturation des globulines) sur la solubilisation des protéines pourrait également être étudié.

Afin de mieux comprendre les extractions et les propriétés physicochimiques et nutritionnelles des isolats, des techniques chromatographiques pourraient être réalisées pour quantifier le ratio globuline/albumine des graines entières, des tourteaux et des différents isolats. Un isolat de globulines de chanvre pourrait être réalisé à partir de la même matière première par extraction classique de solubilisation alcaline à pH 10 et précipitation au point isoélectrique à pH 5. Ceci dans le but de comparer ses propriétés à celles des isolats obtenus dans cette thèse afin d'aider à conclure sur l'intérêt des méthodes d'extraction employées ici.

Une meilleure compréhension de l'impact des phénols et des lipides dans les isolats est nécessaire. Il faudrait quantifier les phénols totaux au Folin Ciocalteu après leur extraction au solvant et éventuellement déterminer leur composition par chromatographie. Connaître le degré d'oxydation des lipides et des phénols par techniques colorimétriques avec mesures d'absorbance, permettrait de mieux comprendre les colorations engendrées par ces derniers et les complexations qu'ils engendrent. Etudier plus amplement ces complexes, par analyses microscopiques, détermination de leur masse par SEC-MALS (chromatographie par exclusion de taille à diffusion de lumière multi-angle) et détermination du type d'interactions en jeu, aiderait à leur compréhension. Comparer tout simplement les propriétés physicochimiques, fonctionnelles, nutritionnelles et organoleptiques des isolats retirés de leurs lipides et de leurs

phénols à l'aide de solvants, avec les propriétés des isolats bruts, apporterait déjà de nombreuses réponses quant à leur impact sur ces propriétés.

Comprendre les effets du pH 12 sur la structure des protéines de chanvre est primordial. La détermination de leur structure secondaire par dichroïsme circulaire, de leur hydrophobicité par mesures de la fluorescence intrinsèque du tryptophane ou des dosages de thiols libres iraient dans ce sens. Il est important de doser la quantité de lysinoalanine des isolats, un composé toxique pour les reins qui peut être formé à pH très alcalin, ainsi que d'autres composés d'oxydation des lipides qui peuvent être toxiques. Déterminer le profil en acides aminés des isolats pour connaître leur réelle valeur nutritionnelle peut également être intéressant, d'autant plus que la formation de lysinoalanine diminue la disponibilité de la lysine et de l'alanine.

L'étude des propriétés émulsifiantes des isolats obtenus dans cette étude doit être approfondie. L'aspect microscopique des émulsions pourrait être observé. Des mesures de tension de surface et de tension interfaciale favoriseraient la compréhension des propriétés des films interfaciaux créés. La détermination de la concentration protéique aux interfaces s'inscrirait dans cette optique. Etudier l'impact de différentes concentrations lipidiques et protéiques sur les propriétés émulsifiantes pourrait renseigner sur les potentielles applications que ces isolats pourraient avoir. Pour les émulsions « modèles » formées d'agrégats issus d'isolat obtenu à pH 12, la formation de gels différés après 24 h à température ambiante malgré des propriétés d'émulsions à  $t_0$  reflétant une forte stabilité, nécessite d'être comprise. Déterminer la cinétique et les mécanismes de formation de ces gels semble important. Appliquer la microfluidisation directement sur les agrégats et étudier leurs propriétés physicochimiques et émulsifiantes, aiderait à comprendre les modifications structurales des protéines engendrées par les hautes pressions dynamiques.

Les propriétés gélifiantes et moussantes des isolats, avec ou sans traitements de fonctionnalisation peuvent aussi être étudiées afin de définir de nouveaux potentiels d'utilisation. Dans ce sens, la réalisation de préparations de grades alimentaires tels que des laits, yaourts, fromages, mousses dessert, glaces... couplées à des analyses sensorielles et rhéologiques pourraient être réalisées.



# Références bibliographiques



- Achouri, A., Nail, V., & Boye, J. I. (2012). Sesame protein isolate : fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research International*, 46(1), 360-369. doi: 10.1016/j.foodres.2012.01.001
- Ahrens, S., Venkatachalam, M., Mistry, A. M., Lapsley, K., & Sathe, S. K. (2005). Almond (*Prunus dulcis* L.) protein quality. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3), 123-128. doi: 10.1007/s11130-005-6840-2
- Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877. doi: 10.1038/nprot.2007.102
- Akbari, A., & Wu, J. (2015). An integrated method of isolating napin and cruciferin from defatted canola meal. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 308-315. doi: 10.1016/j.lwt.2015.05.046
- Alizadeh-Pasdar, N., & Li-Chan, E. C. Y. (2000). Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 328-334. doi: 10.1021/jf990393p
- Aluko, R. E. (2017). Hemp seed (*Cannabis sativa* L.) Proteins : composition, structure, enzymatic modification, and functional or bioactive properties. In *Sustainable Protein Sources* (p. 121-132). doi: 10.1016/B978-0-12-802778-3.00007-X
- Amaducci, S., Scordia, D., Liu, F. H., Zhang, Q., Guo, H., Testa, G., & Cosentino, S. L. (2015). Key cultivation techniques for hemp in Europe and China. *Industrial Crops and Products*, 68, 2-16. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.06.041
- Angulo-Bejarano, P. I., Verdugo-Montoya, N. M., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Lopez-Valenzuela, J. A., Reyes-Moreno, C. (2008). Tempeh flour from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nutritional and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 106(1), 106-112. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.05.049
- Anwar, F., Latif, S., & Ashraf, M. (2006). Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), 323-329. doi: 10.1007/s11746-006-1207-x
- Arntfield, S. D. (2011). 11—Canola and other oilseed proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Éd.), *Handbook of Food Proteins* (p. 289-315). doi: 10.1533/9780857093639.289
- Arntfield, S. D. (2018). 7—Proteins from oil-producing plants. In R. Y. Yada (Éd.), *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (p. 187-221). doi: 10.1016/B978-0-08-100722-8.00008-5
- Ash, A. L. (1948). Hemp—production and utilization. *Economic Botany*, 2(2), 158-169. doi: 10.1007/BF02858999
- Aukema, H. M., Gauthier, J., Roy, M., Jia, Y., Li, H., & Aluko, R. E. (2011). Distinctive effects of plant protein sources on renal disease progression and associated cardiac hypertrophy in experimental kidney disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(7), 1044-1051. doi: 10.1002/mnfr.201000558

- Bair, C. W. (1979). Microscopy of soybean seeds : Cellular and subcellular structure during germination, development and processing with emphasis on lipid bodies. *Retrospective Theses and Dissertations*, 281. doi: <https://doi.org/10.31274/rtd-180813-5586>
- Balentić, J. P., Jozinović, A., Ačkar, Đ., Babić, J., Miličević, B., Benšić, M., Šubarić, D. (2019). Nutritionally improved third generation snacks produced by supercritical CO<sub>2</sub> extrusion I. Physical and sensory properties. *Journal of Food Process Engineering*, 42(2), e12961. doi: 10.1111/jfpe.12961
- Betschart, A. (1975). Factors influencing the extractability of safflower protein (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Food Science*, 40(5), 1010-1013. doi: 10.1111/j.1365-2621.1975.tb02255.x
- Bouloc, P. (2006). *Le chanvre industriel : Production et utilisations*. France Agricole Editions.
- Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). 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. doi: 10.1016/j.foodres.2009.07.021
- Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 143-151. doi: 10.1016/S0924-2244(98)00031-4
- Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource : an overview. *Euphytica*, 140(1-2), 65-72. doi: 10.1007/s10681-004-4811-6
- Carus, M., Karst, S., Kauffmann, A., Hobson, J., & Bertucelli, S. (2013). *The European Hemp Industry : Cultivation, processing and applications for fibres, shivs, seeds and flowers (Update: March 2017)*. Consulté à l'adresse European Industrial Hemp Association website: <http://eiha.org/document/the-european-hemp-industry-cultivation-processing-and-applications-for-fibres-shivs-seeds-and-flowers-update-march-2017/>
- Chen, T., He, J., Zhang, J., Li, X., Zhang, H., Hao, J., & Li, L. (2012). The isolation and identification of two compounds with predominant radical scavenging activity in hempseed (seed of *Cannabis sativa* L.). *Food Chemistry*, 134(2), 1030-1037. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.009
- Cheung, L., Wanasundara, J., & Nickerson, M. T. (2014). The effect of pH and NaCl levels on the physicochemical and emulsifying properties of a cruciferin protein isolate. *Food Biophysics*, 9(2), 105-113. doi: 10.1007/s11483-013-9323-2
- Chihi, M. L. (2016). *Etude des interactions dans la formation d'agrégats thermiques mixtes entre globulines de pois et bêta-lactoglobuline : Application à l'élaboration de gels acides* (Université de Bourgogne). Consulté à l'adresse <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01447760/document>
- Chihi, M. L., Mession, J., Sok, N., & Saurel, R. (2016). Heat-induced soluble protein aggregates from mixed pea globulins and  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(13), 2780-2791. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00087

- Chung, M. W. Y., Lei, B., & Li-Chan, E. C. Y. (2005). Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chemistry*, *90*(1), 271-279. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.07.038
- Cilliers, J. J. L., & Singleton, V. L. (1989). Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *37*(4), 890-896. doi: 10.1021/jf00088a013
- Clark, A. H., Kavanagh, G. M., & Ross-Murphy, S. B. (2001). Globular protein gelation— theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, *15*(4–6), 383-400. doi: 10.1016/S0268-005X(01)00042-X
- Colombo, A., Ribotta, P. D., & León, A. E. (2010). Differential scanning calorimetry (DSC) studies on the thermal properties of peanut proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 4434-4439. doi: 10.1021/jf903426f
- Crescente, G., Piccolella, S., Esposito, A., Scognamiglio, M., Fiorentino, A., & Pacifico, S. (2018). Chemical composition and nutraceutical properties of hempseed : an ancient food with actual functional value. *Phytochemistry Reviews*, *17*(4), 733-749. doi: 10.1007/s11101-018-9556-2
- Dalgalarondo, M., Robin, J.-M., & Azanza, J.-L. (1986). Subunit composition of the globulin fraction of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Science*, *43*(2), 115-124. doi: 10.1016/0168-9452(86)90151-2
- Damodaran, S. (1997). *Food Proteins and Their Applications*. CRC Press.
- Dapčević-Hadnađev, T., Dizdar, M., Pojić, M., Krstonošić, V., Zychowski, L. M., & Hadnađev, M. (2019). Emulsifying properties of hemp proteins : effect of isolation technique. *Food Hydrocolloids*, *89*, 912-920. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.12.002
- Dapčević-Hadnađev, T., Hadnađev, M., Lazaridou, A., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2018). Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part II. gelation properties at different ionic strengths. *Food Hydrocolloids*, *81*, 481-489. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.03.022
- Desrumaux, A., & Marcand, J. (2002). Formation of sunflower oil emulsions stabilized by whey proteins with high-pressure homogenization (up to 350 MPa) : effect of pressure on emulsion characteristics. *International Journal of Food Science & Technology*, *37*(3), 263-269. doi: 10.1046/j.1365-2621.2002.00565.x
- Dickinson, E. (1996). *Les colloïdes alimentaires*. Paris, France: Masson.
- Docimo, T., Caruso, I., Ponzoni, E., Mattana, M., & Galasso, I. (2014). Molecular characterization of edestin gene family in *Cannabis sativa* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, *84*, 142-148. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.09.011
- Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., & Attia, H. (2007). Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chemistry*, *103*(2), 641-650. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.09.008

- Erbaş, M., Certel, M., & Uslu, M. K. (2005). Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.). *Food Chemistry*, 89(3), 341-345. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.02.040
- Escamilla-Silva, E. M., Guzmán-Maldonado, S. H., Cano-Medinal, A., & González-Alatorre, G. (2003). Simplified process for the production of sesame protein concentrate. Differential scanning calorimetry and nutritional, physicochemical and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(9), 972-979. doi: 10.1002/jsfa.1434
- FAO. (2018). The state of food security and nutrition in the world. Consulté 26 mars 2019, à l'adresse [Www.fao.org](http://www.fao.org) website: <http://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition/en/>
- FAO. (s. d.). How to feed the world in 2050. Consulté 26 mars 2019, à l'adresse FAO website: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert\\_paper/How\\_to\\_Feed\\_the\\_World\\_in\\_2050.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf)
- FAO/WHO, & UNU (Éd.). (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. Geneva: WHO.
- Ferreira Machado, F., Coimbra, J. S. R., Garcia Rojas, E. E., Minim, L. A., Oliveira, F. C., & Sousa, R. de C. S. (2007). Solubility and density of egg white proteins : effect of pH and saline concentration. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), 1304-1307. doi: 10.1016/j.lwt.2006.08.020
- Forster, L. L., & Ferrier, L. K. (1979). Viscometric characteristics of whole soybean milk. *Journal of Food Science*, 44(2), 583-590. doi: 10.1111/j.1365-2621.1979.tb03841.x
- Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2101-2110. doi: 10.1021/jf990489j
- Galasso, I., Russo, R., Mapelli, S., Ponzoni, E., Brambilla, I. M., Battelli, G., & Reggiani, R. (2016). Variability in seed traits in a collection of *Cannabis sativa* L. genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 7(688), 1-9. doi: 10.3389/fpls.2016.00688
- Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M., & Aider, M. (2016). Study of total dry matter and protein extraction from canola meal as affected by the pH, salt addition and use of zeta-potential/turbidimetry analysis to optimize the extraction conditions. *Food Chemistry*, 201, 243-252. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.074
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A., & Cayot, P. (2010). Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 122(2), 447-454. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.017
- Girgih, A. T., Alashi, A., He, R., Malomo, S., & Aluko, R. E. (2013). Preventive and treatment effects of a hemp seed (*Cannabis sativa* L.) meal protein hydrolysate against high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Nutrition*, 53(5), 1237-1246. doi: 10.1007/s00394-013-0625-4

- Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Offengenden, M., Wu, J., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods*, 6, 384-394. doi: 10.1016/j.jff.2013.11.005
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). *In vitro* antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 381-389. doi: 10.1007/s11746-010-1686-7
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2013). Reverse-phase HPLC separation of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate produced peptide fractions with enhanced antioxidant capacity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(1), 39-46. doi: 10.1007/s11130-013-0340-6
- Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Li, H., Adebisi, A. P., & Aluko, R. E. (2011). Kinetics of enzyme inhibition and antihypertensive effects of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(11), 1767-1774. doi: 10.1007/s11746-011-1841-9
- González-Pérez, S. (2015). 12—Sunflower proteins. In E. Martínez-Force, N. T. Dunford, & J. J. Salas (Éd.), *Sunflower* (p. 331-393). doi: 10.1016/B978-1-893997-94-3.50018-0
- Graham, D. E., & Phillips, M. C. (1979). Proteins at liquid interfaces : I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 70(3), 403-414. doi: 10.1016/0021-9797(79)90048-1
- Hadnađev, M., Dapčević-Hadnađev, T., Lazaridou, A., Moschakis, T., Michaelidou, A.-M., Popović, S., & Biliaderis, C. G. (2018). Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. Physicochemical properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 526-533. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.12.015
- Hayakawa, S., & Nakai, S. (1985). Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *Journal of Food Science*, 50(2), 486-491. doi: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb13433.x
- He, R., He, H.-Y., Chao, D., Ju, X., & Aluko, R. (2013). Effects of high pressure and heat treatments on physicochemical and gelation properties of rapeseed protein isolate. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1344-1353. doi: 10.1007/s11947-013-1139-z
- Hermansson, A.-M. (1979). Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 272-279. doi: 10.1007/BF02671471
- House, J. D., Neufeld, J., & Leson, G. (2010). Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22), 11801-11807. doi: 10.1021/jf102636b
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269-1273. doi: 10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x

- Ivanova, P., Chalova, V., Koleva, L., & Pishtiyski, I. (2012). Optimization of protein extraction from sunflower meal produced in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18(2), 153-160.
- Jiang, J., Chen, J., & Xiong, Y. L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7576-7583. doi: 10.1021/jf901585n
- Jiang, J., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2010). pH shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8035-8042. doi: 10.1021/jf101045b
- Jimenez-Lopez, J. C., & Hernandez-Soriano, M. C. (2013). Protein bodies in cotyledon cells exhibit differential patterns of legumin-like proteins mobilization during seedling germinating states. *American Journal of Plant Sciences*, 2013. doi: 10.4236/ajps.2013.412304
- Johnson, L. A., Suleiman, T. M., & Lusas, E. W. (1979). Sesame protein : a review and prospectus. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3Part3), 463-468. doi: 10.1007/BF02671542
- Kabirullah, M., & Wills, R. B. H. (1982). Functional properties of acetylated and succinylated sunflower protein isolate. *International Journal of Food Science & Technology*, 17(2), 235-249. doi: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb00179.x
- Karaca, A. C., Low, N., & Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9), 2742-2750. doi: 10.1016/j.foodres.2011.06.012
- Karki, B., Lamsal, B. P., Grewell, D., Pometto, A. L., van Leeuwen, J., Khanal, S. K., & Jung, S. (2009). Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soy flakes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(10), 1021-1028. doi: 10.1007/s11746-009-1433-0
- Khattab, R. Y., Arntfield, S. D., & Nyachoti, C. M. (2009). Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments, Part 1 : protein quality evaluation. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1107-1112. doi: 10.1016/j.lwt.2009.02.008
- Kim, J.-J., & Lee, M.-Y. (2011a). Characterization of hempseed protein in Cheungsam from Korea. *Journal of the Korea Academia-Industrial Cooperation Society*, 12(4), 1763-1769. doi: 10.5762/KAIS.2011.12.4.1763
- Kim, J.-J., & Lee, M.-Y. (2011b). Isolation and characterization of edestin from Cheungsam hempseed. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 54(2), 84-88. doi: 10.3839/jabc.2011.015
- Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 242-258. doi: 10.1007/BF02671468

- Kinsella, J. E., & Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods : a survey. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7(3), 219-280. doi: 10.1080/10408397609527208
- Koolman, J., & Roehm, K. H. (2011). *Color Atlas of Biochemistry*. Thieme.
- Krzyzaniak, A., Burova, T., Haertlé, T., & Barciszewski, J. (1998). The structure and properties of napin-seed storage protein from rape (*Brassica napus* L.). *Food / Nahrung*, 42(03-04), 201-204. doi: 10.1002/(SICI)1521-3803(199808)42:03/04<201::AID-FOOD201>3.0.CO;2-U
- Lam, M., Shen, R., Paulsen, P., & Corredig, M. (2007). Pectin stabilization of soy protein isolates at low pH. *Food Research International*, 40(1), 101-110. doi: 10.1016/j.foodres.2006.08.004
- Liang, H.-N., & Tang, C.-H. (2013). PH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 309-319. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.04.005
- Li-Chan, E. C. Y., & Ma, C.-Y. (2002). Thermal analysis of flaxseed (*Linum usitatissimum*) proteins by differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 77(4), 495-502. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00365-X
- Liu, F., & Tang, C.-H. (2013). Soy protein nanoparticle aggregates as pickering stabilizers for oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), 8888-8898. doi: 10.1021/jf401859y
- Liu, F., & Tang, C.-H. (2015). Soy glycinin as food-grade pickering stabilizers : Part. I. Structural characteristics, emulsifying properties and adsorption/arrangement at interface. *Food Hydrocolloids*, 60, 606-619. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.04.025
- Liu, F., & Tang, C.-H. (2016). Soy glycinin as food-grade pickering stabilizers : Part. III. Fabrication of gel-like emulsions and their potential as sustained-release delivery systems for  $\beta$ -carotene. *Food Hydrocolloids*, 56, 434-444. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.01.002
- López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Bonino, J., Delgado, J. F., Wagner, J., Spelzini, D. (2018). "Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds". *LWT*, 90, 396-402. doi: 10.1016/j.lwt.2017.12.060
- López, D. N., Ingrassia, R., Busti, P., Wagner, J., Boeris, V., & Spelzini, D. (2018). Effects of extraction pH of chia protein isolates on functional properties. *LWT*, 97, 523-529. doi: 10.1016/j.lwt.2018.07.036
- Luo, L.-J., Liu, F., & Tang, C.-H. (2013). The role of glycinin in the formation of gel-like soy protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 97-105. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.031
- Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2015a). A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids*, 43, 743-752. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.08.001

- Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2015b). Conversion of a low protein hemp seed meal into a functional protein concentrate through enzymatic digestion of fibre coupled with membrane ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *31*, 151-159. doi: 10.1016/j.ifset.2015.08.004
- Malomo, S. A., & Aluko, R. E. (2016). *In vitro* acetylcholinesterase - inhibitory properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *93*(3), 411-420. doi: 10.1007/s11746-015-2779-0
- Malomo, S. A., He, R., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of Food Science*, *79*(8), C1512-C1521. doi: 10.1111/1750-3841.12537
- Mamone, G., Picariello, G., Ramondo, A., Nicolai, M. A., & Ferranti, P. (2019). Production, digestibility and allergenicity of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *Food Research International*, *115*, 562-571. doi: 10.1016/j.foodres.2018.09.017
- Marcone, M. F., Kakuda, Y., & Yada, R. Y. (1998). Immunochemical examination of the surface physico-chemical properties of various dicotyledonous and monocotyledonous globulin seed storage proteins. *Food Chemistry*, *63*(1), 85-95. doi: 10.1016/S0308-8146(97)00168-4
- Matheis, G., & Whitaker, J. R. (1984). Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *Journal of Food Biochemistry*, *8*(3), 137-162. doi: 10.1111/j.1745-4514.1984.tb00322.x
- Mattila, P. H., Mäkinen, S., Eurola, M., Jalava, T., Pihlava, J.-M., Hellström, J., & Pihlanto, A. (2018). Nutritional value of commercial protein-rich plant products. *Plant Foods for Human Nutrition*, *73*(2), 108-115. doi: 10.1007/s11130-018-0660-7
- Mattila, P. H., Pihlava, J.-M., Hellström, J., Nurmi, M., Eurola, M., Mäkinen, S., Pihlanto, A. (2018). Contents of phytochemicals and antinutritional factors in commercial protein-rich plant products. *Food Quality and Safety*, *2*(4), 213-219. doi: 10.1093/fqsafe/fyy021
- McClements, D. J. (1998). *Food Emulsions : Principles, Practice, and Techniques*. CRC Press.
- Mikulec, A., Kowalski, S., Sabat, R., Skoczylas, Ł., Tabaszewska, M., & Wywrocka-Gurgul, A. (2019). Hemp flour as a valuable component for enriching physicochemical and antioxidant properties of wheat bread. *LWT*, *102*, 164-172. doi: 10.1016/j.lwt.2018.12.028
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j
- Mohamed, T. K., Zhu, K., Issoufou, A., Fatmata, T., & Zhou, H. (2009). Functionality, *in vitro* digestibility and physicochemical properties of two varieties of defatted foxtail millet protein concentrates. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(12), 5224-5238. doi: 10.3390/ijms10125224

- Molina, E., Papadopoulou, A., & Ledward, D. A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*, *15*(3), 263-269. doi: 10.1016/S0268-005X(01)00023-6
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Research International*, *39*(9), 945-963. doi: 10.1016/j.foodres.2006.07.002
- Multari, S., Neacsu, M., Scobbie, L., Cantlay, L., Duncan, G., Vaughan, N., ... Russell, W. R. (2016). Nutritional and phytochemical content of high-protein crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(41), 7800-7811. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00926
- Namiki, M. (2007). Nutraceutical functions of sesame: a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*(7), 651-673. doi: 10.1080/10408390600919114
- Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011).  $\beta$ -lactoglobulin and WPI aggregates: formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, *25*(8), 1945-1962. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.006
- Nioi, C. (2013). *Extraction et protéolyse de napines de tourteau de colza: Influence de l'état structural de la protéine sur la cinétique de protéolyse, la composition et les fonctionnalités des hydrolysats* (Phdthesis, Université de Lorraine). Consulté à l'adresse [http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC\\_T\\_2013\\_0074\\_NIOI.pdf](http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2013_0074_NIOI.pdf)
- Nioi, C., Kapel, R., Rondags, E., & Marc, I. (2012). Selective extraction, structural characterisation and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal. *Food Chemistry*, *134*(4), 2149-2155. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.017
- Oboroceanu, D., Wang, L., Kroes-Nijboer, A., Brodkorb, A., Venema, P., Magner, E., & Auty, M. A. E. (2011). The effect of high pressure microfluidization on the structure and length distribution of whey protein fibrils. *International Dairy Journal*, *21*(10), 823-830. doi: 10.1016/j.idairyj.2011.03.015
- Odani, S., & Odani, S. (1998). Isolation and primary structure of a methionine- and cysteine-rich seed protein of *Cannabis sativa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *62*(4), 650-654. doi: 10.1271/bbb.62.650
- Oliete, B., Potin, F., Cases, E., & Saurel, R. (2018). Modulation of the emulsifying properties of pea globulin soluble aggregates by dynamic high-pressure fluidization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *47*, 292-300. doi: 10.1016/j.ifset.2018.03.015
- Oliete, B., Yassine, S. A., Cases, E., & Saurel, R. (2019). Drying method determines the structure and the solubility of microfluidized pea globulin aggregates. *Food Research International*, *119*, 444-454. doi: 10.1016/j.foodres.2019.02.015
- Onsaard, E. (2012). Sesame proteins. *International Food Research Journal*, *19*(4), 1287-1295.
- Orio, L. P., Boschini, G., Recca, T., Morelli, C. F., Ragona, L., Francescato, P., Speranza, G. (2017). New ACE-inhibitory peptides from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(48), 10482-10488. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04522

- Osborne, T. B. (1909). *The vegetable proteins*. Consulté à l'adresse <http://archive.org/details/vegetableprotein00osbouoft>
- Osburn, L. (1992). Hemp seed : the most nutritionally complete food source in the world. *Hemp Line Journal*, 1(1), 14-15.
- Ozanne, L. (2014, octobre 8). *Prospective sur la place des protéines végétales à l'horizon 2030*. Présenté à Les légumineuses à graines en alimentation humaine, Paris. Consulté à l'adresse <https://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/263281-db0a5-resource-prospective-sur-la-place-des-proteines-vegetales-a-horizon-2030.html>
- Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954-970. doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.009
- Paquin, P., & Giasson, J. (1989). La microfluidisation comme procédé d'homogénéisation d'une boisson à base de matière grasse laitière. *Le Lait*, 69(6), 491-498. doi: 10.1051/lait:1989633
- Paredes-López, O., Ordorica-Falomir, C., & Olivares-Vázquez, M. R. (1991). Chickpea protein isolates : physicochemical, functional and nutritional characterization. *Journal of Food Science*, 56(3), 726-729. doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb05367.x
- Park, S.-K., Seo, J.-B., & Lee, M.-Y. (2012). Proteomic profiling of hempseed proteins from Cheungsam. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(2), 374-382. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.005
- Patel, S., Cudney, R., & McPherson, A. (1994). Crystallographic characterization and molecular symmetry of edestin, a legumin from hemp. *Journal of Molecular Biology*, 235(1), 361-363. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80040-3
- Paulson, A. T., & Tung, M. A. (1987). Solubility, hydrophobicity and net charge of succinylated canola protein isolate. *Journal of Food Science*, 52(6), 1557-1561. doi: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb05879.x
- Perutz, M. F. (1974). Mechanism of denaturation of haemoglobin by alkali. *Nature*, 247(5440), 341-344. doi: 10.1038/247341a0
- Pickardt, C., Neidhart, S., Griesbach, C., Dube, M., Knauf, U., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1966-1973. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.02.001
- Pihlanto, A., Mattila, P., Mäkinen, S., & Pajari, A.-M. (2017). Bioactivities of alternative protein sources and their potential health benefits. *Food & Function*, 8(10), 3443-3458. doi: 10.1039/C7FO00302A
- Pimentel, D., & Pimentel, M. (2003). Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78(3), 660S-663S. doi: 10.1093/ajcn/78.3.660S

- Pojić, M., Mišan, A., Sakač, M., Dapčević Hadnađev, T., Šarić, B., Milovanović, I., & Hadnađev, M. (2014). Characterization of byproducts originating from hemp oil processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(51), 12436-12442. doi: 10.1021/jf5044426
- Ponzoni, E., Brambilla, I. M., & Galasso, I. (2018). Genome-wide identification and organization of seed storage protein genes of *Cannabis sativa*. *Biologia Plantarum*, 62(4), 693-702. doi: 10.1007/s10535-018-0810-7
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants : from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12(1), 29-36. doi: 10.1016/j.tplants.2006.11.006
- Raab, B., Leman, H., Schwenke, K. D., & Kozłowska, H. (1992). Comparative study of the protein patterns of some rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties by means of polyacrylamide gel electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Food / Nahrung*, 36(3), 239-247. doi: 10.1002/food.19920360304
- Rabetafika, H. N., Remoortel, V. V., Danthine, S., Paquot, M., & Blecker, C. (2011). Flaxseed proteins : food uses and health benefits. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(2), 221-228. doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02477.x
- Raikos, V., Duthie, G., & Ranawana, V. (2015). Denaturation and oxidative stability of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein isolate as affected by heat treatment. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 304-309. doi: 10.1007/s11130-015-0494-5
- Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Oil cakes and their biotechnological applications – a review. *Bioresource Technology*, 98(10), 2000-2009. doi: 10.1016/j.biortech.2006.08.002
- Ramlan, M., Maruyama, N., Adachi, M., Hontani, N., Saka, S., Kato, N., Utsumi, S. (2002). Comparison of protein chemical and physicochemical properties of rapeseed cruciferin with those of soybean glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7380-7385. doi: 10.1021/jf0202537
- Ranalli, P., & Venturi, G. (2004). Hemp as a raw material for industrial applications. *Euphytica*, 140(1), 1-6. doi: 10.1007/s10681-004-4749-8
- Ren, Y., Liang, K., Jin, Y., Zhang, M., Chen, Y., Wu, H., & Lai, F. (2016). Identification and characterization of two novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed protein. *Journal of Functional Foods*, 26, 439-450. doi: 10.1016/j.jff.2016.07.024
- Rivas, N. R., Dench, J. E., & Caygill, J. C. (1981). Nitrogen extractability of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(6), 565-571. doi: 10.1002/jsfa.2740320607
- Rodrigues, I. M., Coelho, J. F. J., & Carvalho, M. G. V. S. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants : methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 337-346. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.10.027

- Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, *19*(6), 402-420. doi: 10.1016/S0141-0229(96)80004-F
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., Niranjana, K., Gilmour, S., & Trinca, L. (2001). Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. *Enzyme and Microbial Technology*, *28*(6), 499-509. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00351-3
- Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2015). Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. *The Journal of Nutrition*, *145*(2), 372-379. doi: 10.3945/jn.114.195438
- Salgado, P. R., Ortiz, S. E. M., Petrucci, S., & Mauri, A. N. (2011). Sunflower protein concentrates and isolates prepared from oil cakes have high water solubility and antioxidant capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *88*(3), 351-360. doi: 10.1007/s11746-010-1673-z
- Sari, Y. W., Mulder, W. J., Sanders, J. P. M., & Bruins, M. E. (2015). Towards plant protein refinery : review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*, *10*(8), 1138-1157. doi: 10.1002/biot.201400569
- Sarv, V. (2017). *A comparative study of camelina, canola and hemp seed processing and products* (Thesis). Consulté à l'adresse <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/77891>
- Sarwar, G. (1997). The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. *The Journal of Nutrition*, *127*(5), 758-764. doi: 10.1093/jn/127.5.758
- Sarwar, G., & Peace, R. W. (1986). Comparisons between true digestibility of total nitrogen and limiting amino acids in vegetable proteins fed to rats. *The Journal of Nutrition*, *116*(7), 1172-1184. doi: 10.1093/jn/116.7.1172
- Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility-corrected amino acid score. *The Journal of Nutrition*, *130*(7), 1865S-1867S. doi: 10.1093/jn/130.7.1865S
- Schwenke, K. D. (1994). Rapeseed proteins. In B. J. F. Hudson (Éd.), *New and Developing Sources of Food Proteins* (p. 281-306). doi: 10.1007/978-1-4615-2652-0\_9
- Shahidi, F., & Naczki, M. (1992). An overview of the phenolics of canola and rapeseed : chemical, sensory and nutritional significance. *Journal of Oil & Fat Industries*, *69*, 917-924. doi: 10.1007/BF02636344
- Shao, Y., & Tang, C.-H. (2014). Characteristics and oxidative stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions : influence of ionic strength and heat pretreatment. *Food Hydrocolloids*, *37*, 149-158. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.030

- Shen, L., & Tang, C.-H. (2012). Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate. *Food Research International*, 48(1), 108-118. doi: 10.1016/j.foodres.2012.03.006
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., & Lampart-Szczapa, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15(2), 137-149. doi: 10.1111/j.1745-4522.2007.00107.x
- Skrabanja, V., Lærke, H. N., & Kreft, I. (2000). Protein-polyphenol interactions and *in vivo* digestibility of buckwheat groat proteins. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 440(1), R129-R131. doi: 10.1007/s004240000033
- Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (1999). Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 23(5), 489-507. doi: 10.1111/j.1745-4514.1999.tb00033.x
- Sosulski, F. W. (1979). Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed protein products : a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(8), 711-715. doi: 10.1007/BF02663047
- Sosulski, F. W., & Holt, N. W. (1980). Amino acid composition and nitrogen-to-protein factors for grain legumes. *Canadian Journal of Plant Science*, 60(4), 1327-1331. doi: 10.4141/cjps80-187
- Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J. N., Xu, Z., & Finley, J. W. (2012). Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(27), 6658-6677. doi: 10.1021/jf300861c
- Sripad, G., & Rao, M. S. N. (1987). Effect of alkaline pH on sunflower 11S protein. *Journal of Biosciences*, 11(1), 351-360. doi: 10.1007/BF02704685
- Swanson, B. G. (1990). Pea and lentil protein extraction and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(5), 276-280. doi: 10.1007/BF02539676
- Tadros, T. F. (2013). Emulsion formation, stability, and rheology. In *Emulsion Formation and Stability* (p. 1-75). doi: 10.1002/9783527647941.ch1
- Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L., & Agboola, S. O. (2011). Canola proteins for human consumption : extraction, profile, and functional properties. *Journal of Food Science*, 76(1), R16-R28. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01930.x
- Tang, C.-H., & Liu, F. (2013). Cold, gel-like soy protein emulsions by microfluidization : emulsion characteristics, rheological and microstructural properties, and gelling mechanism. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 61-72. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.05.008
- Tang, C.-H., Ten, Z., Wang, X.-S., & Yang, X.-Q. (2006). Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8945-8950. doi: 10.1021/jf0619176
- Tang, C.-H., Wang, X.-S., & Yang, X.-Q. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting

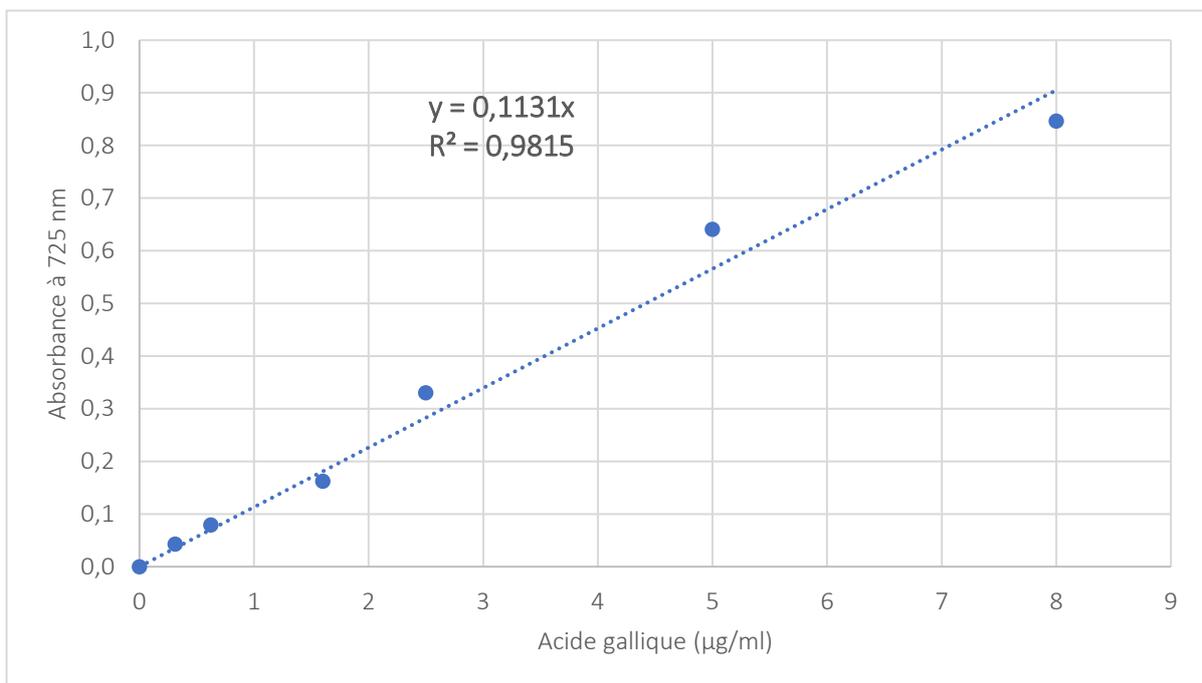
- hydrolysates. *Food Chemistry*, 114(4), 1484-1490. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.049
- Teh, S.-S., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A., & Birch, J. (2016). Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain. *Food Chemistry*, 203, 199-206. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.057
- Teh, S.-S., Bekhit, A. E.-D., Carne, A., & Birch, J. (2013). Effect of the defatting process, acid and alkali extraction on the physicochemical and functional properties of hemp, flax and canola seed cake protein isolates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8(2), 92-104. doi: 10.1007/s11694-013-9168-x
- The Royal Society of Chemistry. (2014). Supplementary material. Protocol for enzyme assays. Consulté 25 septembre 2019, à l'adresse Royal Society of Chemistry website: <http://www.rsc.org/suppdata/fo/c3/c3fo60702j/c3fo60702j1.pdf>
- Thiyam-Holländer, U., Eskin, N. A. M., & Matthäus, B. (2012). *Canola and rapeseed : production, processing, food quality, and nutrition*. CRC Press.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.06.017
- Tran, T., & Rousseau, D. (2013). Stabilization of acidic soy protein-based dispersions and emulsions by soy soluble polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 382-392. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.06.001
- Truksa, M., MacKenzie, S. L., & Qiu, X. (2003). Molecular analysis of flax 2S storage protein conlinin and seed specific activity of its promoter. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(2), 141-147. doi: 10.1016/S0981-9428(02)00022-0
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C., & Gamboa, A. (2013). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(4), 843-849. doi: 10.1111/ijfs.12035
- Valeris, P., Melton, L., & Shahidi, F. (2018). *Encyclopedia of food chemistry*. Elsevier.
- Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., & Millán, F. (1999). Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(12), 1455-1460. doi: 10.1007/s11746-999-0184-2
- Walstra, P. (2002). *Physical chemistry of foods*. CRC Press.
- Wang, Q., Jin, Y., & Xiong, Y. L. (2018). Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(41), 10827-10834. doi: 10.1021/acs.jafc.8b03901

- Wang, Q., & Xiong, Y. L. (2019). Processing, nutrition, and functionality of hempseed protein : a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 936-952. doi: 10.1111/1541-4337.12450
- Wang, X.-S., Tang, C.-H., Chen, L., & Yang, X.-Q. (2009). Characterization and antioxidant properties of hemp protein hydrolysates obtained with Neutrase®. *FTB journal*, 47(4), 428-434.
- Wang, X.-S., Tang, C.-H., Yang, X.-Q., & Gao, W.-R. (2008). Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry*, 107(1), 11-18. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.06.064
- Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786-800. doi: 10.1111/1541-4337.12209
- Yin, S.-W., Tang, C.-H., Cao, J.-S., Hu, E.-K., Wen, Q.-B., & Yang, X.-Q. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food Chemistry*, 106(3), 1004-1013. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.07.030
- Yin, S.-W., Tang, C.-H., Wen, Q.-B., & Yang, X.-Q. (2007). Properties of cast films from hemp (*Cannabis sativa* L.) and soy protein isolates. A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7399-7404. doi: 10.1021/jf071117a
- Yin, S.-W., Tang, C.-H., Wen, Q.-B., & Yang, X.-Q. (2009). Functional and structural properties and *in vitro* digestibility of acylated hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2653-2661. doi: 10.1111/j.1365-2621.2009.02098.x
- Young, C., & Schadel, W. (1990). Microstructure of peanut seed : a review. *Food Structure*, 9(4). Consulté à l'adresse <https://digitalcommons.usu.edu/foodmicrostructure/vol9/iss4/3>
- Yu, J., Ahmedna, M., & Goktepe, I. (2007). Peanut protein concentrate : production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, 103(1), 121-129. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.08.012
- Zayas, J. F. (1997). Solubility of proteins. In *Functionality of Proteins in Food* (p. 6-75). Berlin, Heidelberg: Springer.

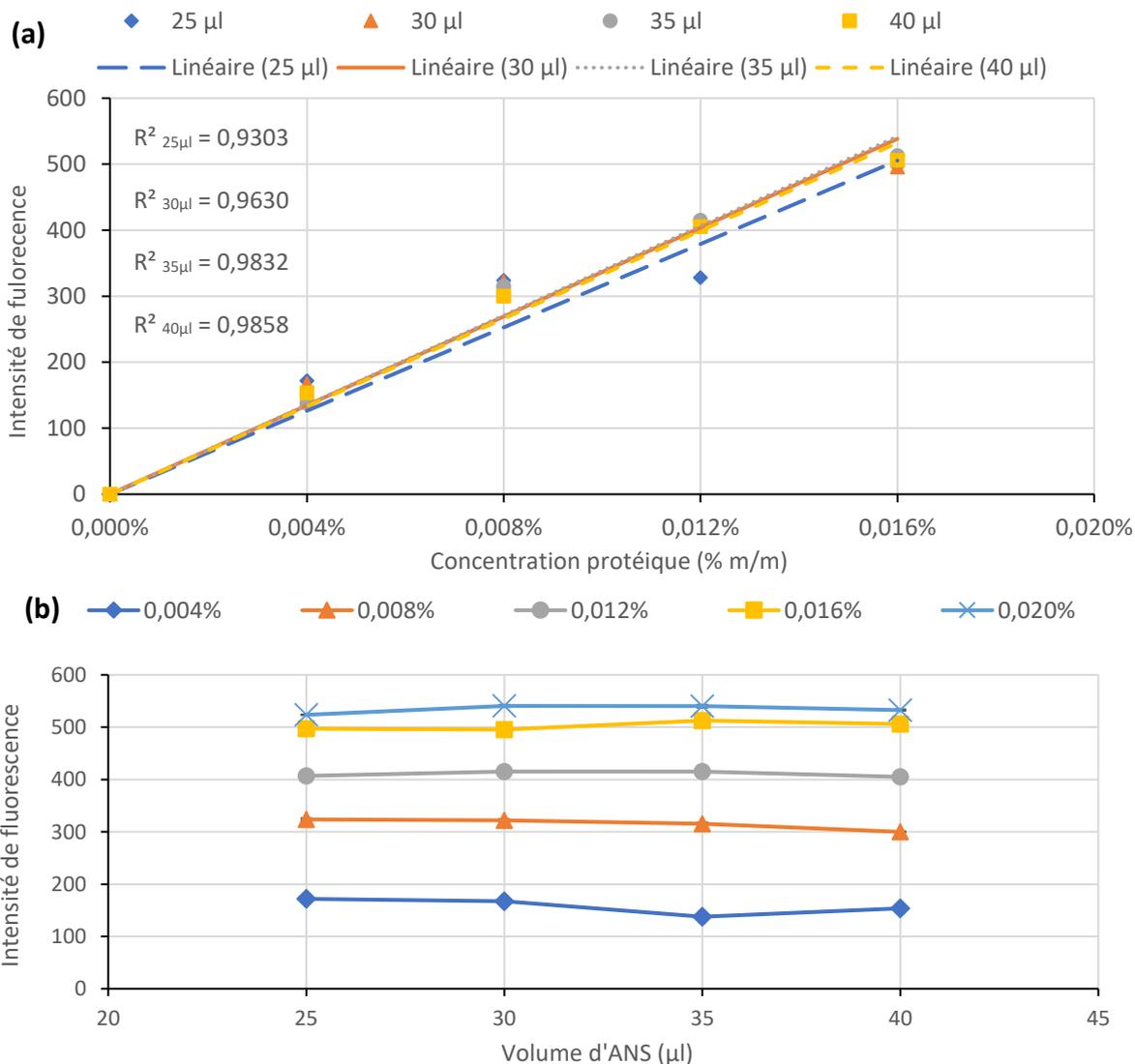


# Annexes

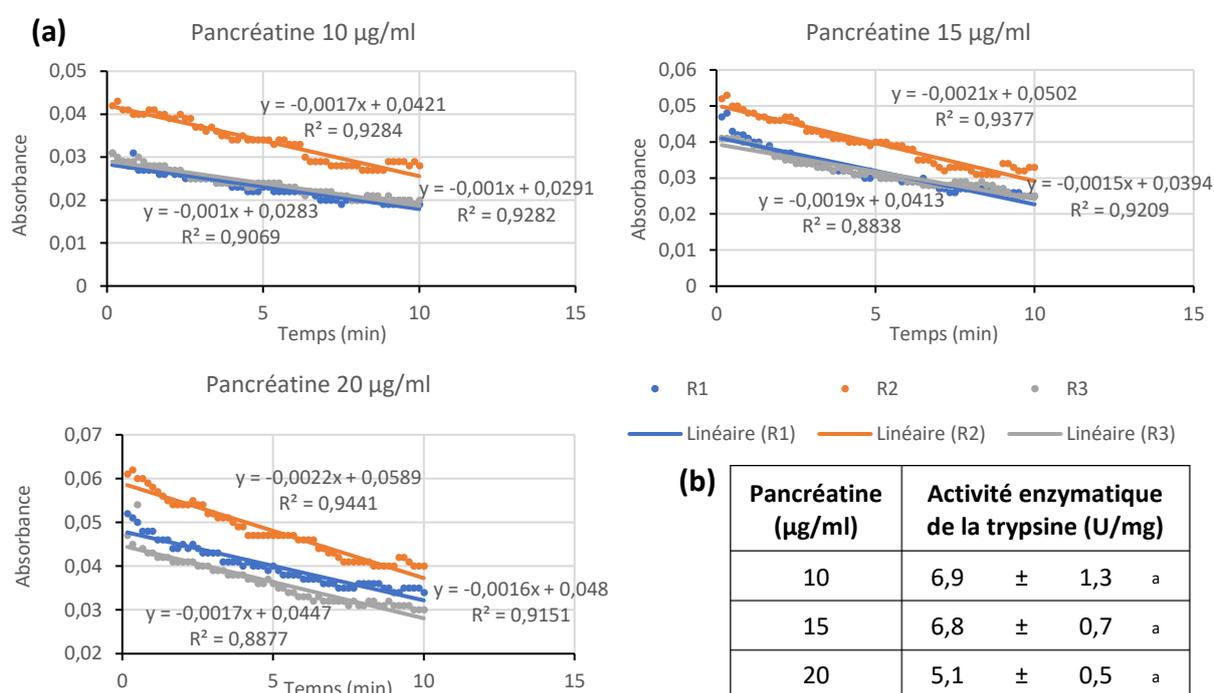




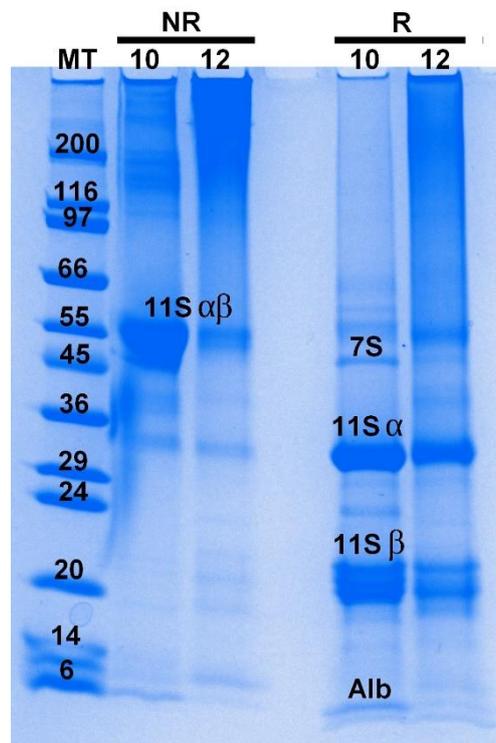
**Annexe 1 : Droite étalon à l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux au Folin Ciocalteu.**



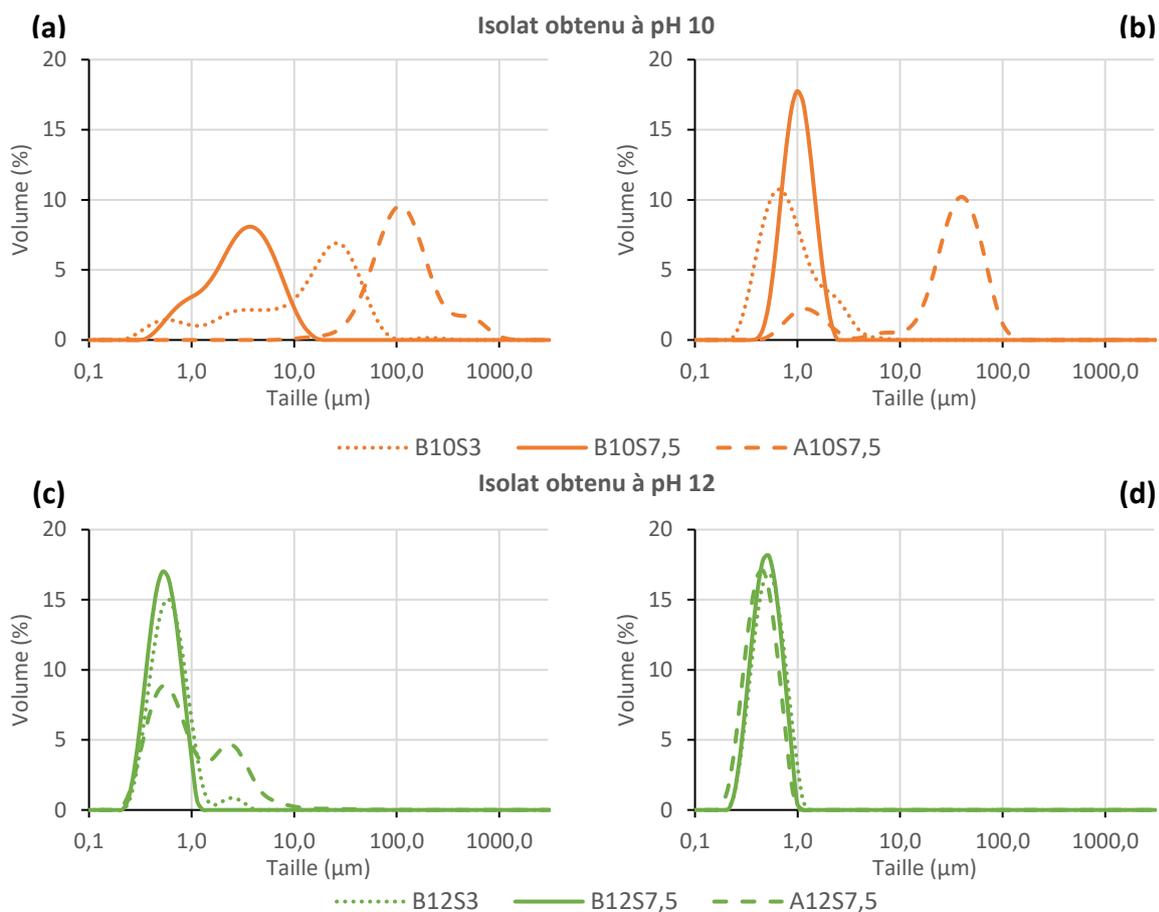
**Annexe 2 : Détermination du volume d'ANS et de la gamme de dilution protéique à utiliser pour mesurer l'hydrophobicité de surface (H0).** (a) droites et coefficients de régression linéaire, de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration protéique (en % (m/m)), pour une quantité donnée d'ANS (en µl). (b) intensité de fluorescence en fonction du volume d'ANS (µl) pour une concentration protéique donnée (% m/m).



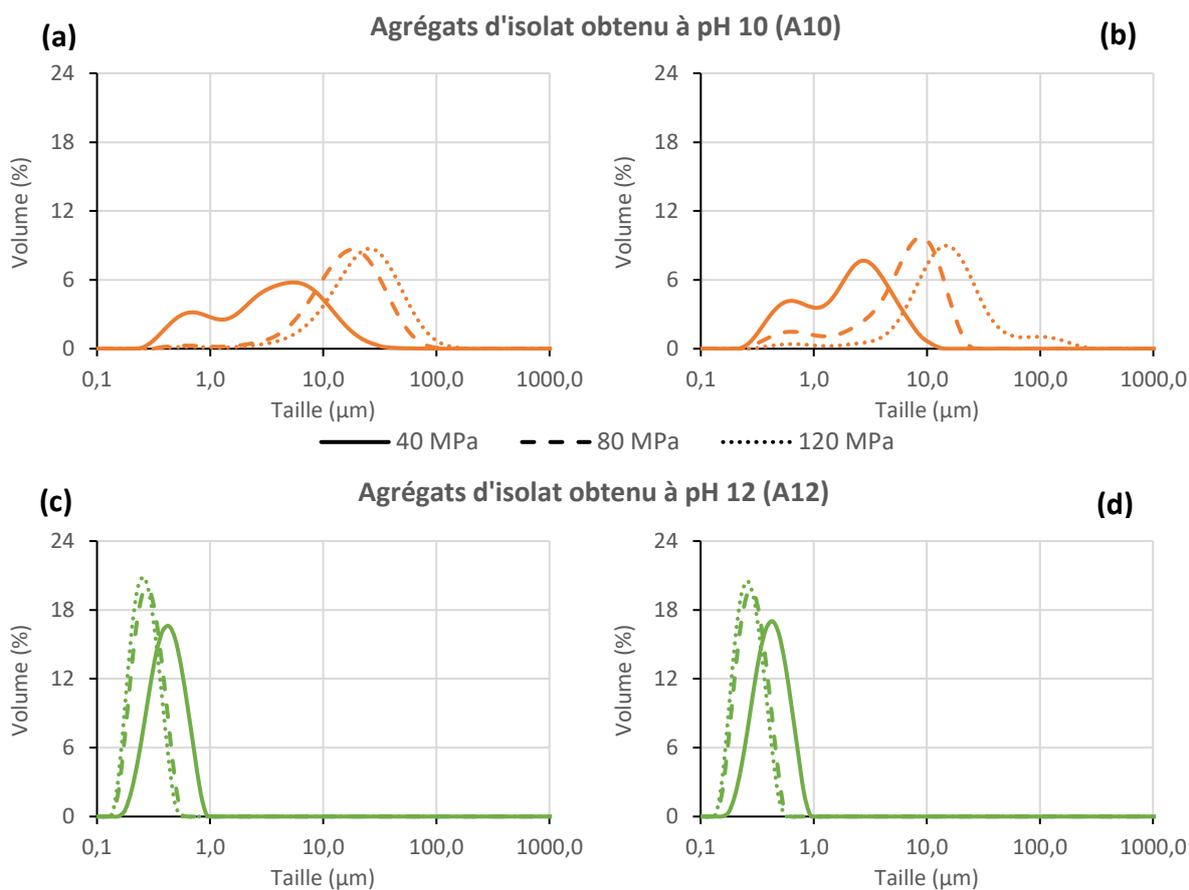
**Annexe 3 : Détermination de l'activité enzymatique de la trypsine contenue dans la pancréatine.** (a) droites de régression linéaire de la diminution d'absorbance due à la digestion de la TAME, en fonction du temps (en min), à différentes concentrations en pancréatine (en µg/ml). (b) résultats d'activité enzymatique de la trypsine (en unité/mg de pancréatine), en fonction de la concentration en pancréatine (en µg/ml). Les lettres représentent les différences significatives à  $p < 0,05$ .



**Annexe 4 : Profil électrophorétique des pools d'isolats protéiques de chanvre.** Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS), réductrices (R) ou non réductrices (NR) (avec ou sans DTT). Dans les puits : MT le marqueur de taille. 10 et 12 les isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 11S  $\alpha$  et 11S  $\beta$  les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'édésine 11S, et 11S  $\alpha\beta$  le monomère résultant de leur liaison. 7S la bande de globuline 7S et Alb les bandes d'albumines. Quantité d'azote total standardisée dans tous les puits.



**Annexe 5 : Distribution des tailles des gouttelettes lipidiques des différentes émulsions « témoins » après 24 h à 4 °C.** (a) et (b), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 10 (10). (c) et (d), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 12 (12). (a) et (c), distribution sans SDS. (b) et (d), distribution avec SDS. B et A, les émulsions formées de protéines brutes ou agrégées thermiquement. S3 et S7,5, les pH 3 et pH 7,5 de formation des émulsions.



**Annexe 6 : Distribution des tailles des gouttelettes lipidiques des différentes émulsions « modèles » après 24 h à 4 °C.** (a) et (b), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 10. (c) et (d), les émulsions formées à partir d'isolat extrait à pH 12. (a) et (c), distribution sans SDS. (b) et (d), distribution avec SDS. A10 et A12 les émulsions formées d'agrégats issus d'isolats obtenus par hydratation du tourteau à pH 10 ou 12. 40, 80 et 120 MPa, les pressions d'homogénéisation des émulsions par microfluidisation.







## Résumé

Les protéines végétales sont une option cohérente pour nourrir la planète tout en limitant le réchauffement climatique. Les protéines courantes (blé, soja et maïs) ne seront bientôt plus suffisantes pour répondre à l'augmentation de la demande en protéines. Cette thèse porte sur la valorisation d'une nouvelle source de protéine végétale pour l'alimentation humaine, à partir d'un coproduit de l'huilerie : les protéines de chanvre issues de tourteau de presse. Pour répondre à cet objectif, les trois axes suivis sont : la définition des conditions d'extraction, l'étude des propriétés physicochimiques des isolats extraits selon les conditions définies et l'étude de leurs propriétés émulsifiantes. Les données de la littérature relatives à l'extraction des protéines de chanvre sont peu nombreuses et peu détaillées. Les protéines y sont généralement extraites à partir de tourteau délipidé au solvant, par solubilisation alcaline (pH 10), précipitation isoélectrique (pH 5), neutralisation (pH 7) et lyophilisation. Ces isolats protéiques semblent posséder de faibles solubilités sur une large gamme de pH, probablement à cause de fortes interactions entre les protéines au point isoélectrique qui en insolubilise une partie. L'extraction souhaitée dans notre étude, est une extraction à partir de tourteau brut (sans solvant), sans précipitation isoélectrique et permettant d'extraire simultanément les globulines et les albumines. L'impact de conditions d'extraction sur la qualité et la quantité de protéines extraites, est déterminé. Les conditions d'hydratation étudiées sont différents pH (2 à 12), forces ioniques (0 à 500 mM de NaCl) et ratios massiques tourteau/eau (2 à 22%). Les impacts d'une étape de purification par ultrafiltration et du mode de séchage (atomisation ou lyophilisation) sont également étudiés. Seuls des pH alcalins  $\geq 10$  permettent l'extraction simultanée des globulines et des albumines avec des rendements  $\geq 40\%$ . En revanche, de tels pH solubilisent également des composés phénoliques qui peuvent se complexer aux protéines. Une étape de diafiltration par ultrafiltration est nécessaire pour augmenter la pureté protéique à plus de 80% et l'atomisation ne semble pas dénaturante. L'extraction à pH 10 permet d'obtenir des protéines natives. A l'état brut, elles montrent de bonnes aptitudes émulsifiantes. Une dénaturation thermique réduit fortement leurs propriétés émulsifiantes. L'extraction à pH 12 dénature les protéines, certainement suite à une charge de surface élevée qui induit leur dépliement. Des agrégats impliquant probablement des phénols via des liaisons covalentes sont formés. Cependant, la solubilité de ces protéines de même que leurs propriétés émulsifiantes, sont meilleures que celles des protéines extraites à pH 10. A travers ce manuscrit, nous discutons et tentons de comprendre les différences observées entre les protéines extraites à pH 10 et à pH 12.

## Abstract

Plant proteins are a coherent option to feed the planet while limiting global warming. Common proteins (wheat, soya and maize) will soon no longer be sufficient to meet the increased demand for proteins. This thesis focuses on the development of a new source of plant protein for human consumption, based on a co-product of the oil mill: hemp proteins from press-cake. To meet this objective, the three main lines of action are: the definition of extraction conditions, the study of the physico-chemical properties of the isolates extracted under the defined conditions and the study of their emulsifying properties. The data in the literature on the extraction of hemp proteins are limited and not very detailed. Proteins are generally extracted from solvent-delipidated press-cake by alkaline solubilization (pH 10), isoelectric precipitation (pH 5), neutralization (pH 7) and freeze-drying. These protein isolates appear to have low solubilities over a wide pH range, probably due to strong interactions between proteins at the isoelectric point that insolubilize some of them. The extraction desired in our study is an extraction from raw press-cake (without solvent), without isoelectric precipitation and allowing globulins and albumins to be extracted simultaneously. The impact of extraction conditions on the quality and quantity of extracted proteins is determined. The hydration conditions studied are different pH (2 to 12), ionic strengths (0 to 500 mM NaCl) and weight ratios of press-cake/water (2 to 22%). The effects of an ultrafiltration purification step and the drying method (spray or freeze-drying) are also studied. Only alkaline pH  $\geq 10$  allows the simultaneous extraction of globulins and albumins with yields  $\geq 40\%$ . On the other hand, such pH values also solubilize phenolic compounds that can form complexes with proteins. A diafiltration step by ultrafiltration is necessary to increase protein purity to more than 80% and spray-drying does not seem to be denaturing. Extraction at pH 10 produces native proteins. In their raw state, they show good emulsifying properties. Thermal denaturation greatly reduces their emulsifying properties. Extraction at pH 12 denatures proteins, certainly due to a high surface charge that induces their unfolding. Aggregates probably involving phenols via covalent bonds are formed. However, the solubility of these proteins as well as their emulsifying properties are better than those of proteins extracted at pH 10. Through this manuscript we discussed and tried to understand the differences observed between the proteins extracted at pH 10 and pH 12.