

LINE GOURLEY

**CONTRIBUTION À LA COMPRÉHENSION DES MÉCANISMES INITIANT
L'ENCRASSEMENT DES MEMBRANES DE POLYSULFONE PAR LES
HYDROLYSATS CASÉIQUES**

Thèse
présentée
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Département des Sciences des aliments et de nutrition
Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'alimentation
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

NOVEMBRE 1997

© Line Gourley, 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-25416-X

Canadä

*À ma mère,
à Clément
et à tous mes proches...*

RÉSUMÉ COURT

L'ultrafiltration permet de séparer les hydrolysats caséiques afin d'obtenir des fractions peptidiques possédant des propriétés intéressantes en termes de fonctionnalité et/ou d'activité biologique. Cependant, cette application est limitée par la baisse des flux de perméation lors du fractionnement de ces hydrolysats sur les membranes de polysulfone. Nos travaux ont donc porté sur l'étude des phénomènes impliqués dans l'encrassement des membranes de polysulfone par les hydrolysats de caséine. Les résultats obtenus ont démontré que (1) les conditions physico-chimiques du milieu modifient la perméabilité des membranes de façon plus importante que les caractéristiques du matériau membranaire, (2) l'adsorption des composantes d'un hydrolysat caséique modifie les paramètres énergétiques des surfaces membranaires et (3) l'encrassement des membranes est initié par l'adsorption de peptides possédant des caractéristiques physico-chimiques (masse, hydrophobicité, charge) favorisant leur affinité avec la membrane qui présente un caractère hydrophobe et électronégatif.

RÉSUMÉ LONG

Les procédés de séparation par membranes peuvent être utilisés pour le fractionnement d'hydrolysats caséiques afin d'obtenir des fractions peptidiques offrant un intérêt pour la fabrication d'ingrédients fonctionnels et/ou nutraceutiques. Cependant, l'enrassement des membranes constitue le facteur limitant de ces procédés et des travaux antérieurs, ayant initié la présente étude, ont démontré une baisse importante des flux de perméation lors de l'ultrafiltration d'un hydrolysat de caséines sur des membranes de polysulfone. Il semble que des interactions soluté-membrane soient à l'origine des phénomènes causant l'enrassement et que le seuil de coupure des membranes ne soit pas le seul facteur régissant la perméabilité des membranes. Dans une première approche, la présente étude a démontré que la modification des conditions physico-chimiques de la solution à fractionner affecte la perméabilité des membranes de façon plus importante que la modification des propriétés du matériau membranaire. Par la suite, la mesure d'angles de contact nous a permis de déterminer les propriétés de surface du polysulfone et du polyéthersulfone. Il a été observé que l'adsorption des composantes du milieu modifie les paramètres énergétiques des surfaces membranaires par des interactions à nature polaire et hydrophobe. Finalement, l'identification des peptides adsorbés sur les membranes a révélé que l'affinité de ces molécules pour le polysulfone est liée à certaines de leurs caractéristiques physico-chimiques, soient la taille, l'hydrophobicité et la charge des molécules.

AVANT-PROPOS

Je veux introduire cette section par ma reconnaissance envers mon Directeur de thèse, Monsieur Yves Pouliot, avec qui il m'a été agréable de travailler et de qui j'ai beaucoup appris à travers nos discussions. Il m'a aussi été possible de parler ouvertement avec mon directeur de mes dépassemens, ce qui apporte un complément considérable dans la réalisation de ce grand travail. Je remercie très sincèrement M. Pouliot pour sa compétence, ses enseignements, son support, ses encouragements, sa confiance, son humour, son amitié, qui ont fait de cette période de travail des moments d'apprentissage privilégiés.

La contribution de Madame Sylvie Gauthier, ma Co-directrice, fut importante aussi dans la progression de cette thèse. À travers diverses discussions nous avons étoffé la démarche de cette entreprise et avons développé un contact bien agréable. Son esprit critique et sa rigueur ont contribué à la qualité de ce travail.

Je tiens à remercier M. Michel Britten pour sa compétence en matière d'angles de contact, ce qui nous a permis de préciser une partie de l'information recherchée par cette étude.

Soulignons maintenant l'apport de l'institut NIZO, aux Pays-Bas, où j'ai effectué un stage de recherche grâce auquel nous avons pu préciser une partie des travaux. Je remercie particulièrement Mme H.C. van der Horst et M. Martin Timmer qui ont contribué de près à ce stage.

Un deuxième stage, à l'INRA de Rennes, a permis d'achever nos expérimentations à l'aide du spectromètre de masse. Je remercie M. Jean-Louis Maubois et son

équipe d'enzymologie avec qui nous avons effectué les analyses. Mme Joëlle Léonil, Mme Gwen Henry et particulièrement M. Daniel Mollé ont précieusement contribué à l'identification des peptides.

Nous avons obtenu le matériau membranaire requis par l'entremise de M. Steven J. Harrold de la compagnie Osmonics, envers qui nous sommes reconnaissants.

Enfin, je veux remercier très sincèrement Madame Sylvie Turgeon qui a accepté d'agir à titre de prélectrice de ma thèse, ainsi que Monsieur Jean-Louis Maubois et Monsieur Michel Britten, évaluateurs externes.

Je ne saurais terminer ces propos sans mettre en évidence l'importance de mon entourage tout au long des études graduées. Je crois que chaque personne se reconnaît dans ce qu'il-elle a pu m'apporter. Toutes ces personnes avec qui j'ai eu des discussions intéressantes, de qui j'ai eu du support, avec qui j'ai travaillé (particulièrement Lise Lemieux) ou pratiqué divers sports, je vous remercie de la qualité des moments passés ensemble. Je veux mentionner ma reconnaissance envers ma mère et les autres membres de ma famille, ainsi que ma belle-famille, qui ont toujours su se faire proches de moi. Je termine sur une note particulière pour Clément, avec qui je partage ma vie, qui sait me supporter par ses encouragements, sa motivation, sa proximité, et qui a en quelque sorte vécu ce doctorat avec moi: Merci pour tout!

Ces travaux de recherche ont été rendus possibles par la participation du FCAR au financement du projet.

TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
RÉSUMÉ COURT	i
RÉSUMÉ LONG	ii
AVANT-PROPOS	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
NOMENCLATURE	x
Chapitre 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Chapitre 2: REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 LES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES DE CASÉINES	5
2.1.1 Intérêt des hydrolysats caséiques	5
2.1.2 Procédés d'hydrolyse enzymatique des protéines	7
2.1.3 Les hydrolysats caséiques et leur fractionnement par membranes	10
2.2 PROCÉDÉS DE SÉPARATION PAR MEMBRANES	14
2.2.1 Matériaux membranaires	16
2.2.2 Composition et propriétés du polysulfone	17
2.2.3 Caractéristiques de performance	18
2.2.4 Encrassement des membranes	21
2.2.5 Méthodes de caractérisation de l'encrassement	25
2.2.6 Travaux antérieurs sur le fractionnement par membranes des hydrolysats caséiques	31
2.3 HYPOTHÈSE, BUT ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	34

Chapitre 3: Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied.	36
Chapitre 4: Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurements.	61
Chapitre 5: Identification of casein peptides interacting with polysulfone ultrafiltration membranes.	83
Chapitre 6: CONCLUSION GÉNÉRALE	112
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
ANNEXE: Spectrométrie de masse: Principes et exemple d'identification d'un peptide.	129

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
Tableau 3.1 Coefficients de rejet (σ) de l'azote après concentration de 4 x de l'hydrolysat total.	55
Tableau 3.2 Profil de distribution de masse moléculaire des perméats obtenus (%) sans l'ajout d'EDTA.	56
Tableau 3.3 Profils d'acides aminés des perméats obtenus aux différents pH, avec et sans EDTA ajouté, pour les membranes de 10 kDa en PS et PES.	57
Tableau 4.1 Composantes de la tension de surface de l'eau, du DMSO et de l' α -bromonaphthalène (mJ m^{-2}).	78
Tableau 4.2 Caractéristiques énergétiques des membranes propres (mJ m^{-2}).	79
Tableau 4.3 Propriétés de surface suite à l'adsorption statique des peptides sous différentes conditions physico-chimiques: contributions polaires et non polaire (mJ m^{-2}) et orientation des molécules d'eau (%).	80
Tableau 4.4 Pression de surface développée suite à l'adsorption des peptides caséiques.	81
Tableau 5.1 Caractéristiques des peptides de l'hydrolysat total de caséine (HT), identifiés par spectrométrie de masse.	107
Tableau 5.2 Séquence en acides aminés et caractéristiques physico-chimiques des peptides présentant des différences majeures (groupes I et III) en terme de coefficient de partage (α) entre l'hydrolysat total de caséines et le matériel adsorbé.	108
Tableau 5.3 Résultats de l'analyse en composant principal caractérisant les peptides selon leur masse moléculaire, hydrophobicité et charge nette pour chaque composant principal, et la proportion des valeurs propres attribuables à chaque composant.	109

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
Figure 2.1 Représentation schématique des procédés de microfiltration (MF), ultrafiltration (UF), nanofiltration (NF) et osmose inverse (OI).	15
Figure 2.2 Comparaison des structures chimiques du polysulfone (PSf) et du polyéthersulfone (PES).	18
Figure 2.3 Schéma représentant le flux de perméabilité à l'eau pure en fonction de la pression appliquée, pour une membrane de structure (a) dense et (b) ouverte.	19
Figure 2.4 Schéma représentant la relation entre le flux et la pression en ultrafiltration.	20
Figure 2.5 Comportement du flux de perméation en fonction du temps.	22
Figure 2.6 Profil de concentration de polarisation en régime constant.	22
Figure 2.7 Mesure d'angles de contact (θ) sur le matériau hydraté.	28
Figure 2.8 Comparaison entre le système de filtration à flux tangentiel et la chromatographie liquide: interface matériau membranaire-solution.	30
Figure 3.1 Comparaison des structures chimiques du polysulfone (PS) et du polyéthersulfone (PES).	58
Figure 3.2 Flux de perméation suivant l'augmentation du facteur de concentration volumique: a. PS 5 kDa. b. PS 10 kDa. c. PES 5 kDa. d. PES 10 kDa.	59
Figure 3.3 Courbes de titration de l'hydrolysat total (HT) et des perméats obtenus à pH 8,0 avec et sans EDTA ajouté, pour les membranes de PS et PES.	60
Figure 4.1 Structures chimiques du polysulfone (PS) et du polyéthersulfone (PES).	82

Figure 5.1 Profil RP-HPLC des peptides caséiques contenus dans l'hydrolysat total de caséines, et identifiés par spectrométrie de masse. 110

Figure 5.2 Coefficient de partage (α) des peptides caséiques entre l'hydrolysat total et le matériel adsorbé.

111

NOMENCLATURE

Symbol	Signification	Unité
<i>Abréviations</i>		
AA	: Fraction des acides aminés et courts peptides (perméat)	
AA	: Acides aminés acides (Acidic amino acids) (profil d'acides aminés)	
AU/FS	: Unités d'absorbance (Absorbance units/Full scale)	
BA	: Acides aminés basiques (Basic amino acids)	
C _b	: Proportion du peptides dans l'hydrolysat total	
C _m	: Concentration du soluté dans la phase mobile	% ou mol l ⁻¹
C _m	: Proportion du peptide dans le matériel adsorbé	
C _p	: Concentration du soluté dans le perméat	% ou mol l ⁻¹
C _r	: Concentration du soluté dans la solution initiale	% ou mol l ⁻¹
C _s	: Concentration du soluté dans la phase stationnaire	% ou mol l ⁻¹
D	: Coefficient de diffusion	
Da (kDa)	: Dalton = C ¹² /12 = 1/12 de la masse de l'isotope 12 du carbone	1,66054×10 ⁻²⁷ kg
dc/dx	: Variation de la concentration avec la distance	
dB/dpH	: Indice du pouvoir tampon (Buffering index)	
DMSO	: Diméthyl sulfoxyde	
EDTA (E)	: Éthylène-diamine-tétraacétate: agent séquestrant	
ESI	: Nébulisation électrostatique (Electrospray ionization)	
FCV (VCF)	: Facteur de concentration volumétrique (Volumic concentration factor)	

HPLC	: Chromatographie liquide haute performance	
HT (TH)	: Hydrolysat total (Total hydrolysate)	
J (J_p)	: Flux de perméation	$l \text{ h}^{-1}\text{m}^{-2}$
J_0	: Flux de perméation initial	$l \text{ h}^{-1}\text{m}^{-2}$
J_f	: Flux de perméation final	$l \text{ h}^{-1}\text{m}^{-2}$
J_c	: Flux convectif	$l \text{ h}^{-1}\text{m}^{-2}$
J_{c_p}	: Flux de perméation des solutés	$l \text{ h}^{-1}\text{m}^{-2}$
J_w	: Flux de perméabilité à l'eau (Water flux)	$l \text{ h}^{-1}\text{m}^{-2}$
K_a	: Coefficient de partage (chromatographie liquide)	
LC	: Chromatographie liquide (Liquid chromatography)	
MF	: Microfiltration	
MMCO	: Seuil de coupure des membranes (Molecular mass cut off) kDa	
MS	: Spectrométrie de masse (Mass spectrometry)	
NE	: Sans ajout de EDTA (No EDTA)	
NF	: Nanofiltration	
NPA	: Acides aminés non polaires (Non-polar amino acids)	
OI	: Osmose inverse	
ΔP	: Pression transmembranaire	kPa
PA	: Acides aminés polaires (Polar amino acids)	
PES	: Polyéthersulfone: matériau membranaire	
PSf (PS)	: Polysulfone: matériau membranaire	
PVDF	: Poly(vinylidene fluoride): matériau membranaire	
Q_1	: Quadripôle de focalisation	
Q_2	: Quadripôle de collision	
Q_3	: Quadripôle de focalisation	
R_a	: Résistance due à l'adsorption	
R_{cp}	: Résistance due à la concentration de polarisation	
R_g	: Résistance due à la formation d'une couche de gel	
R_m	: Résistance due à la membrane	
R_p	: Résistance due à l'obstruction des pores	

RP	: Chromatographie en phase inversée (Reversed Phase)
R _{tot}	: Résistance totale
TFD	: Chute totale du flux de perméation (Total flux decline)
UF	: Ultrafiltration

Symboles

α	: Coefficient de partage (Partition coefficient)	[0,1]
δ	: Épaisseur de la couche limite	
γ	: Tension (énergie) de surface	mJ m^{-2}
γ^+	: Composante polaire positive	mJ m^{-2}
γ^-	: Composante polaire négative	mJ m^{-2}
γ^{AB}	: Composante polaire (short-range) {Acide-Base}	mJ m^{-2}
γ^{LW}	: Composante non-polaire (long-range) {Lifshitz-van der Waals}	mJ m^{-2}
γ^{TOT}	: Énergie de surface totale	mJ m^{-2}
γ_s	: Tension superficielle de la surface (membrane)	mJ m^{-2}
γ_L	: Tension superficielle du liquide (solvant)	mJ m^{-2}
η	: Viscosité	cP
θ	: Angle de contact	degrés
π	: Pression de surface	mJ m^{-2}
σ	: Coefficient de rejet	[0,1]
σ_N	: Coefficient de rejet de l'azote (Nitrogen rejection)	[0,1]

Acides aminés

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

AUTORISATION DE MICROFILMAGE

Faculté des Études Supérieures
Université Laval
Ste-Foy, QC
G1K 7P4

Madame, Monsieur,

Par la présente, j'autorise la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval à microfilmer la thèse de Madame Line Gourley.



Co-Auteur

L Gourley, SF Gauthier, Y Pouliot (1995) Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied. *Lait* 75, 259-269.

AUTORISATION DE MICROFILMAGE

Faculté des Études Supérieures
Université Laval
Ste-Foy, Qc
G1K 7P4

Madame, Monsieur,

Par la présente, j'autorise la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval à microfilmer la thèse de Madame Line Gourley.

Sylvie F. Gauthier

Co-Auteur

L Gourley, SF Gauthier, Y Pouliot (1995) Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied. *Lait* 75, 259-269.

AUTORISATION DE MICROFILMAGE

Faculté des Études Supérieures
Université Laval
Ste-Foy, QC
G1K 7P4

Madame, Monsieur,

Par la présente, j'autorise la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval à microfilmer la thèse de Madame Line Gourley.



Co-Auteur

L. Gourley, M. Britten, S.F. Gauthier, Y. Pouliot (1995) Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurements. *J Membrane Sci* 97, 283-289.

AUTORISATION DE MICROFILMAGE

Faculté des Études Supérieures
Université Laval
Ste-Foy, Qc
G1K 7P4

Madame, Monsieur,

Par la présente, j'autorise la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval à microfilmer la thèse de Madame Line Gourley.

Sophie F Gauthier

Co-Auteur

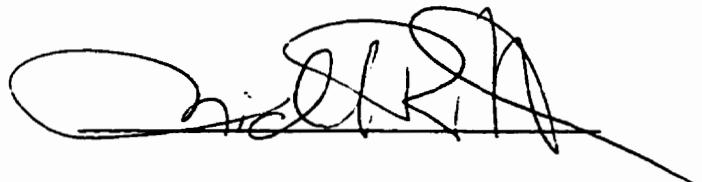
L. Gourley, M. Britten, S.F. Gauthier, Y. Pouliot (1995) Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurements. *J Membrane Sci* 97, 283-289.

AUTORISATION DE MICROFILMAGE

Faculté des Études Supérieures
Université Laval
Ste-Foy, Qc
G1K 7P4

Madame, Monsieur,

Par la présente, j'autorise la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval à microfilmer la thèse de Madame Line Gourley.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Line Gourley".

Co-Auteur

L. Gourley, M. Britten, S.F. Gauthier, Y. Pouliot (1995) Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurements. *J Membrane Sci* 97, 283-289.

Chapitre 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les procédés de séparation par membranes sont aujourd’hui utilisés dans plusieurs secteurs industriels. Le fort potentiel qu’offre ce mode de fractionnement en fait un domaine d’étude très actif dans le but d’optimiser les paramètres d’opération des systèmes à membranes et de diversifier les applications de ces procédés.

Dans le secteur de l’industrie laitière, la valorisation du sous-produit de la fabrication fromagère, le lactosérum, a considérablement contribué au développement des procédés de séparation par membranes pour la fabrication d’ingrédients protéiques laitiers. En effet, ce mode de séparation permet de concentrer les protéines du lactosérum, principe mis à profit dans la production d’ingrédients variés dont les teneurs en protéines, lactose et minéraux peuvent être ajustées selon les caractéristiques des membranes utilisées. D’autre part, l’hydrolyse enzymatique permettant d’améliorer les propriétés fonctionnelles, nutritionnelles et pharmacologiques des protéines laitières, les procédés de séparation par membranes ont ensuite été utilisés pour la fabrication d’hydrolysats protéiques (bioréacteur à membranes) et plus récemment, pour la séparation sélective de ces hydrolysats en vue d’obtenir des fractions peptidiques montrant certaines activités biologiques. À titre d’exemple, Brûlé *et al* (1980) ont démontré l’utilité des membranes d’ultrafiltration de polysulfone pour la concentration de phosphopeptides issus de l’hydrolyse pancréatique du caséinate. Aussi, Bouhallab *et al* (1992) ont utilisé un bioréacteur à membrane pour la préparation de peptides bioactifs issus de l’hydrolyse trypsique du caséinomaclopeptide.

Cependant, l’encrassement des membranes lors du fractionnement des hydrolysats de protéines laitières constitue le principal facteur limitant l’utilisation des procédés à membranes pour ce type d’application. En effet, de nombreuses études ont démontré une baisse importante des flux de perméation lors de la filtration de ces produits, en particulier dans le cas des hydrolysats de caséines. Encore aujourd’hui, les phénomènes responsables de l’encrassement ne

sont toujours pas élucidés, bien qu'il semble que des interactions soluté-membrane soient à l'origine des phénomènes causant le colmatage des membranes et que le seuil de coupure ne soit pas le seul facteur régissant la perméabilité des membranes. En outre, Touraine *et al* (1987) ont mis en évidence l'influence d'interactions spécifiques entre les peptides et la membrane de polysulfone lors du fractionnement d'hydrolysats caséiques.

Le projet de recherche présenté dans cette thèse a été élaboré à la suite de travaux antérieurs qui ont démontré que les flux de perméation, lors du fractionnement d'un hydrolysat de caséines, étaient jusqu'à cinq fois plus faible que lors de l'ultrafiltration d'un hydrolysat de protéines de lactosérum sous des conditions similaires. Dans le cadre du présent projet, nous avons choisi d'aborder cette problématique par une étude des phénomènes impliqués dans l'encrassement des membranes d'ultrafiltration par un hydrolysat trypsique de caséinate de sodium. Nous nous sommes donc attardés à l'étude des phénomènes reliés à l'adsorption des peptides sur les membranes de polysulfone, matériau membranaire largement utilisé en industrie pour sa versatilité et pour sa résistance face aux conditions d'opération et de lavage du système. Le choix d'étudier ces interactions à partir d'un hydrolysat complexe visait à reproduire les conditions de fractionnement rencontrées en industrie.

La prochaine section de la thèse (Chapitre 2) est une revue de littérature qui présente l'intérêt des hydrolysats caséiques, les procédés d'hydrolyse enzymatique des protéines et résume les derniers développements dans le domaine de l'hydrolyse enzymatique des caséines et du fractionnement de ce type d'hydrolysats; par la suite, quelques notions fondamentales sur les principes de séparation par membranes sont présentés, de même que les phénomènes causant l'encrassement des membranes et les méthodes de caractérisation de l'encrassement des membranes. Cette section se termine par la présentation de l'hypothèse, du but et des objectifs à la base de ce travail de recherche. Les références citées dans ce chapitre sont présentées à la fin du document.

Chapitre 2

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 LES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES DE CASÉINES

2.1.1 Intérêt des hydrolysats caséiques

Les protéines sont nécessaires à l'alimentation humaine afin d'assurer un apport en acides aminés essentiels pour la croissance et le maintien des tissus corporels (Marshall, 1994). La digestion des protéines permet leur assimilation sous forme de peptides et selon Schmidl *et al* (1994), une proportion de 30 à 70% de l'azote absorbé et circulant dans la veine porte serait sous forme de peptides. La dégradation ultérieure des peptides assure le transport des acides aminés dans le sang vers les cellules où ils sont alors utilisés pour la synthèse protéique; ainsi, l'ingestion des acides aminés sous forme peptidique est-elle préférable car elle facilite leur assimilation et permet de réduire la pression osmotique (Adachi *et al*, 1991). Le processus d'hydrolyse et de synthèse des protéines est donc au cœur de leur utilisation et *in vitro*, l'hydrolyse enzymatique des protéines permet alors de préparer des produits pré-digérés, se rapprochant des conditions trouvées dans l'organisme.

La caséine est un substrat fréquemment utilisé dans les formulations alimentaires en raison de sa qualité nutritionnelle élevée. Suivant son hydrolyse enzymatique, la caséine est utilisée comme suppléments alimentaires de façon à favoriser l'assimilation de la protéine, ainsi que dans des diètes spécialisées pour les adultes présentant un désordre au niveau du tractus digestif (Manson, 1980). De plus, l'hydrolyse permet de diminuer l'allergénicité de la protéine intacte; à cet effet, les hydrolysats caséiques sont utilisés depuis 1942 dans les formules lactées destinées aux enfants présentant une allergie au lait bovin (Cordano et Cook, 1995).

En plus d'assurer des fonctions métaboliques, certaines protéines et leurs produits d'hydrolyse comportent des propriétés thérapeutiques. En effet, des recherches biomédicales ont démontré l'utilité des protéines, peptides et acides aminés dans la prévention et le traitement de diverses maladies, et ces composantes sont maintenant utilisées pour la fabrication d'une toute nouvelle gamme de produits, appelés aliments fonctionnels ou nutraceutiques (Marshall, 1994). Dans ce domaine, les protéines laitières sont largement étudiées car elles comportent des séquences peptidiques dotées d'activité biologiques et qui sont similaires à celles de certains peptides assurant des fonctions physiologiques, telles les hormones. On compte parmi ces molécules des peptides caséiques pouvant agir comme antagonistes de l'activité opiacée (Yoshikawa *et al.*, 1988; Chiba *et al.*, 1989), antihypertenseurs (Maruyama *et al.*, 1985; Kohmura *et al.*, 1990; Léonil *et al.*, 1991; Maeno *et al.*, 1996), antithrombotiques (Jolles *et al.*, 1986; Fiat *et al.*, 1993; Léonil et Mollé, 1990), opioïdes (Brantl *et al.*, 1979; Zioudrou *et al.*, 1979; Chiba et Yoshikawa, 1986; Meisel et Frister, 1989; Léonil *et al.*, 1991; Kampa *et al.*, 1996), immunomodulateurs (Parker *et al.*, 1984; Berthou *et al.*, 1987; Migliore-Samour et Jolles, 1988; Léonil *et al.*, 1991; Laffineur *et al.*, 1996), ainsi que pour le biotransfert d'oligo-éléments (Gerber et Jost, 1986; Meisel et Frister, 1989; Kitts *et al.*, 1991; Léonil *et al.*, 1991; Hansen *et al.*, 1997).

Dans le domaine alimentaire, l'hydrolyse enzymatique est plutôt mise à profit pour modifier les propriétés fonctionnelles de la protéine initiale: solubilité, viscosité, propriétés émulsifiantes, moussantes, gélifiantes, ainsi que gustatives (Adler-Nissen, 1986; Mahmoud, 1994). Ces attributs dépendent alors de la taille des molécules composant les hydrolysats protéiques, ou du degré d'hydrolyse, lequel est ajusté par un choix judicieux de la spécificité de l'enzyme et des conditions d'hydrolyse utilisées.

L'orientation d'un hydrolysat enzymatique de protéines vers des applications alimentaires ou nutritionnelles spécifiques repose donc sur certaines

caractéristiques de l'hydrolysat et sur son procédé de fabrication (Mahmoud, 1994). Par exemple, un hydrolysat préparé à un degré d'hydrolyse élevé est recherché pour l'alimentation parentérale ou pour l'incorporation dans les formules hypoallergènes. Ceux dont le degré d'hydrolyse est faible ou de valeur intermédiaire seront plutôt utilisés dans la préparation de suppléments alimentaires et de diètes ou encore, dans des produits requérant une faible viscosité ou peu d'amertume.

2.1.2 Procédés d'hydrolyse enzymatique des protéines

L'utilisation d'enzymes pour effectuer la réaction d'hydrolyse présente des avantages sur la méthode classique d'hydrolyse chimique (Gill *et al*, 1996): 1) la réaction se produit dans des conditions plus douces et sans risque de contamination chimique; 2) les protéases étant très spécifiques, il est possible de mieux contrôler les produits d'hydrolyse; 3) les réactions étant stéréospécifiques, les risques de racémisation des acides aminés sont éliminés. En milieu aqueux, la protéase hydrolyse les liens peptidiques de la protéine selon des sites spécifiques à son activité (Adler-Nissen, 1986). Par exemple, la trypsine coupe la liaison du côté carboxyle de la lysine et de l'arginine, alors que la chymotrypsine est spécifique aux acides aminés non polaires: phénylalanine, tyrosine, tryptophane et leucine. Le bris des liens peptidiques implique l'ajout d'une molécule d'eau et la formation de groupements ionisables (NH_3^+ et COO^-) qui augmentent l'hydrophilicité des molécules. D'autre part, les régions hydrophobes initialement cachées à l'intérieur de la protéine sont exposées suivant l'hydrolyse des liens peptidiques et la structure tertiaire et secondaire de la molécule sont modifiées.

De façon générale, l'hydrolyse enzymatique des protéines est effectué en *batch* (Lahl et Braun, 1994; Turgeon et Gauthier, 1990), mais des procédés en continu utilisant des bioréacteurs à membranes ont également été mis au point (Maubois *et al*, 1979; Visser *et al*, 1989; Bouhallab *et al*, 1993; Bouhallab et Touzé, 1995). L'hydrolyse enzymatique consiste à ajouter la protéase à la solution protéique une fois les conditions d'opération ajustées en vue d'optimiser l'activité de l'enzyme. Lorsque le degré d'hydrolyse désiré est atteint, la réaction est stoppée par un traitement thermique de désactivation de l'enzyme dans le procédé en *batch*, ou par une étape d'ultrafiltration lorsque l'hydrolyse est réalisée à l'aide d'un bioréacteur à membranes. Ce type de procédé permet de retenir l'enzyme et les molécules non hydrolysées, alors que les peptides libérés traversent la membrane du côté perméat. Les bioréacteurs à membranes présentent donc l'avantage d'effectuer simultanément l'hydrolyse du substrat et la séparation des produits; ce type de procédé est généralement préféré pour la préparation de peptides à activité biologique, la productivité étant supérieure à celle du procédé en *batch*.

Bien qu'il existe des bioréacteurs à protéases immobilisées (Swaisgood et Horton, 1989), ce type de procédé n'est toujours pas utilisé à l'échelle industrielle probablement à cause de la diversité des protéases commerciales et de leur faible coût. Jusqu'à présent, l'hydrolyse des protéines à l'aide d'enzymes immobilisées a été réservée à des études fondamentales en vue de mettre au point des méthodes visant une activité spécifique, telle la désamérisation de peptides de caséines par des exopeptidases (Ge et Zhang, 1996) ou encore, pour la production d'oligopeptides spécifiques issus de l'hydrolyse trypsique limitée de la β -lactoglobuline (Huang *et al*, 1996) et ce, afin d'étudier leurs propriétés émulsifiantes comparativement à la protéine initiale. Aussi, l'étude de Leaver et Horne (1996) visait à modéliser le processus d'agrégation des micelles de caséines lors de la fabrication fromagère suivant l'hydrolyse enzymatique de la κ -caséine immobilisée sur des billes de latex.

Lors de l'hydrolyse enzymatique des protéines, le contrôle des paramètres d'opération est important pour l'optimisation de la réaction et l'obtention de produits possédant les caractéristiques désirées (Adler-Nissen, 1986; Mahmoud, 1994). D'abord, le choix de l'enzyme est fonction de sa spécificité et du substrat utilisé, de même que de ses conditions optimales d'activité (pH, température); le ratio enzyme:substrat est déterminé à la fois par l'activité de la protéase et par des considérations économiques. Aussi, certaines enzymes nécessitent des co-facteurs ou des conditions particulières assurant leur stabilité ou leur efficacité; par exemple la trypsine est stabilisée en présence de calcium. Enfin, la durée d'hydrolyse est déterminée par le degré d'hydrolyse désiré. À l'échelle industrielle, la cinétique de réaction d'une protéase alcaline peut être suivie par la méthode pH-stat, qui consiste à mesurer la quantité de base requise pour maintenir le pH de la solution à une valeur donnée tout au long de l'hydrolyse. Le degré d'hydrolyse (DH), représentant le pourcentage de liens peptidiques coupés lors de la réaction, peut alors être calculé selon les équations suivantes (Adler-Nissen, 1986; Panyam et Kilara, 1996):

$$DH(\%) = \frac{B \times N_b \times \frac{1}{\alpha}}{MP \times h_{tot}} \times 100 \quad (2.1)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH - pK}}{1 + 10^{pH - pK}} \quad (2.2)$$

où B: consommation de base (ml); N_b: normalité de la base utilisée; α: degré de dissociation des groupements aminés (1/α=1,2 pour les protéines laitières); MP: masse de protéines (g); h_{tot}: nombre total de liens peptidiques par kg de substrat.

Une autre méthode couramment utilisée en industrie pour le suivi du degré d'hydrolyse (DH) est l'osmométrie, basée sur la mesure de la diminution du point de congélation de la solution:

$$DH(\%) = \frac{\Delta C}{P} \times \frac{1}{w} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \quad (2.3)$$

où ΔC : diminution du point de congélation (mosmol); P: concentration protéique (g/1000 ml H₂O); 1/ω: facteur d'étalonnage de l'osmomètre (=1,4); h_{tot}: nombre total de liens peptidiques dans le substrat.

2.1.3 Les hydrolysats caséiques et leur fractionnement par membranes

L'hydrolyse enzymatique des caséines peut être effectuée à partir des micelles de caséine, d'un caséinate ou encore, d'une fraction purifiée des caséines. Le choix du substrat dépend de l'étude ou du produit recherché. Par exemple, Gagnaire *et al* (1996) ont étudié les interactions stabilisant les micelles de caséines suivant leur hydrolyse trypsique. Cette étude a permis d'identifier et quantifier, dans les fractions riches en phosphate, les peptides liés au phosphate de calcium colloïdal et ce, en suivant la destruction progressive de la structure micellaire durant l'hydrolyse et ainsi, déterminer l'importance de chacune des protéines dans la stabilité des micelles. Diaz *et al* (1996) ont également étudié la trypsinolyse limitée des micelles de caséine, mais en vue de mesurer l'accessibilité et la topographie des protéines dans les micelles de caséines par la détermination de la cinétique de libération des peptides.

D'autres études portant sur l'hydrolyse enzymatique des caséines visaient à déterminer la cinétique d'hydrolyse ou à caractériser les produits obtenus de la réaction. Par exemple, Pouliot *et al* (1995) ont mis en évidence la possibilité d'utiliser des solides de lait écrémé comme substrats pour l'hydrolyse enzymatique de caséines. Bien que la cinétique d'hydrolyse du caséinate de sodium ait été plus rapide que celles des poudres de lait écrémé, la distribution de masses moléculaires des peptides et la composition en acides aminés de l'hydrolysat trypsique de poudre de lait écrémé 'low-heat' présentait une proportion plus grande de courts peptides (<2000 Da) et une teneur plus faible en Glu, Pro, Val, Tyr comparativement à l'hydrolysat de caséinate de sodium. Les travaux de Mahmoud *et al* (1992) ont mis en évidence l'hypoallergénicité d'un

hydrolysat produit par l'hydrolyse poussée de la caséine à l'aide de la pancréatine et la faible capacité émulsifiante d'un tel hydrolysat. D'autre part, Agboola et Dalgleish (1996) ont étudié la cinétique d'hydrolyse trypsique des caséines et de la β -lactoglobuline adsorbées à l'interface d'une émulsion comparativement à l'hydrolyse en solution aqueuse afin de déterminer la stabilité des émulsions formées par ces produits. Bien que la séquence d'hydrolyse des caséines individuelles différât selon que la protéine était adsorbée ou en solution, la cinétique d'hydrolyse du caséinate de sodium était la même avec les deux méthodes, alors que la vitesse de réaction pour la β -lactoglobuline était plus élevée lorsque la protéine était à l'interface de l'émulsion; de plus, la stabilité des émulsions à l'entreposage variait entre les divers hydrolysats et la protéine.

En outre, il est généralement reconnu que les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles d'un hydrolysat protéique dépendent de la taille des molécules le composant. En effet, des corrélations ont été établies entre la distribution de masses moléculaires et l'allergénicité des hydrolysats (Lahl et Braun, 1994). Aussi, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats varient selon le profil de masses moléculaires de ses composantes (Turgeon *et al*, 1991; Turgeon *et al*, 1992; Gauthier *et al*, 1993). La séparation du mélange réactionnel permet alors de produire des fractions peptidiques dans un intervalle de masses moléculaires ajusté à une application spécifique. L'utilisation de l'ultrafiltration pour la séparation des hydrolysats protéiques permet de recueillir la fraction peptidique et de stopper la réaction enzymatique sans recourir au traitement thermique de désactivation de l'enzyme qui pourrait modifier les propriétés de l'hydrolysat. L'ajout d'une seconde étape d'ultrafiltration (Turgeon et Gauthier, 1990; Lahl et Braun, 1994) ou d'une séparation par nanofiltration (Garem, 1995) peut également permettre d'accroître la sélectivité et de produire des fractions peptidiques dont l'intervalle de masses moléculaires est encore plus restreint. En effet, il a été démontré que la concentration par ultrafiltration d'un hydrolysat de protéines de

lactosérum (Turgeon *et al*, 1991) permet d'obtenir une fraction enrichie en peptides de masse moléculaire plus élevée (>2000 Da) possédant des propriétés interfaciales supérieures, comparativement à la fraction de courts peptides et acides aminés. Lin *et al* (1997) ont aussi utilisé un procédé à double ultrafiltration pour la préparation d'un hydrolysat caséique à faible teneur en acides aminés libres, pouvant être ajouté aux boissons ou utilisé pour l'amélioration de la texture de certains aliments grâce à la capacité élevée de ces peptides à lier l'eau. De plus, les membranes de nanofiltration permettent de déminéraliser sélectivement les hydrolysats protéiques et de séparer par la taille et la charge les peptides et acides aminés chargés composant la solution peptidique (Garem, 1995).

Par ailleurs, les procédés à membranes permettent d'obtenir des fractions enrichies en peptides possédant des propriétés physiologiques spécifiques. Brûlé *et al* (1985) ont utilisé l'hydrolyse enzymatique couplée à l'ultrafiltration afin de préparer une fraction composée de phosphopeptides pouvant être utilisée dans les formulations alimentaires pour faciliter l'absorption de minéraux ou pour l'incorporation à des médicaments. Léonil *et al* (1991) ont mis au point un procédé d'obtention de fractions enrichies en peptides à activité biologique suivant l'hydrolyse trypsique de la caséine bêta. Ce procédé permet de préparer par ultrafiltration un hydrolysat partiel enrichi en phosphopeptide (résidu 1-25), en précurseur de la β -casomorphine et en peptide doté d'activité antihypertensive (β 177-183); ce dernier, séparé de l'hydrolysat partiel par précipitation, peut être obtenu suite à une deuxième hydrolyse suivie d'une étape d'ultrafiltration. Les travaux de Jolles *et al* (1986) ont permis d'isoler le résidu 106-116 de la κ -caséine, un undecapeptide anti-agrégant des plaquettes humaines plus puissant que ne l'est le dodécapeptide antithrombotique du fibrinogène. Aussi, Miclo *et al* (1994) ont isolé un décapeptide possédant une activité de type benzodiazépine pour la préparation de médicaments et de compléments alimentaires; ce peptide, constitué des résidus 91-100 de la caséine α_{s1} , est obtenu par hydrolyse trypsique.

et peut par la suite être purifié par centrifugation sur membrane suivie d'un fractionnement par chromatographie. À l'aide d'un bioréacteur à membranes, l'hydrolyse trypsique du caséinomacropeptide (Bouhallab *et al*, 1992; Bouhallab et Touzé, 1995), la partie C-terminale de la κ -caséine, a également permis de produire une famille de peptides dotés d'activité antithrombotique. En effet, la sélectivité des membranes a permis d'enrichir le perméat en peptides bioactifs; de plus, le procédé en continu présentait une meilleure efficacité que l'hydrolyse en *batch*. Les procédés à membranes sont donc largement utilisés pour l'obtention de fractions peptidiques et/ou molécules dotées de propriétés physico-chimiques et nutritionnelles particulières.

D'autre part, certaines études visent plutôt à déterminer les paramètres influençant le fractionnement d'hydrolysats à l'aide de membranes de filtration. En outre, Pouliot *et al* (1993) ont étudié l'effet de la spécificité de l'enzyme sur le fractionnement d'hydrolysats caséiques à l'aide de membranes de polysulfone. Les résultats ont démontré que les fractions obtenues des hydrolysats trypsique et chymotrypsique présentaient des caractéristiques distinctes quant au profil de masses moléculaires et à la composition en acides aminés; aussi, la balance charge/hydrophobicité des peptides serait un facteur déterminant du fractionnement d'hydrolysats caséiques. Les travaux de Nau *et al* (1995) ont mis en évidence l'influence des interactions ioniques sur la séparation sélective de peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la β -caséine sur des membranes d'ultrafiltration; le but de cette étude était de déterminer les facteurs régissant le transport des peptides à travers la membrane. Il a été démontré que la charge des peptides et de la membrane joueraient un rôle important dans la transmission des peptides. Bouhallab et Henry (1995) ont également examiné les facteurs limitant la transmission, à travers la membrane, d'un peptide de la β -caséine doté d'une activité immunomodulante; il a été conclu que des interactions soluté-membrane joueraient un rôle important dans la transmission du peptide. Les

conditions physico-chimiques du milieu semblent donc importantes à considérer pour l'optimisation d'un procédé de séparation par membranes.

2.2 PROCÉDÉS DE SÉPARATION PAR MEMBRANES

Les procédés de séparation par membranes, un domaine en expansion, offrent la possibilité de préparer une vaste gamme de produits de fractionnement dans diverses industries. La microfiltration, l'ultrafiltration, la nanofiltration et l'osmose inverse sont des procédés de fractionnement à flux tangentiel utilisant la pression (ΔP) comme force motrice du transport à travers la membrane. Ces procédés permettent de concentrer, fractionner ou purifier en continu les composantes d'une solution à l'aide d'une membrane semi-perméable. En filtration tangentielle, le fluide circule parallèlement au plan de la membrane. La force motrice, soit la pression transmembranaire, permet au solvant et aux molécules de taille inférieure au diamètre des pores de traverser le filtre pour constituer le perméat. Les molécules retenues par la membrane sont alors concentrées dans le rétentat. La Figure 2.1 illustre les différences de sélectivité des membranes utilisées en microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration et osmose inverse. La microfiltration est utilisée pour retenir les colloïdes et les macromolécules, alors qu'en ultrafiltration il est possible de séparer les molécules solubles selon leur taille; les membranes de nanofiltration permettent de concentrer et déminéraliser sélectivement la solution traitée tandis que l'osmose inverse est utilisée pour purifier le solvant par la concentration des solutés. De plus, le mode d'écoulement à flux tangentiel crée un effet de turbulence à la surface de la membrane permettant de limiter l'accumulation des solutés sous l'effet du flux convectif (Cheryan, 1986).

Dans le secteur laitier, l'ultrafiltration a d'abord été utilisée pour la production de concentrés de protéines de lactosérum et par la suite, pour la pré-concentration du lait en vue de la fabrication de fromages (Renner et Abd El-Salam, 1991). Des développements plus récents ont permis de purifier les protéines laitières et aussi de procéder à la standardisation protéique du lait par filtration tangentielle et ce, afin d'obtenir des produits constants à partir d'un substrat de composition variable selon les saisons et les espèces bovines (Maubois et Ollivier, 1992; Puhan, 1992). Tel que précisé dans la première section de ce chapitre, des bioréacteurs à membranes ont été utilisés pour la préparation en continu d'hydrolysats enzymatiques de protéines en vue de leur utilisation dans des applications nutritionnelles (Lahl et Braun, 1994); ces bioréacteurs permettent aussi de séparer les constituants de l'hydrolysat en fractions peptidiques spécifiques offrant des caractéristiques physico-chimiques et/ou biologiques particulières (Brûlé *et al*, 1980; Touraine *et al*, 1987; Turgeon et Gauthier, 1990; Pouliot et Gauthier, 1990). Toutefois, l'encrassement des membranes constitue un facteur limitant de certaines de ces applications et dépend de l'état chimique de la membrane et de la solution.

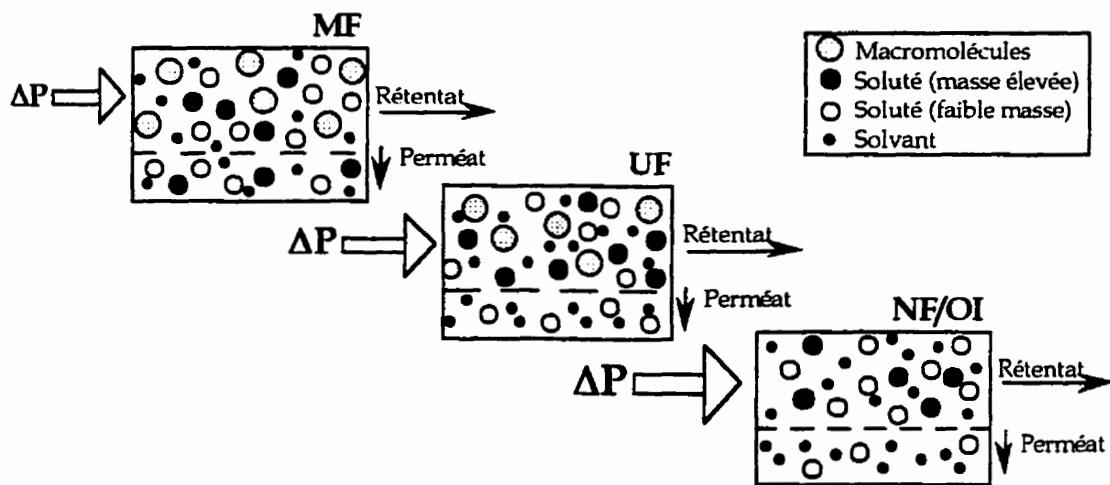


Figure 2.1 Représentation schématique des procédés de microfiltration (MF), ultrafiltration (UF), nanofiltration (NF) et osmose inverse (OI) (Adapté de Mulder, 1996).

2.2.1 Matériaux membranaires

La classification des membranes utilisées en filtration à pression transmembranaire est basée sur le mode de filtration (en surface ou dans le corps de la membrane), la structure et le type de matériau composant la membrane. Les membranes peuvent présenter une structure microporeuse ou asymétrique, ces dernières possédant des pores dont la dimension est variable entre les deux faces de la membrane. Deux classes de matériaux sont utilisés pour la fabrication de membranes de filtration, soient les matériaux organiques et inorganiques. Les principales membranes organiques commercialisées sont composées d'acétate de cellulose, de polysulfone, de polyamide ou de poly(vinyldiene fluoride) (PVDF). Parmi les membranes inorganiques, on retrouve les céramiques et les oxydes de métal. Ces divers matériaux ont été créés afin d'optimiser les performances des membranes par une meilleure résistance chimique et thermique, et pour offrir une plus grande variété de diamètres de pores en vue d'améliorer la spécificité du fractionnement. Le seuil de coupure d'une membrane correspond à la masse moléculaire à partir de laquelle plus de 90% des espèces sont retenues par la membrane (Cheryan, 1986).

Les membranes organiques peuvent être préparées en diverses configurations, soient les membranes spiralées, à fibres creuses, tubulaires et les feuillets plans, alors que les membranes inorganiques sont principalement commercialisées sous forme tubulaire ou en multicanaux. Le choix d'une configuration membranaire est effectué en fonction de l'obtention d'une vitesse élevée du fluide du côté rétentat afin de minimiser les zones d'écoulement laminaire.

La sélection d'une membrane est aussi basée sur le type de solution à traiter ainsi que sur les caractéristiques du matériau membranaire. Le polysulfone est largement utilisé en industrie laitière, notamment à cause de sa stabilité

chimique (résistance aux pH extrêmes et au chlore) et de son coût relativement bas, comparativement aux autres matériaux membranaires.

2.2.2 Composition et propriétés du polysulfone

Le PSf (Figure 2.2) est formé par la polycondensation des monomères hydroxyphénylpropane et dichlorodiphénylsulfoxyde (Wijmans, 1984). La structure du PSf confère à ce matériau une résistance à l'oxydation par la présence des groupements sulfonés (O-S-O) qui tendent à partager leurs électrons par résonnance avec les anneaux benzène adjacents, offrant ainsi une bonne stabilité chimique. De plus, les doublets d'électrons libres des atomes d'oxygène peuvent créer de fortes liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau de la solution, lesquelles sont nécessaires au mouillage du polymère et au transport des molécules à travers la membrane. D'autre part, la répétition d'unités phénylénées crée de la résonnance électronique ainsi qu'un encombrement stérique à la rotation intramoléculaire, contribuant à la rigidité et la stabilité mécanique de la membrane (Cheryan, 1986; Renner et Abd El-Salam, 1991).

Les conditions de fabrication des membranes déterminent la structure finale du polymère. Ainsi, certains additifs permettront de modifier les propriétés d'une membrane. Le polyéthersulfone (PES) (Figure 2.2) est un polymère de la famille des PSf possédant un degré d'hydrophilicité plus élevé que le PSf. Ces matériaux confèrent aux membranes une stabilité thermique due à leur température de transition vitreuse (T_g) élevée: PSf = 190°C et PES = 230°C (Mulder, 1996). Ces propriétés permettent une utilisation à long terme des membranes dans des conditions industrielles.

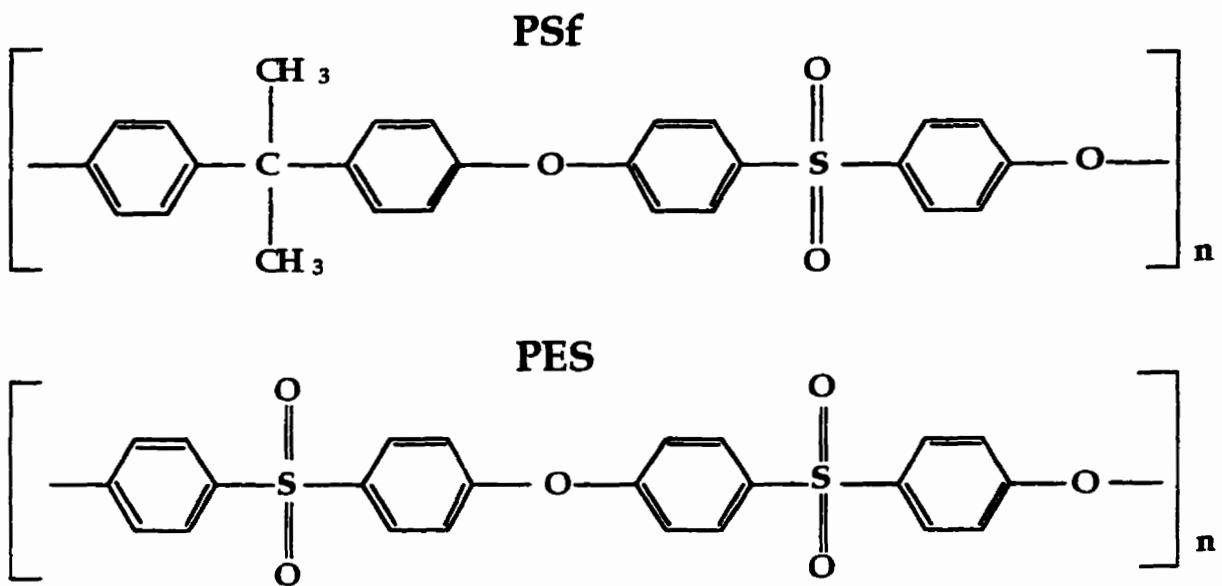


Figure 2.2 Comparaison des structures chimiques du polysulfone (PSf) et du polyéthersulfone (PES) (Kai *et al*, 1985).

2.2.3 Caractéristiques de performance

L'efficacité ou la performance d'une membrane est déterminée par des mesures de perméabilité, soient le flux de perméabilité à l'eau (J_w), le flux de perméation de la solution (J_p) et le coefficient de rejet des solutés (σ).

Le coefficient de rejet représente la sélectivité de la membrane face aux solutés. L'équation 2.4 exprime la proportion d'une espèce retenue par la membrane (σ), où C_p est la concentration dans le perméat et C_r la concentration dans la solution initiale (rétentat). Un soluté non retenu par la membrane possède un $\sigma = 0$, alors que $\sigma = 1$ lorsque le soluté est entièrement concentré du côté rétentat

$$\sigma = 1 - \frac{C_p}{C_r} \quad (2.4)$$

Le flux volumique d'une solution à travers une membrane poreuse peut être décrit par l'équation de Hagen-Poiseuille (Équation 2.5). Pour une membrane donnée, le flux ($\text{l h}^{-1} \text{m}^{-2}$) est proportionnel à la pression transmembranaire (ΔP) alors qu'il diminue avec l'augmentation de la viscosité (η) de la solution, le facteur $[\epsilon r^2 / 8\eta\tau \Delta x]$ étant caractéristique de la structure de la membrane.

$$J = \frac{\epsilon r^2}{8\eta\tau} \frac{\Delta P}{\Delta x} \quad (2.5)$$

Tel qu'illustré à la figure 2.3, le flux de perméation de l'eau pure est proportionnel à la pression appliquée. Les droites présentées mettent en évidence l'effet du diamètre des pores; le flux de perméabilité à l'eau augmente avec la taille des pores de la membrane (structure ouverte). Ce modèle n'est valide que sous certaines conditions lors du fractionnement de mélanges, soit lorsque la pression est basse, que la concentration de la solution est faible et que la vitesse de circulation est très élevée.

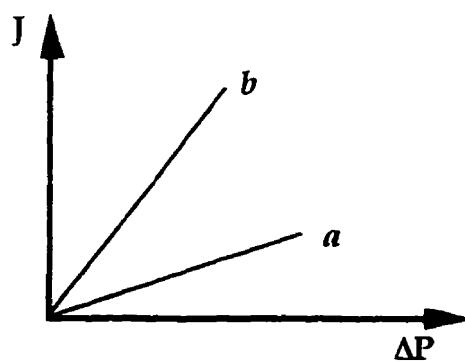


Figure 2.3 Schéma représentant le flux de perméabilité à l'eau pure en fonction de la pression appliquée, pour une membrane de structure (a) dense et (b) ouverte (adapté de Mulder, 1996).

Cependant, ces conditions idéales sont rarement retrouvées en industrie. À pression et concentration supérieures ainsi qu'à vitesse de recirculation moyenne, le profil de perméation atteint un flux limite, indépendant de la pression

(Cheryan, 1986) (Figure 2.4). Dans cette zone de pression transmembranaire, la perméation est régie par les caractéristiques physico-chimiques de la couche de polarisation ou de gel (selon le cas) à la surface de la membrane. Le transfert de matière (coefficients de diffusion) limite alors le passage des solutés.

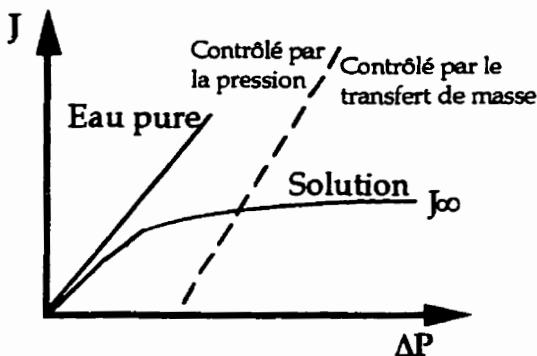


Figure 2.4 Schéma représentant la relation entre le flux et la pression en ultrafiltration (adapté de Mulder, 1996).

L'ensemble des résistances s'opposant à la perméabilité des membranes proviennent de la membrane elle-même et de l'accumulation de solutés sur la surface filtrante. Le flux est donc inversement proportionnel à l'ensemble de ces résistances (R_{tot}):

$$J = \frac{\Delta P}{\eta * R_{tot}} \quad (2.6)$$

Nous verrons plus loin qu'il est possible de subdiviser les composantes de R_{tot} en contributions spécifiques à la membrane et à l'enrassement.

2.2.4 Encrassement des membranes

La chute du flux de perméation est une manifestation de l'encrassement, voire du colmatage des membranes lors de la filtration. L'importance des phénomènes impliqués (Équation 2.7) est fortement dépendante du procédé et de la solution employés (Mulder, 1996).

$$J = \frac{\Delta P}{\eta(R_m + R_a + R_p + R_{cp} + R_g)} \quad (2.7)$$

La membrane offre une résistance hydraulique (R_m) inhérente au système. Les phénomènes d'adsorption de solutés ou de macromolécules génèrent une résistance supplémentaire, qu'ils se produisent en surface (R_a) ou dans les pores (R_p). Ces phénomènes constituent ce que l'on appelle l'encrassement (ou fouling). L'accumulation sur la surface filtrante de solutés retenus par la membrane résulte en un phénomène de concentration de polarisation (R_{cp}), et lorsque la concentration des molécules en surface devient suffisamment importante, une couche de gel peut alors se former (R_g). Ce dernier cas, plus particulièrement rencontré avec du matériel protéique, provoque le colmatage des membranes.

La chute du flux de perméation est très sévère en ultrafiltration, le flux étant souvent inférieur à 5% de la valeur du flux de perméabilité à l'eau (Mulder, 1996). Un comportement typique du flux de perméation en fonction du temps est généralement observé (Figure 2.5). La diminution du flux est principalement due à la concentration de polarisation et à l'encrassement. De plus, les macromolécules retenues par la membrane s'accumulent en surface, résultant en un gradient de concentration de la solution vers la surface (Figure 2.6). En régime constant, le flux convectif des solutés vers la membrane est égal à la diffusion des molécules de la membrane vers la solution (Équation 2.8). La résistance qu'offre cette accumulation de solutés (couche de gel) fait qu'une

augmentation de la pression n'améliorera pas le flux de perméation; le flux limite est ainsi atteint.

$$J_c + D \frac{dc}{dx} = J_w \quad (2.8)$$

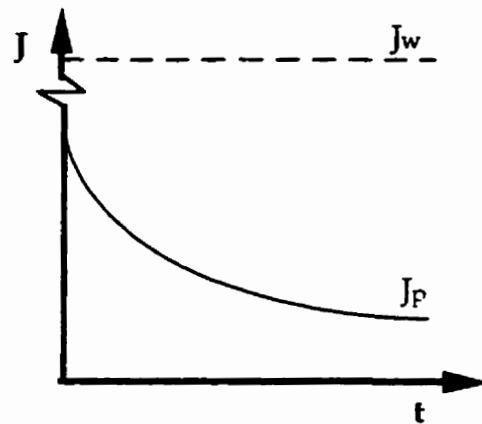


Figure 2.5 Comportement du flux de perméation en fonction du temps.

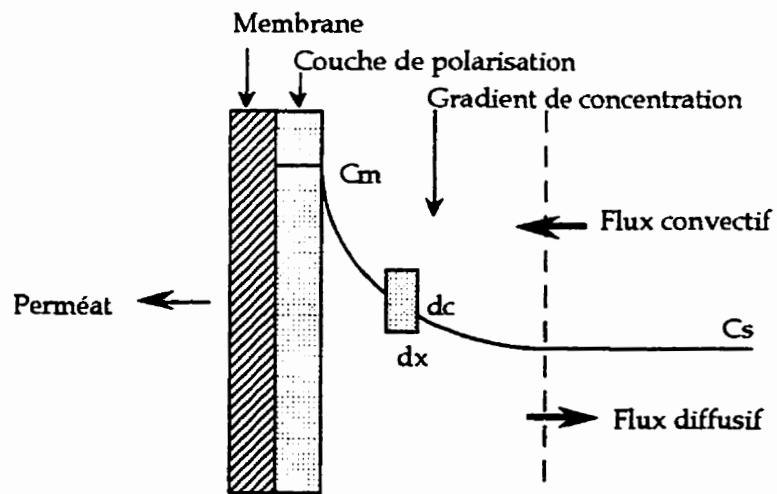


Figure 2.6 Profil de concentration de polarisation en régime constant (adapté de Cheryan, 1986).

L'encrassement est inhérent aux procédés de séparation. Lorsque la concentration de molécules à la surface de la membrane est importante, elle peut agir comme une deuxième membrane, modifiant les propriétés de séparation et de transport du système (Cheryan, 1986). L'optimisation des paramètres d'opération d'un système de filtration peut alors permettre de maximiser l'efficacité du procédé de séparation. Des facteurs relatifs aux caractéristiques opératoires du système et à celles de la solution à traiter doivent alors être considérés.

La *vélocité* du fluide, ou la vitesse de recirculation, est importante afin de maintenir la performance du système; une vitesse élevée augmente la turbulence (taux de cisaillement) au niveau de la surface filtrante, ce qui permet de déloger le matériel déposé sur la membrane. En conséquence, on retrouve des promoteurs de turbulence sur le support des membranes planes ou dans la structure des membranes spiralées. Aussi, la création d'un vortex (Mallubhotla et Belfort, 1997) dans le module de filtration (*Dean vortex flow*) permet de diminuer le gradient de concentration entre la solution et la surface membranaire, limitant ainsi l'accumulation de solutés à la surface des membranes.

Tel que mentionné dans la section 2.2.3 du présent chapitre, une augmentation de la *pression* aura pour effet d'améliorer les flux de perméation jusqu'à la formation d'une couche de gel, après quoi le flux devient indépendant de la pression.

La *concentration* initiale de la solution est aussi déterminante de l'efficacité du système. À forte concentration, la viscosité de la solution est augmentée et la diffusion des molécules est diminuée, affectant ainsi le transfert de masse du côté perméat.

De façon générale, l'augmentation de la *température* de la solution filtrée a pour effet d'améliorer les flux de perméation en abaissant la viscosité de la solution et en augmentant la diffusion des solutés (Renner et Abd El Salam, 1991).

Cependant, une température élevée favorise la dénaturation des protéines (Cheryan, 1986), pouvant ainsi créer des liaisons entre les sites hydrophobes des molécules de la solution et ceux de la membrane. Ces liaisons favorisent alors l'accumulation du matériel protéique à la surface de la membrane et éventuellement l'agrégation des molécules ce qui limite leur passage du côté perméat.

De plus, le choix des *conditions physico-chimiques* de la solution permet aussi de mieux contrôler les flux de perméation. La modification du pH affecte la solubilité et la conformation des protéines, la solubilité étant minimale à leur point isoélectrique (pI). L'ajustement du pH à une valeur éloignée du pI des molécules composant la solution aura alors pour effet de minimiser leur agrégation et d'améliorer les flux de perméation.

Lorsque des interactions soluté-membrane sont impliquées, le *pré-traitement* de la solution à filtrer semble être la façon la plus efficace de minimiser l'encrassement (Cheryan, 1986). Pouliot et Jelen (1995) ont publié une revue des pré-traitements permettant de minimiser l'encrassement des membranes, principalement lors de la filtration du lactosérum: pré-filtration, centrifugation, chauffage et/ou traitement chimique. Entre autres, il a été observé que l'addition d'un agent séquestrant du calcium, tel l'EDTA (0,01 M), pouvait prévenir l'encrassement. Peu d'études de ce genre ont été réalisées avec des substrats caséiques. La détermination des conditions induisant l'encrassement des membranes lors du fractionnement de solutions caséiques reste donc à élucider. Il est impératif de comprendre les phénomènes en cause afin de limiter l'incidence de l'encrassement sur le rendement de ces procédés.

2.2.5 Méthodes de caractérisation de l'encrassement

La nature et l'importance de l'encrassement dépendent fortement de l'état chimique de la membrane et des interactions membrane-solutés et soluté-soluté (Cheryan, 1986). Diverses approches peuvent être utilisées dans l'étude de l'encrassement des membranes de filtration, soient la mesure des flux de perméation ainsi que des techniques plus sophistiquées (spécifiques) faisant intervenir des mesures aux interfaces.

Mesures de perméabilité

La perméabilité à l'eau (J_w) est caractéristique d'une membrane. La mesure de J_w suite à l'adsorption des constituants de la solution, ainsi qu'après la filtration, permet de préciser l'importance de l'encrassement sur la diminution de la perméabilité dans des conditions données. Certains auteurs (Renner et Abd El-Salam, 1991; van der Horst et Hanemaaier, 1990; Pouliot *et al*, 1992; Mochizuki et Zydney, 1992) considèrent que l'encrassement statique ou l'adsorption des solutés à la surface de la membrane d'ultrafiltration représente un facteur important dans la chute du flux de perméation, et augmente significativement la résistance hydraulique et la rétention de la membrane. En effet, Pouliot *et al* (1992) ont mesuré, en conditions dynamiques, l'effet de l'adsorption des composantes du lactosérum sur la chute de J_w avec une membrane de polysulfone. Il a été observé que l'adsorption causait plus de 70% de la chute totale du flux de perméabilité à l'eau. De plus, des travaux concernant la modification de la surface des matériaux membranaires ont été effectués afin d'améliorer les flux de perméation. En effet, Brink *et al* (1990; 1993) ont observé que la pré-adsorption de polymères hydrophiles non-ioniques sur le polysulfone réduisait considérablement l'adsorption des protéines et la chute du flux de

perméation. Cependant, le relargage des molécules pré-adsorbées lors de la filtration limite l'application industrielle de ce mode d'hydrophilisation des surfaces membranaires.

Diverses études ont en outre démontré que le seuil de coupure de la membrane ne représente pas le paramètre déterminant la performance d'une membrane. En effet, la charge et l'hydrophobicité des molécules influencent leur passage à travers la membrane (Nau, 1991; Pouliot *et al*, 1993). L'occurrence de phénomènes de surface (charges/hydrophobicité) a aussi été mise en évidence lors du fractionnement d'acides aminés et de peptides (Daufin *et al*, 1995) ou du lait par électrofiltration (Hugodot *et al*, 1991). Ce procédé, appliqué sur des membranes minérales, permet d'augmenter le degré de pureté des fractions par le transfert sélectif des constituants et, selon l'intensité appliquée, de diminuer de 30% à 50% le colmatage lors de l'ultrafiltration du lait et ce, en ralentissant la formation du dépôt à la surface. Ainsi, le transport des solutés à travers la membrane dépendrait à la fois de la charge nette de la surface et des solutés (Nau, 1991; Lee et Hong, 1992; Pouliot *et al*, 1993).

L'adsorption des protéines implique diverses étapes dans leur interaction avec les surfaces (van der Horst, 1995): redistribution des charges, déhydratation de la surface membranaire et de la protéine, et un réarrangement de la structure de la protéine adsorbée. Aussi, l'hydrophobicité et la charge (selon le cas) des membranes influencent-elles l'adsorption des protéines. La caractérisation des interfaces est donc indiquée comme complément dans la compréhension des phénomènes d'adsorption de matériel protéique et peptidique sur les membranes de filtration.

Caractérisation des interfaces

L'encrassement des membranes peut aussi être étudié par la caractérisation des interactions entre les phases solide et liquide, soient la membrane et la solution. Deux méthodes permettent de caractériser les interfaces: la mesure d'angles de contact (avant et après adsorption des solutés) sur les matériaux membranaires et, la détermination de coefficients de partage des solutés entre la membrane et la solution.

Mesures d'angles de contact

Les propriétés de surface de la membrane peuvent être évaluées à partir de mesures d'angles de contact de solvants dont les paramètres énergétiques sont connus, soient les composantes polaires et non polaire de l'énergie de surface. L'énergie de surface exprime directement les forces intermoléculaires, la tension interfaciale étant l'excès d'énergie par unité de surface (mJ m^{-2}) dû à la formation d'une interface (solide/liquide) (van Krevelen, 1990).

La Figure 2.7 schématise le principe de mesure des angles de contact. Une goutte de solvant est déposée sur une membrane plane hydratée. La valeur de l'angle (θ) à l'interface formé par les gouttes fraîches, nouvellement déposées, évolue avec le temps et un plateau est obtenu, correspondant à θ à l'équilibre, soit lorsque la membrane est couverte d'une monocouche d'eau. Ces valeurs sont reliées aux paramètres d'énergie de surface par l'équation de Young (Zisman, 1964). Le développement de cette approche a permis de mesurer les contributions polaire (*short range*) et non polaire (*long range*) à l'énergie de surface (van Oss *et al*, 1986a), et la contribution polaire peut par la suite être caractérisée en ses composantes *donneur d'électrons* et *accepteur d'électrons* (van Oss *et al*, 1986b).

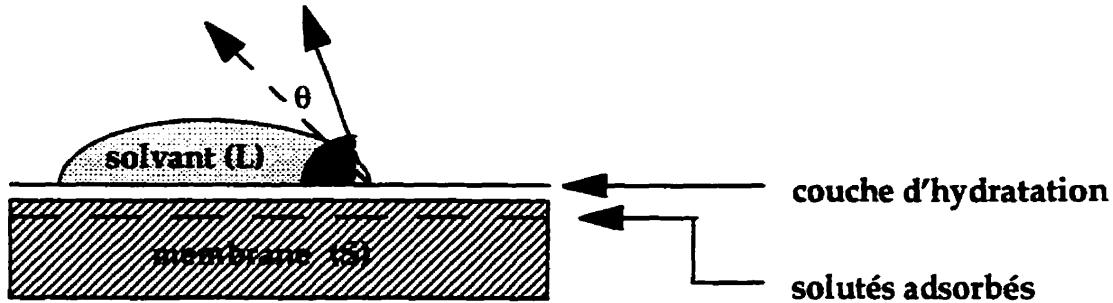


Figure 2.7 Mesure d'angles de contact (θ) sur le matériau hydraté.

L'angle de contact d'une goutte de solvant est relié aux paramètres d'énergie de surface à la fois du liquide et de la surface par l'équation étendue (Équation 2.9) de Young (van Oss et Good, 1988), dans laquelle θ est la valeur de l'angle de contact et γ l'énergie de surface.

$$1 + \cos \theta = (2/\gamma_{L}^{TOT}) [(\gamma_{S}^{LW} \gamma_{L}^{LW})^{1/2} + (\gamma_{S}^{+} \gamma_{L}^{-})^{1/2} + (\gamma_{S}^{-} \gamma_{L}^{+})^{1/2}] \quad (2.9)$$

Les indices L et S réfèrent au liquide et à la surface. TOT exprime l'énergie de surface totale alors que les exposants LW, + et - correspondent respectivement aux contributions Lifshitz-van der Waals (non polaire), accepteur d'électrons et donneur d'électrons. Nous pouvons alors calculer les paramètres énergétiques des surfaces (Équations 2.10 et 2.11), la contribution polaire de la membrane à l'énergie de surface (γ_{S}^{AB} ; Équation 2.12) (van Oss et Good, 1988) et l'énergie interfaciale totale (γ_{13}^{TOT} ; Équation 2.13) entre la membrane [1] et le solvant [3], l'eau (van Oss *et al.*, 1986b).

$$\gamma_{S}^{AB} = 2(\gamma_{S}^{+} \gamma_{S}^{-})^{1/2} \quad (2.10)$$

$$\gamma_{13}^{LW} = [(\gamma_1^{LW})^{1/2} - (\gamma_3^{LW})^{1/2}]^{1/2} \quad (2.11)$$

$$\gamma_{13}^{AB} = 2[(\gamma_1^{+} \gamma_1^{-})^{1/2} + (\gamma_3^{+} \gamma_3^{-})^{1/2} - (\gamma_1^{+} \gamma_3^{-})^{1/2} - (\gamma_1^{-} \gamma_3^{+})^{1/2}] \quad (2.12)$$

$$\gamma_{13}^{TOT} = \gamma_{13}^{LW} + \gamma_{13}^{AB} \quad (2.13)$$

Ces données permettent alors d'évaluer les paramètres d'énergie de surface des membranes propres, tels la monopolarité (γ/γ^*) et le degré d'orientation des molécules d'eau à la surface (Équation 2.14) (van Oss et Good, 1988):

$$\text{orientation (\%)} = 100 (\gamma_{3\text{AB}} - \gamma_{1\text{AB}})/\gamma_{3\text{AB}}, \quad (2.14)$$

ainsi que les changements dans les propriétés de surface provoqués par l'adhésion de solutés sur la membrane. La pression de surface (π) (Équation 2.15) indique la différence dans l'énergie interfaciale membrane-eau occasionnée par l'adsorption:

$$\pi = \gamma_{13\text{TOT}}^{\text{membrane propre}} - \gamma_{13\text{TOT}}^{\text{membrane souillée}} \quad (2.15)$$

Cette méthode permet donc d'évaluer les paramètres d'énergie de surface des membranes propres ainsi que les changements dans les propriétés de surface suite à l'adhésion de solutés sur la membrane. Capannelli *et al* (1990) ont utilisé une technique de mesure d'angles de contact afin d'évaluer les propriétés de membranes (PSf, PVDF) possédant divers degrés d'hydrophilicité; les résultats ont démontré une corrélation entre les membranes hydrophiles (faible θ) et des flux de perméation élevés lors de l'ultrafiltration de protéines, comparativement aux membranes hydrophobes.

Détermination de coefficients de partage (chromatographie)

L'interface solide-liquide d'un système à membrane peut être modélisée par un système de chromatographie liquide dans lequel des billes du matériau membranaire sont utilisées pour composer la phase stationnaire de la colonne. La relation entre le système de chromatographie liquide et l'interface membrane-solution est schématisée à la Figure 2.8. Le volume de solvant couvrant la surface de la phase stationnaire (sphère d'hydratation) représente la couche d'hydratation (interface) du système à membrane, alors que la phase mobile correspond au rétentat (solution) (Tam *et al*, 1991).

À l'aide d'un système HPLC, il est alors possible d'établir une échelle relative de l'affinité des solutés en déterminant le coefficient de partage (K_a) de solutés de référence entre la phase mobile et la phase stationnaire. Un soluté ne possédant pas d'affinité avec la phase stationnaire (billes) est élué rapidement et possède un coefficient de partage référant au zéro de l'échelle K_a (Équation 2.16). Par contre, lorsque le soluté se trouve en concentration égale sur la phase stationnaire (C_s) et dans la phase mobile (C_m), son affinité n'est pas sélective pour l'une ou l'autre des phases et son K_a est établi à 1. Une molécule possédant un coefficient supérieur à 1 présente une forte attraction pour le matériau membranaire, indiquant un potentiel à l'encrassement des membranes.

$$K_a = \frac{C_s}{C_m} \quad (2.16)$$

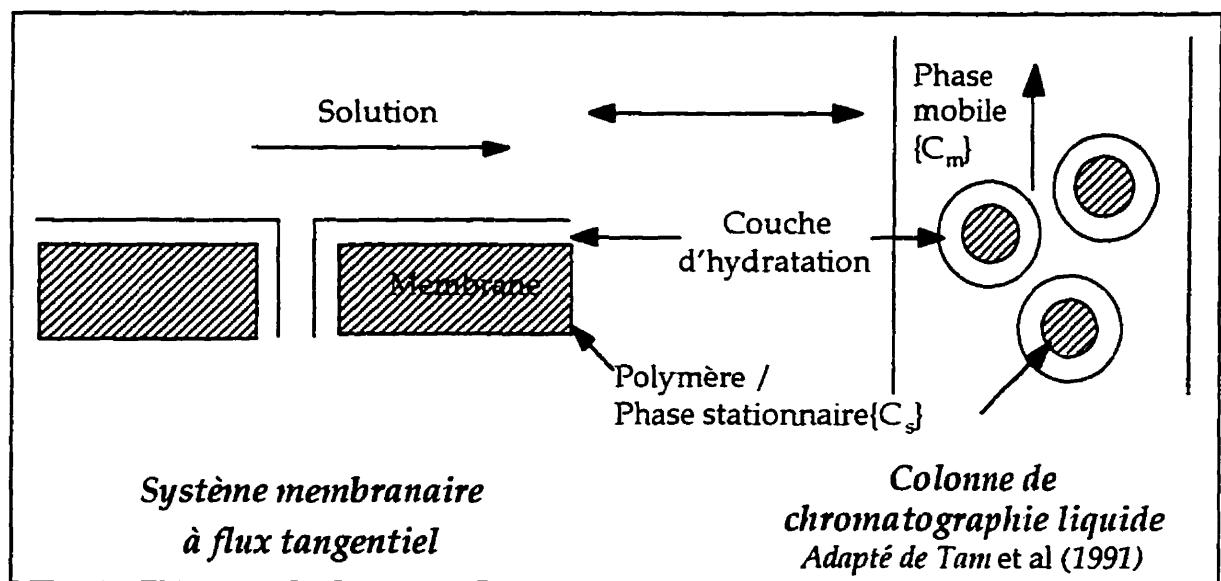


Figure 2.8 Comparaison entre le système de filtration à flux tangentiel et la chromatographie liquide: interface matériau membranaire-solution.

Cette méthode permet de déterminer, en conditions dynamiques, la nature des interactions entre la membrane et les molécules composant la solution; elle

nécessite par contre l'utilisation de solutions modèles, soit une solution comportant des molécules caractérisées et de concentration définie.

De façon alternative à la chromatographie, une séquence d'adsorption et de désorption contrôlées peut permettre de recueillir en mode statique les peptides de la solution possédant une affinité avec le matériau membranaire et ainsi, de déterminer leur coefficient de partage. Par la suite, la chromatographie HPLC peut permettre par exemple d'identifier les peptides adsorbés. Par contre, l'identification des molécules d'une solution complexe, tel le mélange des peptides d'un hydrolysat, nécessite une méthode d'identification plus puissante comme la spectrométrie de masse.

2.2.6 Travaux antérieurs sur le fractionnement par membranes des hydrolysats caséiques.

Les travaux préliminaires à la présente étude visaient l'application du procédé à double ultrafiltration, mis au point par Turgeon et Gauthier (1990), pour le fractionnement d'un hydrolysat trypsique de caséinate de sodium à l'aide d'une membrane de polysulfone. Toutefois, lors de la seconde étape d'ultrafiltration, une chute importante des flux de perméation était observée, indiquant un encrassement sévère des membranes par les composantes de l'hydrolysat. Pouliot et Gauthier (1990) ont alors étudié l'effet du seuil de coupure de la membrane, du pH, de la force ionique et de l'hydrophobicité du milieu sur les flux de perméation. Ils ont démontré que l'augmentation du seuil de coupure (1 à 5 kDa) améliorait les flux de perméation sans toutefois modifier de façon significative la distribution des masses moléculaires des fractions obtenues. Comparé à la perméation au pH initial (pH 8,0) de la solution, l'acidification du milieu augmentait considérablement la durée de l'ultrafiltration alors qu'à pH basique, les flux de perméation étaient améliorés. Aussi, l'augmentation de la

force ionique de la solution par l'ajout de NaCl réduisait légèrement les temps de filtration, alors que la diminution de la constante diélectrique du milieu par l'ajout d'éthanol augmentait les flux de perméation de façon significative, possiblement par un affaiblissement des interactions peptide-membrane à nature hydrophobe. Les résultats de ces travaux indiquaient donc que la modification des conditions physico-chimiques de la solution affectait la charge et la solubilité des polypeptides et que l'adsorption de matériel hydrophobe sur le polysulfone était responsable des chutes de flux de perméation; l'hydrophobicité du matériel peptidique s'ajoutait donc au profil de masses moléculaires comme facteur régissant la perméabilité.

Dans la poursuite de ces travaux, Pouliot *et al* (1993) ont investigué l'effet de la spécificité de deux endoprotéases, la trypsine et la chymotrypsine, sur le fractionnement des hydrolysats caséiques obtenus. Les sites de coupure différent pour chacune des deux enzymes, les chercheurs ont étudié la réjection des membranes de polysulfone face à ces deux types hydrolysats. Les résultats suggéraient que la charge nette des peptides ou des acides aminés soit un facteur prépondérant de leur passage à travers les membranes d'ultrafiltration de polysulfone. De plus, les membranes semblaient peu sélectives aux acides aminés non polaires, alors qu'elles retenaient davantage les acides aminés chargés et hydroxylés.

Des travaux menés par Nau (1991) sur la séparation de peptides issus de l'hydrolyse trypsique de la caséine β , sur des membranes minérales d'ultrafiltration, ont aussi démontré l'importance des interactions électrostatiques. En effet, il a été démontré que la taille des peptides et des pores de la membrane n'étaient pas corrélée avec le taux de rétention des molécules et que la charge et l'hydrophobicité des peptides pouvaient par contre influencer leur rétention. Par exemple, une membrane de seuil de coupure de 10 kDa retenait à 80% un peptide de 3130 Da lorsqu'il était en solution avec d'autres peptides. Ces travaux ont aussi mis en évidence l'effet de paramètres physico-

chimiques sur le fractionnement des peptides. Ainsi, l'abaissement du pH à 5,7 se traduisait par un colmatage immédiat, donnant des flux de perméation très faibles. Par contre, l'augmentation de la force ionique du milieu permettait d'améliorer la transmission de peptides initialement retenus par la membrane, mais restait inefficace pour les peptides possédant un caractère hydrophobe important.

L'ensemble de ces observations nous a donc amené à considérer les interactions peptide-surface membranaire afin de mieux comprendre les phénomènes régissant l'encrassement des membranes de PSf par les hydrolysats caséiques. Il semble en effet que ces interactions modifient la perméabilité des membranes dû à la charge des molécules composant le milieu, et que l'hydrophobicité soit un facteur important dont l'impact demeure encore mal défini.

2.3 HYPOTHÈSE, BUT ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

La revue de littérature nous a permis de démontrer l'importance des procédés à membranes pour le fractionnement des hydrolysats de caséines et la nécessité de mieux comprendre les phénomènes causant l'encrassement des membranes de polysulfone par ce type d'hydrolysats. La problématique du travail reposait donc sur la compréhension les phénomènes causant la baisse importante des flux de perméation lors du fractionnement des hydrolysats de caséines.

L'hypothèse à la base des présents travaux soutient que lors de l'ultrafiltration d'un hydrolysat caséique, des interactions peptides-membrane modifient les propriétés de surface du matériau membranaire et affectent la perméabilité de la membrane.

Le but de notre étude était d'élucider la nature des interactions moléculaires initiant l'encrassement des membranes lors de la séparation d'un hydrolysat caséique. Pour atteindre ce but, les objectifs suivants ont été définis:

- 1. Étudier l'effet des conditions physico-chimiques du milieu et des propriétés du matériau membranaire sur la perméabilité de la membrane lors de l'ultrafiltration d'un hydrolysat trypsique de caséinate.**
- 2. Étudier l'effet de l'adsorption statique d'un hydrolysat caséique sur les paramètres énergétiques des surfaces membranaires.**
- 3. Identifier les peptides adsorbés sur les membranes de polysulfone afin de préciser la nature des interactions peptide-matériau membranaire.**

Dans la thèse, ces objectifs ont été traités séparément et correspondent aux trois prochains chapitres, présentés sous la forme d'articles scientifiques en langue anglaise. Au Chapitre 3, nous avons étudié l'effet des conditions physico-chimiques (pH; agent séquestrant) de la solution d'hydrolysat caséique et des propriétés du matériau membranaire (polysulfone et polyéthersulfone; seuil de coupure) sur la perméabilité des membranes. L'adsorption étant un phénomène important dans l'enrassement des membranes, le Chapitre 4 a été consacré à l'étude de l'adsorption statique des peptides de caséines et son effet sur la modification des paramètres énergétiques des membranes de polysulfone et de polyéthersulfone par la mesure d'angles de contact. Au Chapitre 5, les travaux ont été complétés par la caractérisation des peptides caséiques adsorbés sur le polysulfone et ce, en vue de préciser la nature des interactions initiant l'enrassement des membranes. Finalement, le Chapitre 6 de la thèse est une conclusion générale où les principales conclusions du travail sont exposées, et se termine par des perspectives de recherche sur lesquelles nos travaux ouvrent la voie. Les références bibliographiques relatives à chacun des articles scientifiques se retrouvent dans les chapitres respectifs.

Chapitre 3

SEPARATION OF CASEIN HYDROLYSATES USING POLYSULFONE ULTRAFILTRATION MEMBRANES WITH pH AND EDTA TREATMENTS APPLIED

Publié dans la revue le Lait (1995) 75, 259-269.

ABSTRACT

The preparation of peptides fractions from casein hydrolysates can be achieved by the use of ultrafiltration for the removal of the enzyme from the reaction mixture and/or to obtain specific fractions of peptides. However, the ultrafiltration of casein hydrolysates is subjected to severe fouling phenomena which affect both the flux decline and the rejection properties of the membrane. Polysulfone membrane material used in previous work showed specific rejection properties towards charged or hydroxylated amino acids. Polysulfone and polyethersulfone flat sheet membranes were selected for their distinctive surface properties. The ultrafiltration of a tryptic hydrolysate from sodium caseinate was studied and physico-chemical variables were introduced, namely, pH of the hydrolysate (pH 6, 8, 10) and addition of a calcium sequestrant (EDTA 20 mmol l⁻¹). Flux decline measurements, total nitrogen rejection, molecular mass distribution profile, and amino acid composition of the permeates were determined. Although the polyethersulfone membranes showed greater permeability to water (+15%) at 25°C than polysulfone, no distinctive effect of membrane material was observed in the permeation flux (l h⁻¹ m⁻²) during ultrafiltration of the hydrolysates. The rejection coefficients were similar for both materials. It was observed that the pH and the excess of EDTA had a much stronger effect than the material on the rejection properties (nitrogen, peptides, amino acids) and the flux decline. The two materials seemed to exhibit different surface reactivity towards charged molecules.

RÉSUMÉ

La préparation de fractions peptidiques issues d'un hydrolysat caséique peut être réalisée par ultrafiltration afin de séparer l'enzyme du mélange réactionnel et/ou pour l'obtention de fractions peptidiques spécifiques. Toutefois, l'ultrafiltration d'hydrolysats caséiques conduit à des phénomènes d'encrassement sévères affectant à la fois la chute du flux de perméation et les propriétés de rejet de la membrane. Les membranes de polysulfone utilisées lors de travaux antérieurs présentaient des propriétés de rejet spécifiques face aux acides aminés chargés ou hydroxylés. Pour cette étude, des membranes planes de polysulfone et de polyéthersulfone ont été sélectionnées pour leurs propriétés de surface distinctes. L'ultrafiltration d'un hydrolysat trypsique de caséinate de sodium a été étudiée et des variables physico-chimiques ont été introduites, soient le pH de l'hydrolysat (pH 6, 8, 10) et l'ajout d'un agent séquestrant pour le calcium (20 mmol l⁻¹ EDTA). L'évolution du flux de perméation, le coefficient de rejet de l'azote total, le profil de masse moléculaire et la composition en acides aminés dans les perméats ont été déterminés. Bien que les membranes de polyéthersulfone possédaient une perméabilité à l'eau à 25°C supérieure au polysulfone (+15%), des flux de perméation (l h⁻¹ m⁻²) similaires ont été observés lors de l'ultrafiltration des hydrolysats. Les coefficients de rejet étaient similaires pour les deux matériaux. Il a été observé que le pH et l'excès de EDTA exerçaient un effet supérieur à celui du matériau sur les propriétés de rejet (azote, peptides, acides aminés) et sur la chute du flux de perméation. Les deux matériaux montrent un comportement différent face aux molécules chargées.

INTRODUCTION

The enzymatic hydrolysis of milk caseins using pancreatic extracts has been extensively used for the preparation of therapeutical products designed for the nutrition of patients presenting disorders of protein digestion or following surgery of the digestive tract (Manson, 1980). Casein hydrolysates offer the advantage of providing the amino acid content of milk caseins in a predigested form which facilitates its intestinal absorption. However, since specific casein sequences have been identified as potential bioactive peptides such as opioids and mineral carriers (Meisel and Schlimme, 1990), downstream fractionation steps have been proposed (Touraine *et al*, 1987). Brulé *et al* (1980) have patented a process for the preparation of caseinophosphopeptides using ultrafiltration (UF) membranes under specific physico-chemical conditions, namely pH 6.2 and with 0.2% Na₂HPO₄ and 0.5% CaCl₂ added to the hydrolysate prior to UF. The retentate obtained showed an increased content in phosphoserine residues accompanied by a decrease in aromatic amino acids (Phe, Tyr, Trp). This shift in amino acid profile was explained by the sequestering action of Ca⁺⁺ on phosphoserine residues which produced aggregated material that was rejected by the UF membrane. This development has succeeded in demonstrating the technological potential of a physico-chemical and membrane-based approach for the fractionation of casein hydrolysates. However, there remains a major limitation or drawback to such processes, namely the severe fouling phenomena by casein hydrolysates that strongly affect the permeability of UF-membranes.

Since the pioneer work of Brulé *et al* (1980), reports on the fractionation of casein hydrolysates using UF-membranes have been very scarce. Walsh *et al* (1989) studied the rejective properties of metallic ultrafiltration membranes for amino acids, calcium and casein hydrolysates. Their results illustrated the strong influence of the pH of the feed and of the surface charge of the membrane on the

passage of charged amino acids and calcium. Nau (1991) reported on the membrane separation of tryptic hydrolysates from β -casein. It was found that pH and ionic strength of the feed, and electrostatic charge of the membrane material influenced the flux decline and the selectivity of the membrane. The results showed that the permeation flux was most affected at low pH (5.7 vs 7.5 or 12.0). Also, the net charge and the hydrophobicity of the peptides found in the hydrolysate could contribute to their retention behaviour. A low increase in ionic strength could improve the passage of peptides initially retained while it increased the retention of the peptides concentrated in the permeate. A strong increase in ionic strength resulted in aggregation phenomena. However, modification of the ionic strength was not efficient for peptides of greater hydrophobicity. The nature and charge density of the membrane material played a role in the retention of peptides even when the pore sizes were significantly higher than the size of the peptides.

Our first work (Pouliot and Gauthier, 1990) focussed on the effect of physico-chemical parameters such as pH on the flux decline during UF of casein hydrolysates using polysulfone membranes. It was observed that pH modification produced marked effect on both the flux decline upon UF and molecular mass profile of the permeates obtained. In another study (Pouliot *et al*, 1993), it was also shown that polysulfone exhibited specific rejective properties towards charged and hydroxylated amino acids.

The present study was led in order to investigate the effect of the compositional factors of the membrane materials and of the physico-chemical properties of the casein hydrolysates on their fractionation profile. Polyethersulfone (PES) was therefore chosen since: 1) it differs from polysulfone (PS) by its chemical composition, while being the same class of polymers (Figure 3.1) (Kai *et al*, 1985); and 2) PES is known to possess greater permeability and chemical stability than PS which comprises one dimethyl group and one sulfonated group per repeating unit. PES only contains sulfonated groups per repeating unit. For both materials,

molecular mass cut-offs (MMCO) of 5 kDa and 10 kDa were used for the experiment since no discrepancies in fractionation profiles were observed in a previous study (Pouliot and Gauthier, 1990) when ultrafiltering with 1 kDa, 2 kDa, or 5 kDa membranes. The specific physico-chemical conditions were also determined on the basis of a previous study; it was already known that changing the pH strongly affected the permeation flux; pH values of 6.0, 8.0 and 10.0 were chosen. Also the presence of EDTA (disodium-ethylenediamine-tetraacetate salt), a calcium chelating agent, had been identified as directly modifying the flux decline behaviour during the concentration of casein hydrolysates; a level of 20 mmol l⁻¹ was chosen for the experiment.

The effects of membrane material and MMCO, together with that of pH and calcium-chelating agent in the hydrolysate, on the flux decline , total nitrogen rejection, molecular mass distribution profile, and amino acid profile were studied.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the total hydrolysate from casein

Commercial sodium caseinate (ICN Chemicals, Cleveland, OH, USA) was reconstituted (100 l) to 3.5% (w/v, protein basis) and hydrolyzed using trypsin (Type III-S) from bovine pancreas (Sigma Chemical Co, St-Louis, MO, USA). Hydrolysis conditions were: pH 8.0, temperature 40°C, ratio enzyme:substrate 1:200 (mass of protein). The hydrolysis was carried out for 45 min and the pH was maintained by addition of 4 N NaOH, using a portable pHmeter (MDL 119 LCD, Fisher). The mixture was then pumped into a hollow fiber module equipped with two 30 kDa cut-off membranes (HF 1-43-PM30, Romicon, Woburn, MA, USA); the reaction mixture was concentrated 3 × and diafiltered 2 ×. The permeate was then freeze-dried, constituting the casein total hydrolysate (TH) used for the present study.

Ultrafiltration of the total hydrolysate from casein

Polysulfone (Iris UF3026) and polyethersulfone (Iris UF3028) flat sheet membranes (0.02 m^2) were obtained from Tech-Sep (Rhône-Poulenc, Miribel, France). The membranes were conditioned at 50°C by a 10-min rinsing (once flow through), a 30-min recirculation of 0.3% NaOH, a 15-min rinsing, a 30-min recirculation of 0.6% H_3PO_4 , and a final 15-min rinse. Distilled deionized rinsing water was used throughout the study. The membranes were cleaned after every filtration starting with a 15-min rinse and followed by a 20-min recirculation of the solutions described above. Whenever required, 250 ppm NaOCl was added to the caustic solution to restore the pure water flux. The membranes were stored in 25 ppm NaOCl. The pure water flux (J_w) was measured after each cleaning

procedure and before every ultrafiltration, providing the reference value in order to compare the different conditions under study.

A plate-and-frame Rayflow 2x100 module (Tech-Sep, Rhône-Poulenc, Miribel, France) equipped with a variable rotary vane pump (model 7116, Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, IL, USA) and a temperature-controlled water bath ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) was used for the experiments. The ultrafiltration runs were performed at 25°C under a constant transmembrane pressure of 160 kPa and an estimated tangential velocity of 1.6 m s^{-1} .

The total hydrolysate was solubilized in 1.2 l distilled deionized water at 1.65% total solids (w/v), and the solution was filtered on a Whatman no 4. Whenever required, 20 mmol l⁻¹ EDTA ([ethylenediamine]-tetraacetic acid disodium salt; Fisher Scientific, Ontario, Canada) was then solubilized. The pH of the solution was adjusted to 6.0, 8.0 or 10.0 using 4 N and/or 1 N HCl or NaOH.

The permeation rate (ml min⁻¹) was measured during the concentration of the total hydrolysate and further calculated as flux J (l h⁻¹ m⁻²). Solutions were ultrafiltered to a volumic concentration factor (VCF) of 4 \times . Ultrafiltration experiments were performed in triplicate. For each experiment, 100 ml of permeate, designated as amino acids and small peptides fraction (AA) was collected and stored at -15°C for subsequent analysis.

Analyses

Total nitrogen contents were determined in triplicate using the Kjeldahl method (IDF, 1986) performed on a Büchi bloc digestor 430/distillation unit Büchi 323 (Büchi, Flawil, Zwitzerland).

Molecular mass distribution profiles of the peptides (TH and AA) were determined by high performance size exclusion chromatography (HPSEC, LKB

system) using a TSK-2000 SW column (Vijayalakshmi *et al*, 1986). The total surface of the chromatogram was separated in three ranges of molecular mass (< 2000 Da, 2000-5000 Da, and > 5000 Da) and expressed in percentage of the total surface.

The amino acid compositions of the fractions were determined with the Pico-Tag method using Pico-Tag work station and 3 µm column (Waters, Millipore) after acid hydrolysis (HCl 6 N, 100°C, 24 h).

Titration curves were performed at 25°C on TH and AA fractions using an auto-titrator Model DL 21 (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Switzerland), using the back titration method (Lucey *et al*, 1993). Solutions (50 ml) were titrated at a rate of 0.2 ml min⁻¹ with 0.5 N NaOH or 0.5 N HCl. The buffering index (dB/dpH) was calculated for TH solutions (1.5% w/v protein) and for the AA fractions obtained at pH 8.0, with and without added EDTA, for both materials.

RESULTS

Flux decline during 4 × concentration

The decreases in permeation flux with increasing VCF for the four membranes under study are shown in Figure 3.2. The runs performed at pH 6.0 were stopped before reaching a VCF of 2 × because of the very low flux values obtained. Similar flux decline behaviour were generally observed for PS and PES. Although PES membranes showed greater permeability to water than PS (see Figure 3.2), the initial fluxes were similar for the two materials. The MMCO of the membrane affected the initial permeation flux averaging 60 l h⁻¹ m⁻² for the 10 kDa and 35 l h⁻¹ m⁻² with the 5 kDa membranes. Ultrafiltering at pH 10.0 led to higher flux values than at pH 8.0; and in all cases, filtrations at pH 6.0 resulted in very low initial fluxes (< 20 l h⁻¹ m⁻²). Figure 3.2 also shows a marked effect of the presence of a chelating agent on the flux decline characteristics; the initial flux (J_0) and the total flux decline ($TFD=100-[J_t/J_0]100]$) were lowered when EDTA was added; for example, using a PS 10 kDa at pH 8.0 without EDTA $J_0= 58\text{ l h}^{-1}\text{ m}^{-2}$ and $TFD=48\%$ were obtained, while with added EDTA J_0 was 50 l h⁻¹ m⁻² and $TFD=29\%$. This phenomenon was observed at all pH values with the four membranes under study.

Nitrogen rejection

The passage of peptides and amino acids was first characterized by determining the nitrogen rejection coefficient ($\sigma = 1 - C_p/C_r$, where C_p and C_r represent the nitrogen content in permeate and retentate). As seen from Table 3.1, low rejection values were obtained (< 0.28) for all the treatments under study. It was observed that pH and EDTA induced the most important changes in nitrogen rejection. Increasing pH from 6.0 to 10.0 decreased the rejection from 0.12-0.19 to

0 when no EDTA was added while opposingly, the rejection coefficient showed a minimum value at pH 8.0 ($\sigma = 0.13\text{--}0.17$) compared to 0.19–0.28 at pH 6.0 and 10.0, when EDTA was added. Similar trends were observed for PS and PES, and for 5 kDa and 10 kDa membranes.

Molecular mass distribution profiles

The molecular mass distribution profiles of the peptides found in permeates (see Table 3.2) were all characterized by a high content (> 94.8%) in short peptides (< 2000 Da). The 2000–5000 Da fraction slightly increased as pH was shifted from 6.0 to 10.0 but always remained within the 0.95% to 4.90% range whereas the large peptides (> 5000 Da) content was always found to be lower than 0.30%. A greater proportion of large peptides was generally found in the permeates from the 10 kDa membranes. The use of PS and PES generally led to similar results. The molecular mass distribution profiles of the peptides found in permeates with 20 mmol l⁻¹ EDTA were all similar to those obtained without EDTA and therefore were not included in Table 3.2.

Amino acid profiles

The amino acid profiles obtained for the permeates from 5 kDa and 10 kDa membranes of both PS and PES were generally similar. Table 3.3 shows the amino acids profiles obtained with the 10 kDa PS and PES membranes in the physico-chemical conditions under study. Some individual amino acids showed greater variations and were grouped as acidic (Asp, Glu) and basic (Arg, Lys, His) amino acids. The variations in amino acid profiles showed some discrepancies. As for example, the content in acidic amino acids in presence of EDTA decreased from 24.98 to 21.91 as pH was adjusted from 6.0 to 10.0 with PS membrane whereas it increased from 21.66 to 27.01 with PES membrane. Such phenomenon was not observed for basic amino acid content which slightly decreased for both PS and PES.

It was however observed that adjusting pH from 6.0 to 10.0 generally induced an increase in acidic amino acids and a decrease in basic amino acids. The addition of EDTA produced similar effects than pH on the acidic and basic amino acid profiles. A minor effect related to membrane material was found for the basic/acidic amino acids ratios which were generally higher (+ 10%) for PES compared to PS. Finally, lower basic/acidic ratios were obtained in the presence of EDTA.

Titration curves of total hydrolysate and permeates

Further characterization of the hydrolysate and of the permeates obtained was accomplished by determining their titration curve between pH 3.0 to 11.0. Figure 3.3 shows the curves obtained with TH and with permeates obtained at pH 8.0 for PS and PES, with or without added EDTA. Two typical curve shapes were obtained, namely without EDTA ($\text{maximum } \text{d}B/\text{d}pH \approx 7.5$) and with EDTA ($\text{maximum } \text{d}B/\text{d}pH \approx 6.2$ and 9.8). Curves obtained at pH 6.0 and 10.0 (not shown) did show similar characteristics to those at pH 8.0.

DISCUSSION

The results obtained in this study showed that physico-chemical parameters such as pH and presence of EDTA induced much stronger effects than membrane material and MMCO on the flux decline and on the rejection phenomena during ultrafiltration of total hydrolysate obtained from casein.

Effect of membrane materials and MMCO

The similarity between the initial fluxes (J_0) obtained with PS and PES, despite the greater water permeability of PES, suggests that more important adsorption phenomena involving components from hydrolysates occur with PES. Contact angle measurements performed on PS and PES upon static fouling with casein hydrolysate (Gourley *et al*, 1994) support this view. Such similar flux behaviour between PES and sulfonated polysulfone was also observed by Millesime *et al* (1994) upon concentration of lysosome.

PS and PES did not show distinctive differences in total nitrogen rejection and molecular mass distribution profiles in permeates, but variations in amino acid composition were observed. Since in all permeates, > 94% of the peptides were smaller than 2000 Da, it can be argued that the differences induced by PS and PES could result from adsorption of peptides or amino acids onto the membrane surface and which did not modify its pore size. To some extent, this hypothesis would be controversial since it is known (Meireles *et al*, 1991; Mochizuki and Zydny, 1992; Brink *et al*, 1993) that protein adsorption modifies the pore size of sieving membranes. However, the surface properties of the adsorbed fouling layer on PS and PES would possess different characteristics and therefore affect the passage of amino acids. This is illustrated to some extent by the ratio basic/acidic amino acids which was generally lower for PS compared to PES.

The use of higher MMCO membrane (10 kDa vs 5 kDa) only slightly improved the permeation flux and the rejection of total nitrogen. The molecular mass distribution profile showed higher content of larger peptides (> 2000 Da) in permeates from 10 kDa membranes. These observations are in agreement with previous findings (Pouliot *et al*, 1993) indicating that the MMCO of polysulfone membranes did not influence to a great extent the separation characteristics of casein hydrolysates.

Effect of pH and EDTA

The very low flux values obtained at pH 6.0 are in good agreement with the results obtained by Pouliot and Gauthier (1990) and by Nau (1991). It can be suggested that by changing the pH of the media from 6.0 to 10.0, the net negative charge of the peptides is increased, which favours repulsive effects (Nyström, 1990) with the membranes negatively charged over this pH-range. Increasing the pH in absence of EDTA decreased the total nitrogen rejection to $\sigma \approx 0$, which suggest that the repulsive forces between membranes and peptides would enhance their passage into the membranes. However, the pH modifications also induced measurable changes in the amino acid profiles in the permeates. In accordance with previous findings (Pouliot *et al*, 1993), the UF-fractionation with PS and PES membranes affected the passage of polar amino acids to a greater extent than that of non-polar amino acids. Increasing pH could have affected both basic and acidic amino acids by modifying the ionization of the side chain residues and promoting peptide-peptide interactions. The effect of pH on the content in acidic amino acids must however be interpreted considering the fact that the analytical method used (Pico-Tag column) does not discriminate between Glu and Gln, and also between Asp and Asn. Therefore, since it is known (Eigel *et al*, 1984) that approximately 50% of the Glx and Asx found in casein are present as Gln and Asn, the real extent of the phenomena observed for Asp and Glu may be greater.

The effect of EDTA on the flux decline profile and on the rejective properties of the membranes could be explained by the impact of this sequestering agent on charged peptides. From calcium determinations on the TH, an excess of 19 mmol l⁻¹ EDTA was found. Titration curves on the hydrolysate with and without EDTA revealed different pKa values of the TH when EDTA was added. As shown in Figure 3, the two distinctive peaks at pH 6.2 and 9.8 on the dB/dpH curve correspond to the ionisation of EDTA from H₂Y²⁻ to HY³⁻ and from HY³⁻ to Y⁴⁻ respectively. Considering this excess in EDTA over the pH range under study, the binding of positively charged peptides (or amino acids) by EDTA should be examined. As a consequence, the excess EDTA could have affected the passage of basic amino acids by the formation of peptide-EDTA complexes which would prevent their passage to the permeate. This would explain the lower proportion of basic amino acids (Arg, Lys, His) in the EDTA-permeates. The occurrence of interactions between EDTA and membrane materials should also be examined, but the present study did not provide experimental evidences for such phenomena.

CONCLUSION

Although the PES showed greater permeability than PS to water, the two materials are similar, showing no distinctive differences in the fractionation; however, they seem to have a different surface reactivity towards charged molecules.

The flux was improved using a 10 kDa membrane but the increase in MMCO did not alter significantly the composition of the fractions obtained, as possible result of the concentration polarization.

Phenomena concerning the net charge of the peptides and/or the membrane are determinant for the hydrolysates fractionation. Ionisation of the environment had a marked effect on the degree of association of the peptides and/or on the interactions membrane-peptides. Excess of EDTA in the hydrolysate modified the composition of the permeates obtained (nitrogen rejection, molecular mass distribution profile, and amino acid profile).

Further studies on specific interactions membrane-peptides would lead to a better understanding of the fouling phenomena.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the FCAR and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Science du Québec.

REFERENCES

- Brink LES, Elbers SJG, Robbertsen T, Both P (1993) The anti-fouling action of polymers preadsorbed on ultrafiltration and microfiltration membranes. *J Membrane Sci* 76, 281-291
- Brulé G, Roger L, Fauquant J, Piot M (1980) Procédé de traitement d'une matière à base de caséine contenant des phosphocaséinates de cations monovalents ou leurs dérivés, produits obtenus et applications. Brevet Fr 2 474 829, INPI, Paris
- Eigel WN, Butler JE, Ernstrom CA, Farrell Jr HM, Harwalkar VR, Jenness R, Whitney RMcL (1984) Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *J Dairy Sci* 67, 1599-1631
- Gourley L, Britten M, Gauthier SF, Pouliot Y (1994) Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurements. *J Membrane Sci* 97, 283-289
- International Dairy Federation (1986) Milk: Determination of nitrogen content (kjeldahl method) and calculation of crude protein content. International Provisional IDF Standard 20A
- Kai M, Ishii K, Tsugaya H, Miyano T (1985) Development of polyether sulfone ultrafiltration membranes. In: *Reverse osmosis and ultrafiltration*. (Sourirajan S, Matsuura T, eds) Am. Chem. Society, Washington, DC, 21-33
- Lucey JA, Hanth B, Gorry C, Fox PF (1993) The acid-base buffering properties of milk. *Milchwissenschaft* 48, 268-272

Manson W (1980) The use of milk and milk constituents in pharmaceutical preparations. *Int Dairy Fed Bull* 125, 60-65

Meireles M, Aimar P, Sanchez V (1991) Effect of protein fouling on the apparent pore size distribution of sieving membranes. *J Membrane Sci* 56, 13-28

Meisel H, Schlimme E (1990) Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends Food Sci Technol* 1, 41-43

Millesime L, Amiel C, Chaufer B (1994) Ultrafiltration of lysosyme and bovine serum albumin with polysulfone membranes modified with quaternized polyvinylimidazole. *J Membrane Sci* 89, 223-234

Mochizuki S, Zydny AL (1992) Effect of protein adsorption on the transport characteristics of asymmetric ultrafiltration membranes. *Biotechnol Prog* 8, 553-561

Nau F (1991) *Production et séparation par ultrafiltration de peptides trypsiques issus de la caséine β bovine.* Thesis, ENSA, Rennes, France

Nyström M (1990) Fouling prevention by modification of UF membranes. Proc. ICOM'90, August 20-24, Chicago, IL, 90

Pouliot Y, Gauthier SF (1990) Effect of selected physico-chemical parameters on the flux decline of casein hydrolysate on polysulfone ultrafiltration membranes. Proc. ICOM'90, August 20-24, Chicago, IL, 273-275

Pouliot Y, Gauthier SF, Bard C (1993) Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes. *J Membrane Sci* 80, 257-264

Touraine F, Brûlé G, Maubois JL (1987) Séparation chromatographique de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique de protéines de lactosérum et de caséines. *Lait* 67, 419-436

Vijayalakshmi M, Lemieux L, Amiot J (1986) HPLC analytical separation of peptides according to their molecular weight. *J Liq Chromatogr* 9, 3559-3576

Walsh CJ, Thomas RL, Kunkel ME (1989) The use of metallic ultrafiltration membranes to assess calcium availability *in vitro*. *Food Chem* 32, 307-317

Table 3.1. Rejection coefficients (σ) for nitrogen over 4 \times concentration of the total hydrolysate.

Coefficients de rejet (σ) de l'azote après concentration de 4 \times de l'hydrolysat total.

		<i>Polysulfone</i>		<i>Polyethersulfone</i>	
<i>pH</i>		<i>no EDTA</i>	<i>EDTA</i>	<i>no EDTA</i>	<i>EDTA</i>
5 kDa	6.0 ¹	0.19	0.28	0.15	0.22
	8.0	0.00 ¹	0.17	0.02 ¹	0.14
	10.0	0.00	0.28	0.00	0.26
10 kDa	6.0 ¹	0.14	0.19	0.12	0.22
	8.0	0.00	0.13	0.00	0.14
	10.0	0.00	0.23	0.00	0.26

1. Values obtained over a VCF \leq 2.

1. Valeurs obtenues au FCV \leq 2.

Table 3.2. Molecular mass distribution profile of the permeates (%) obtained in absence of EDTA.

Profil de distribution de masse moléculaire des perméats obtenus (%) sans l'ajout d'EDTA.

	Polysulfone (Da)			Polyethersulfone (Da)		
	> 5000	2000-5000	< 2000	> 5000	2000-5000	< 2000
Total hydrolysate	0.4	3.3	96.3			
5 kDa						
pH 6.0 ¹	<0.1	0.9	99.0	<0.1	1.7	98.2
pH 8.0 ¹	0.1	2.4	97.5	<0.1	1.8	98.1
pH 10.0	0.1	2.0	97.9	0.1	2.3	97.6
10 kDa						
pH 6.0 ¹	<0.1	1.7	98.3	0.1	2.0	97.9
pH 8.0	0.3	4.9	94.8	0.2	3.3	96.5
pH 10.0	0.3	4.0	95.7	0.2	3.6	96.2

1. Values obtained over a VCF ≤ 2 .

1. Valeurs obtenues au FCV ≤ 2 .

Table 3.3. Amino acid profiles of permeates obtained under specific pH conditions, with and without added EDTA, for PS and PES 10 kDa membranes.
Profils d'acides aminés des perméats obtenus aux différents pH, avec et sans EDTA ajouté, pour les membranes de 10 kDa en PS et PES.

Amino acids	TH	Amino acid content (%)											
		Polysulfone (PS)						Polyethersulfone (PES)					
		6.0	8.0	10.0	6.0	8.0	10.0	NE	E	NE	E	NE	E
Asp	4.41	5.57	6.88	7.79	4.19	3.57	3.81	4.44	4.31	3.44	4.54	3.94	7.57
Glu	20.10	16.70	18.10	19.40	17.20	17.80	18.10	16.50	17.40	17.10	18.60	17.50	19.40
Ser	4.89	3.95	3.84	4.06	4.67	4.26	4.35	3.90	3.69	3.82	4.02	3.91	4.03
Gly	2.21	1.91	2.18	2.09	2.47	2.23	2.17	2.01	2.12	2.08	2.11	2.04	1.99
His	3.38	3.80	3.35	3.40	3.60	3.91	3.59	4.08	3.61	3.89	3.69	3.80	3.57
Arg	4.51	5.49	4.96	4.50	5.10	5.17	4.60	5.54	5.18	5.10	4.96	4.83	4.76
Thr	3.70	2.71	2.70	3.10	3.54	5.04	3.48	2.81	2.81	2.95	3.17	3.07	3.08
Ala	2.77	3.32	3.25	3.06	3.31	0.60	3.04	3.32	3.29	3.29	3.11	3.24	3.01
Pro	12.97	10.58	11.00	11.84	13.71	12.85	12.62	11.32	11.86	12.48	12.29	12.16	11.49
Tyr	5.65	6.83	6.37	5.19	5.78	6.12	5.83	6.48	6.63	6.10	5.64	5.70	5.27
Val	7.19	5.63	5.96	6.35	6.17	7.93	7.36	6.37	6.54	6.91	7.15	7.57	6.25
Met	1.14	0.21	0.58	0.62	0.85	0.74	0.84	0.19	0.58	0.74	0.39	0.93	0.76
Ile	4.60	5.30	4.90	4.50	4.60	5.00	4.90	5.30	5.10	5.10	4.90	5.10	4.50
Leu	8.69	8.53	8.75	8.73	9.53	9.22	9.52	8.78	9.10	9.17	9.20	9.18	8.69
Phe	5.67	6.06	6.47	6.02	6.39	6.12	6.36	6.03	6.57	6.42	6.28	6.36	5.91
Lys	8.12	13.40	10.70	9.29	8.86	9.46	9.44	12.90	11.30	11.40	10.00	10.70	9.68
AA	24.49	22.28	24.98	27.22	21.39	21.39	21.91	20.98	21.66	20.51	23.11	21.45	27.01
BA	16.00	22.69	19.05	17.19	17.56	18.54	17.63	22.48	20.09	20.38	18.67	19.30	18.01
NPA	43.03	39.63	40.91	41.12	44.56	42.46	44.64	41.31	43.04	44.11	43.32	44.54	40.61
PA	56.97	60.37	59.09	58.88	55.44	57.54	55.36	58.69	56.94	55.89	56.68	55.46	59.39
B/A	0.65	1.02	0.76	0.63	0.82	0.87	0.80	1.07	0.93	0.99	0.81	0.90	0.67

NE: no EDTA (sans EDTA ajouté); E: EDTA (avec EDTA ajouté). AA: acidic amino acids (*acides aminés acides*): Asp, Glu. BA: basic amino acids (*acides aminés basiques*): Arg, Lys, His. NPA: non-polar amino acids (*acides aminés non polaires*): Ala, Leu, Ile, Phe, Pro, Met, Val. PA: polar amino acids (*acides aminés polaires*): Arg, Lys, His, Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr. B/A: basic/acid.

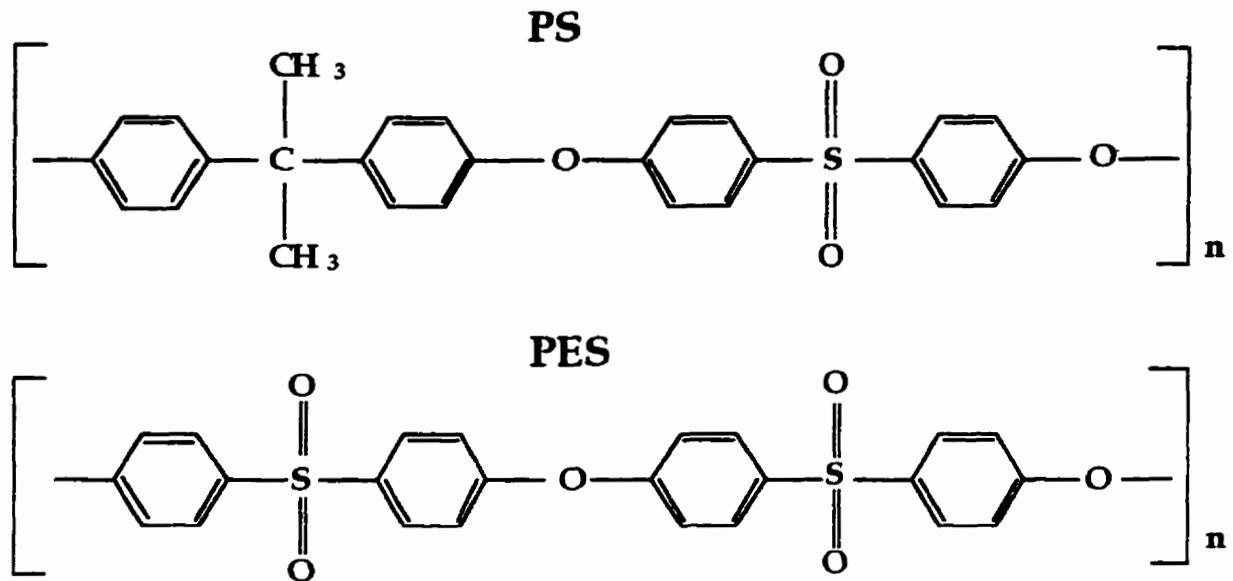


Figure 3.1 Comparison of chemical structure of polysulfone (PS) and polyethersulfone (PES) (adapted from Kai *et al.*, 1985).
*Comparaison des structures chimiques du polysulfone (PS) et du polyéthersulfone (PES) (d'après Kai *et al.*, 1985).*

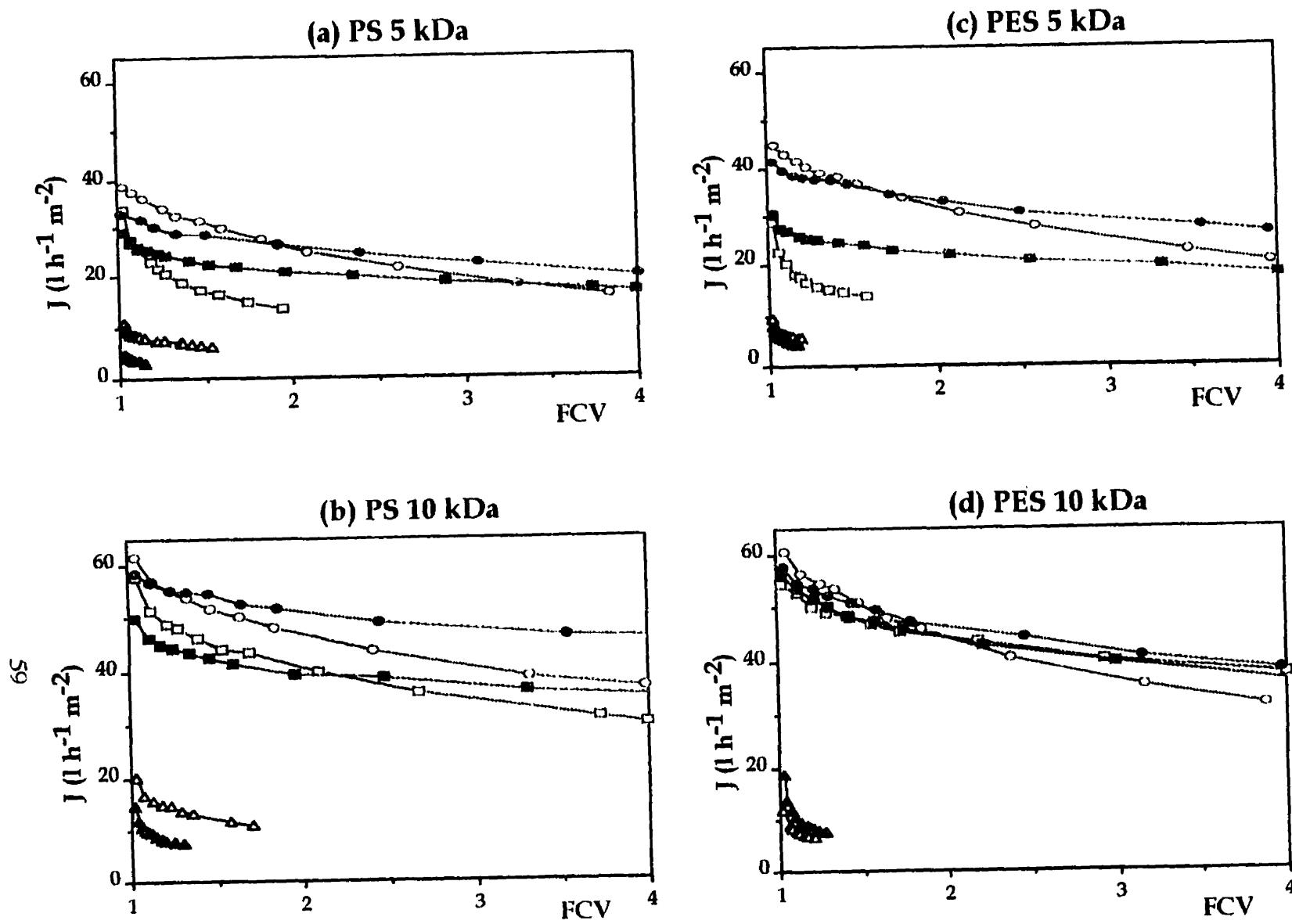


Figure 3.2 Permeation flux with increasing volumic concentration factor: a. PS 5 kDa ($J_w: 173 \text{ l h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). b. PS 10 kDa ($J_w: 233 \text{ l h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). c. PES 5 kDa ($J_w: 184 \text{ l h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). d. PES 10 kDa ($J_w: 287 \text{ l h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). ◇ pH 6.0; □ pH 8.0; ○ pH 10.0. Open symbols, 0 mmol l^{-1} EDTA; closed symbols, 20 mmol l^{-1} EDTA.

Flux de perméation suivant l'augmentation du facteur de concentration volumique: a. PS 5 kDa ($J_w: 173 \text{ l h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). b. PS 10 kDa ($J_w: 233 \text{ l h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). c. PES 5 kDa ($J_w: 184 \text{ l h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). d. PES 10 kDa ($J_w: 287 \text{ l h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). ◇ pH 6.0; □ pH 8.0; ○ pH 10.0. Symboles ouverts: 0 mmol l^{-1} EDTA; symboles fermés: 20 mmol l^{-1} EDTA.

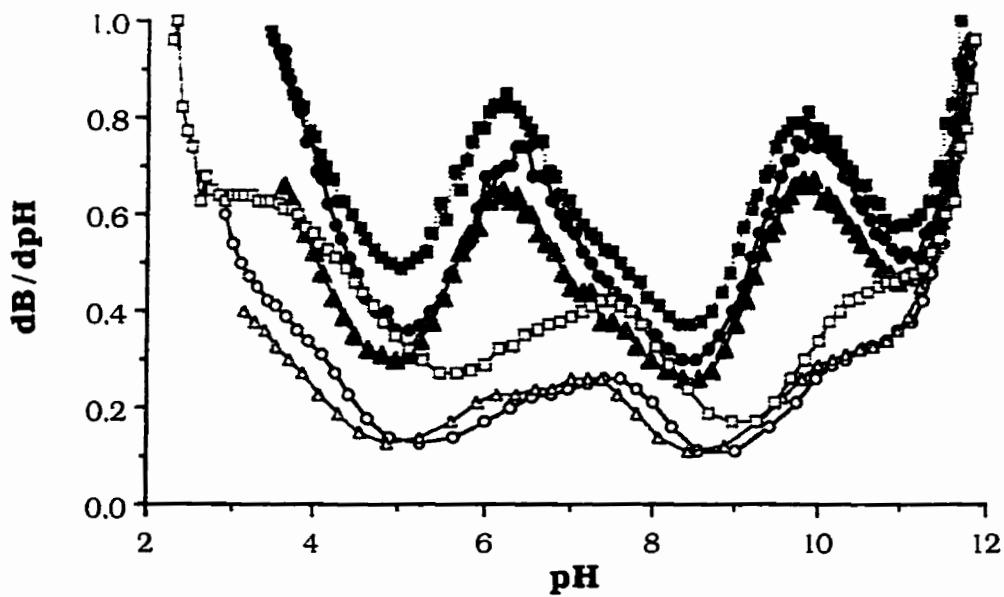


Figure 3.3 Titration curves of TH and permeates obtained at pH 8.0 with or without added EDTA, for PS and PES: □ TH; ○ PS; Δ PES.

Open symbols, 0 mmol L^{-1} EDTA ; closed symbols, 20 mmol L^{-1} EDTA.

Courbes de titration de l'hydrolysat total (HT) et des perméats obtenus à pH 8,0 avec et sans EDTA ajouté, pour les membranes PS et PES: □ HT; ○ PS; Δ PES.

Symboles ouverts: 0 mmol L^{-1} EDTA ; symboles fermés: 20 mmol L^{-1} EDTA.

Chapitre 4

CHARACTERIZATION OF ADSORPTIVE FOULING ON ULTRAFILTRATION MEMBRANES BY PEPTIDES MIXTURES USING CONTACT ANGLE MEASUREMENTS

Publié dans la revue Journal of Membrane Science (1994) 97, 283-289.

ABSTRACT

Severe protein fouling is usually encountered during the ultrafiltration of enzymatic hydrolysates from casein on polysulfone membranes. Previous work on the effect of physico-chemical parameters on the flux decline during ultrafiltration suggested that the adsorption of peptides onto the membrane material is responsible for the early stages of fouling and also strongly affect the subsequent evolution of flux. In the present work, surface energy parameters of polysulfone (PS) and polyethersulfone (PES) membranes were determined from advancing contact angle measurements with three different solvents on hydrated membranes. Changes in membrane surface energetics upon adsorption of components from casein hydrolysates were measured. Adsorption experiments were performed at three pH levels (6.0, 8.0, and 10.0), with and without EDTA. The non-polar contribution to surface energy was slightly lower for PES than PS. Both materials were highly monopolar, exhibiting a strong electron donor component. The interfacial pressure associated with peptide adsorption was higher for PS than PES, suggesting a higher tendency to peptide adsorption on PS. Interfacial pressure decreased with increasing pH during adsorption on PS, while the reverse trend was observed for PES. The addition of EDTA had very slight effects on the interfacial pressure values of PES, but it reduced that of PS at pH lower than 10.0. Water molecules in the hydration layer showed a high degree of orientation (>85%) for both membranes, suggesting strong entropic contribution to the adsorption of peptides on PS and PES.

RÉSUMÉ

L'encrassement sévère des membranes est un facteur limitant lors de l'ultrafiltration des hydrolysats enzymatiques de caséines sur des membranes de polysulfone. Des travaux antérieurs mettant en évidence l'effet de paramètres physico-chimiques sur la chute du flux de perméation suggéraient que l'adsorption de peptides sur le matériau membranaire amorce l'encrassement, affectant ainsi l'évolution du flux en cours de filtration. Les travaux actuels ont permis de déterminer les paramètres d'énergie de surface des membranes de polysulfone (PS) et de polyéthersulfone (PES) hydratées, par la mesure d'angles de contact à l'aide de trois solvants distincts. Des changements dans l'énergie de surface des membranes ont été mesurés suite à l'adsorption des composantes de l'hydrolysat caséique. L'adsorption a été effectuée à trois pH (6,0, 8,0 et 10,0), avec et sans EDTA ajouté. La contribution non polaire de l'énergie de surface était légèrement plus basse pour le PES comparativement au PS. La pression interfaciale associée à l'adsorption de peptides était supérieure pour le PS, suggérant une tendance à l'adsorption plus importante sur le PS. La pression interfaciale diminuait avec l'augmentation du pH durant l'adsorption sur le PS alors que l'inverse était observé avec le PES. L'ajout d'EDTA présentait un très faible effet sur la pression interfaciale avec le PES, mais réduisait par contre celle du PS pour les valeurs de pH inférieures à 10,0. Les molécules d'eau de la couche d'hydratation montraient un degré d'orientation élevé (> 85%) pour les deux membranes, suggérant une forte contribution entropique à l'adsorption de peptides sur le PS et le PES.

INTRODUCTION

Polysulfone ultrafiltration membranes are widely used in dairy processing for the recovery of protein from milk and whey (Marshall and Harper, 1988). PS membranes have been successfully used for the fractionation of whey protein hydrolysates but during ultrafiltration of casein hydrolysates severe flux decline was observed, leading to a very low permeation flux (Pouliot and Gauthier, 1990). These results suggested that the adsorption of peptides onto the membrane material was responsible for the early stages of fouling and also strongly affected the evolution of the flux decline. A subsequent study (Pouliot *et al*, 1993) on ultrafiltration of casein hydrolysates using PS material showed possible repulsion between the membrane surface and the charged peptides. According to Cheryan (1986) two surface-related phenomena contribute to the nature and importance of fouling: (1) the membrane surface properties and (2) the physico-chemical state of the feed solutes determining the diffusion properties of the molecules at the interface.

Surface properties can be characterized by means of advancing contact angle measurements with three different solvents on hydrated membranes. Contact angle values are related to the surface energy parameters through the Young equation (Zisman, 1964). Development of this approach for hydrated biological materials allowed measurement of the short-range polar (AB) contribution as well as the long-range non-polar (LW) contribution to the surface energy (van Oss *et al*, 1986a). The polar contribution can be further characterized into its electron donor and electron acceptor components (van Oss *et al*, 1986b).

Determination of surface energy parameters on hydrated biological materials have been used to improve understanding of various phenomena such as protein solubility (van Oss *et al*, 1986b), milk deposit formation in heat exchangers

(Britten *et al*, 1988), milk protein interactions (Britten *et al*, 1989), formation and stability of milk protein-stabilized emulsions (Britten and Giroux, 1993), and surface properties of filtration membranes (Capannelli *et al*, 1990; Zhang and Hallstrom, 1990).

The objective of the present study was to characterize the surface properties of two membrane materials, PS and polyethersulfone (PES). These materials present differences in their chemical composition while being the same class of polymers (Figure 4.1) (Kai *et al*, 1985). PS contains a dimethyl group and one sulfonated group per repeating unit and PES only contains sulfonated groups. The contact angle measurements were performed on the clean membranes and after static fouling with casein hydrolysates. Our previous studies (Pouliot and Gauthier, 1990; Pouliot *et al*, 1993) have shown that adjustment of pH level and addition of a calcium-sequestering agent both modified the flux decline and the rejection properties of PS membranes upon ultrafiltration of casein hydrolysates. Therefore the effect of pH (6,0 , 8,0 , 10,0) and EDTA (20 mmol l⁻¹) on the energetics of adsorptive fouling was also studied.

THEORY

The contact angle of a liquid drop is related to the surface energy parameters of both the liquid and the surface through the extended Young equation (van Oss and Good, 1988):

$$1 + \cos \theta = (2/\gamma_L^{\text{TOT}}) [(\gamma_S^{\text{LW}} \gamma_L^{\text{LW}})^{1/2} + (\gamma_S^+ \gamma_L^-)^{1/2} + (\gamma_S^- \gamma_L^+)^{1/2}] \quad (4.1)$$

where θ is the advancing contact angle and γ the surface energy. Subscript L refers to the liquid and subscript S to the surface. Superscripts LW, +, and - refer, respectively, to the Lifshitz-van der Waals (non-polar), electron acceptor, and electron donor contributions to the surface energy, while TOT refers to the total surface energy. The experimentally measured contact angle and the energy parameters of a liquid can be substituted in Equation 4.1 to produce an equation with three unknowns (γ_S^{LW} , γ_S^+ and γ_S^-) which correspond to the surface energy parameters of the surface (clean or fouled membrane). Using three liquids (Table 4.1) (van Oss, 1989; van Oss *et al*, 1987), three equations are produced, and solved to determine the surface energy parameters. The short-range polar contribution to surface energy (γ^{AB}) is calculated from the γ^+ and γ^- components according to the method of van Oss and Good (1988):

$$\gamma_S^{\text{AB}} = 2(\gamma_S^+ \gamma_S^-)^{1/2} \quad (4.2)$$

The degree of orientation of water molecules in the hydration layer is estimated by the percentage decrease in γ^{AB} of the hydrated surface relative to γ^{AB} of bulk water ($\gamma^{\text{AB}}(\text{water}) = 51 \text{ mJ m}^{-2}$) (van Oss and Good, 1988):

$$\text{Orientation (\%)} = 100 (\gamma_3^{\text{AB}} - \gamma_1^{\text{AB}})/\gamma_3^{\text{AB}} \quad (4.3)$$

where the subscripts 1 and 3 respectively refer to the membrane and water, respectively.

From the surface energy parameters, the total interfacial energy (γ_{13}^{TOT}) between the membrane and water is calculated according to van Oss *et al* (1986b),

$$\gamma_{13}^{\text{LW}} = [(\gamma_1^{\text{LW}})^{1/2} - (\gamma_3^{\text{LW}})^{1/2}]^2 \quad (4.4)$$

$$\gamma_{13}^{\text{AB}} = 2[(\gamma_1^+ + \gamma_1^-)^{1/2} + (\gamma_3^+ + \gamma_3^-)^{1/2} - (\gamma_1^+ + \gamma_3^-)^{1/2} - (\gamma_1^- + \gamma_3^+)^{1/2}]. \quad (4.5)$$

and

$$\gamma_{13}^{\text{TOT}} = \gamma_{13}^{\text{LW}} + \gamma_{13}^{\text{AB}} \quad (4.6)$$

Adsorptive phenomena such as static fouling usually reduce the interfacial energy between the membrane and water. By analogy to liquid interfaces (Adamson, 1982), the surface pressure (π) corresponding to the change of interfacial energy associated to peptide adsorption can be defined by:

$$\pi = \gamma_{13}^{\text{TOT}} \text{ clean membrane} - \gamma_{13}^{\text{TOT}} \text{ fouled membrane} \quad (4.7)$$

MATERIALS AND METHODS

Membranes

PS (Iris UF3026) and PES (Iris UF3028) flat sheet membranes (0.02 m^2) were obtained from Tech-Sep (Rhône-Poulenc, France) and were conditioned at 50°C as follows, using distilled deionized water: 10-min rinsing (once flow through), 30-min recirculation with a 0.3% NaOH solution followed by a 0.6% H₃PO₄ solution; a 15-min rinse with distilled deionized water was done after each chemical cycle. The membranes were further cut into $3.5 \times 4\text{ cm}$ pieces on which static adsorption was studied.

Preparation of the hydrolysate

Commercial sodium caseinate (ICN Chemicals, Cleveland, OH) was reconstituted to 3.5% (w/v, protein basis) and hydrolyzed using trypsin (Type III-S) from bovine pancreas (Sigma Cemical Co, St-Louis, MO). Hydrolysis conditions were: pH 8.0, temperature 40°C , ratio enzyme:substrate 1:200. The hydrolysis was carried out for 45 minutes and the pH was maintained by addition of 4 N NaOH, using a portable pHmeter (MDL 119 LCD, Fisher). The mixture was then pumped into a hollow fiber module; the hydrolysis products were separated from the enzyme and non hydrolyzed casein by the use of a 30 kDa cut-off membrane (HF 1-43-PM30, Romicon, Woburn, MA) and the reaction mixture was concentrated $3 \times$ and diafiltered 2 \times . The permeate was then freeze-dried, constituting the hydrolysate used for the present study.

Static fouling

The hydrolysate was solubilized in distilled deionized water at 1.65% (w/v) total solids (the solution was prefiltered on a Whatman No 4). Whenever required, 20 mmol l⁻¹ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, S311-500, Fisher Scientific, Ontario) was added. The pH of the solution was adjusted to 6.0, 8.0 or 10.0 using 4 N and/or 1 N HCl or NaOH, using a Corning pHmeter (model 140, Medfield, MA). Conditioned membranes were soaked for 20 h at 22°C in 100 ml solution.

Contact angle measurements

Clean and fouled membranes were rinsed in 1 l Modulab water and carefully placed over a two-side adhesive tape in order to prevent the sides of the membrane to roll up. Microsyringes provided with square-cut Teflon tips were used to place drops of Modulab water, α -bromonaphthalene, or dimethyl sulfoxide (DMSO) (Aldrich Chemical Co Inc, Milwaukee, WI) on the surface of the clean or fouled membranes. The contact angle was measured within 5 s using a goniometer in conjunction with a 100 \times telescope (Gaertner Scientific Corp, Chicago, IL). Contact angles of new drops deposited on fresh sites of the material were measured at intervals of 5 min. Contact angles were plotted as a function of time to determine the plateau values for the three liquids used. These plateau values were identified as the thermodynamically significant contact angle of hydrated surface (van Oss *et al*, 1975) and were used for further calculations.

Statistical analysis

The samples were prepared in triplicate according to a completely randomized design. Analysis of variance and contrasts were used to determine if the factors (membrane material, pH, and EDTA) and their interaction had a significant effect on measured properties (SAS Institute, 1989), namely, interfacial interactions,

monopolarity, and orientation of water molecules. (Statistical analyses were performed at $\alpha = 0.05$.)

RESULTS AND DISCUSSION

Surface energetics of clean membranes

Surface energy parameters were determined on clean hydrated membranes (Table 4.2). Both membranes (PS and PES) showed monopolar character with low electron acceptor (γ^+) and high electron donor (γ^-) contributions. The ratio γ^-/γ^+ which indicates the degree of monopolarity was nearly two times higher for PES than for PS. This could be explained by the larger amount of sulfonated groups (SO_2) in the PES polymer, thus having high surface density of negative charges (Figure 4.1). The non-polar contribution (LW) was higher for PS (38.16 mJ m^{-2}) than PES (36.59 mJ m^{-2}), again as a result of methyl groups in the PS structure. The PES membrane showed lower interfacial energy with water than PS ($\gamma_{13} = -1.09 \text{ vs } 2.84 \text{ mJ m}^{-2}$) which is associated with stronger hydrophilicity.

As a consequence of strong monopolarity, water molecules in the hydration layer were highly oriented on both membranes (average degree of orientation: 85%). These results confirm the strong tendency of PS and PES to adsorb molecules, since a high degree of orientation is indicative of an entropically unstable hydration layer.

Capannelli *et al* (1990) showed that a good correlation exists between the results of contact angle measurements (captive bubble technique) and anti-fouling properties of modified PS and PVDF membranes. A higher degree of hydrophilicity (low values of contact angle) resulted in an improvement of the membrane performance with regard to whey protein ultrafiltration in terms of relative flux and flux recovery. The methodology described in the present study allows the characterization of interface energetics in more detail, by providing the values of polar and non-polar contributions of all phases involved.

Change of surface properties after static adsorption

Adsorption of solutes onto membrane material induces changes in surface energy properties. These changes have been measured on membranes fouled with hydrolysate solution adjusted to various pH levels. The effect of adding EDTA to the hydrolysate solution was also studied. The surface properties of fouled membranes are presented in Table 4.3. As a general trend, adsorption of casein peptides increased both the electron donor and electron acceptor contribution of the surface energy indicating an increase in dipole concentration at the surface of the newly formed membrane.

The degree of orientation of water molecules in the hydration layer of both membranes was reduced upon peptides adsorption. Strong orientation of water molecules in the hydration layer is associated with low or negative entropy and is thermodynamically unstable. The orientation in the hydration layer is considered as an entropic factor which encourages solute adsorption (e.g., lysine) in order to increase the entropy of the water molecules in contact with the membrane. The decrease in the degree of orientation was more important on PES than on PS membranes, averaging 45,7% for PS and 20,6% for PES. The conformation of casein peptides adsorbed onto PES membranes considerably reduced the orientation of the hydration layer and consequently reduced the entropy-driven force which promotes further adsorption. The non-polar contribution (LW) of surface energy decreased upon solute adsorption confirming that non-polar interacting sites were involved in the adsorption process.

The adsorption of solutes at the interface contributes to reduce the interfacial energy. The change in interfacial energy is related to the solute adsorption and rearrangement. The change in interfacial energy (surface pressure π) associated with the adsorption the solutes was calculated from clean and fouled membranes

properties. The surface pressure developed at the membrane surface was used as an adsorption index, and the results are presented in Table 4.4.

Surface pressure was generally lower on PES than on PS membranes suggesting that smaller amounts of casein peptides were adsorbed onto PES compared to PS. Considering the important changes in surface properties following adsorption onto the PES membrane (Table 4.3) it assumed that a very small amount of adsorbed peptides is required to induce drastic changes in the surface properties. Increasing the pH of the hydrolysate solution increased the surface pressure on the PES membranes and suggests the adsorption of a larger amount of peptides. Addition of EDTA did not influence the surface pressure on the PES membranes. The surface pressure on the PS membrane was lowered by addition of EDTA at pH lower than 10.0, while at pH 10.0 it had no effect. The effect of pH was unexpected since it has been shown that the best permeation fluxes were observed during ultrafiltration of casein peptides at pH 10.0 (Gourley *et al*, 1995). A high surface pressure value is indicative of drastic changes of membrane surface properties upon adsorption and can either result from a quantitatively important fouling or from the distinctive chemical properties of the adsorbed layer from that of the membrane. It can also be suggested that the increase of pH to 10.0 did not affect the adsorption phase but did influence the growing phase of the fouling layer.

CONCLUSION

The determination of surface energy parameters on hydrated membranes suggests that PS and PES are highly monopolar (strongly oriented hydration layer) materials which favours solute adsorption mainly because of the low entropy of the hydration layer.

Adsorption of casein peptides induced changes in surface energy properties. Hydrophobic interactions occurred while an increase in dipole concentration was observed at the surface. Differences in surface pressure observed between PS and PES suggest that peptides adopt different conformations on the two materials.

The development of hydrophilic non-interactive membranes should reduce the problems of protein adsorption to a large extent even though hydrophobicity is not the only factor involved (van der Horst and Hanemaaijer, 1990).

Thus, hydrophilic materials presenting a lower degree of orientation in the hydration layer (increased γ^+) would probably reduce adsorption of solutes on the membranes.

REFERENCES

- Adamson AW (1982) Surface films on liquid substrates *In: Physical chemistry of surfaces*. John Wiley & Sons 4th ed., New York, 100
- Britten M, Green ML, Boulet M, Paquin P (1988) Deposit formation on heated surfaces: effect of interface energetics. *J Dairy Res* 55, 551-562
- Britten M, Boulet M, Paquin P (1989) Estimation of casein micelles' surface energy by means of contact angle measurements. *J Dairy Res* 56, 223-234
- Britten M, Giroux HJ (1993) Interfacial properties of milk protein-stabilized emulsions as influenced by protein concentration. *J Agricultural & Food Chem* 41, 1187-1191
- Capannelli G, Bottino A, Gekas V, Trägårdh G (1990) Protein fouling behaviour of ultrafiltration membranes prepared with varying degrees of hydrophilicity. *Process Biochem International* 25, 221-224
- Cheryan M (1986) Ultrafiltration handbook. Technomic Publ Co, Lancaster, PA, USA 374p
- Gourley L, Gauthier SF, Pouliot Y (1995) Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied. *Lait* 75, 259-269
- Kai M, Ishii K, Tsugaya H, Miyano T (1985) Development of polyethersulfone ultrafiltration membranes *In: Reverse osmosis and ultrafiltration* (Sourirajan S, Matsuura T, eds) Am Chem Society, Washington, DC, 21-33

Marshall KR, Harper WJ (1988) Whey protein concentrates. *IDF Bulletin* 233, 21-32

Pouliot Y, Gauthier SF (1990) *Effect of selected physico-chemical parameters on the flux decline of casein hydrolysate on polysulfone ultrafiltration membranes.* Proc. ICOM'90, August 20-24, Chicago, IL, 273-275

Pouliot Y, Gauthier SF, Bard C (1993) Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes. *J Membrane Sci* 80, 257-264

SAS Institute (1989) SAS/Stat User's guide, version 6, 4th ed., Cary, NC

van der Horst HC, Hanemaaijer JH (1990) Cross-flow microfiltration in the food industry. State of the art. *Desalination* 77, 235-258

van Oss CJ, Gilman CF, Neumann AW (1975) The contact angle method *In:* *Phagocytic engulfment and cell adhesiveness as cellular surface phenomena* (Dekker M, ed) New York, 7

van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK (1986a) The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces. *J Colloid Interface Sci* 111, 378-390

van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK (1986b) Solubility of proteins. *J Protein Chem* 5, 385-405

van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK (1987) Mechanism of DNA (Southern) and protein (Western) blotting on cellulose nitrate and other membranes, *J Chromatogr* 391, 53-65

van Oss CJ, Good RJ (1988) Orientation of water molecules of hydration of human serum albumin. *J Protein Chem* 7, 179-183

van Oss CJ (1989) On the mechanism of the cold ethanol precipitation method of plasma protein fractionation. *J Protein Chem* 8, 661-668

Zhang W, Hallstrom B (1990) Membrane characterization using the contact angle technique: I. Methodology of the captive bubble technique. *Desalination* 79, 1-12

Zisman WA (1964) Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution In: *Contact angle, wettability and adhesion*. Advances in Chemistry Series 43, Am. Chem. Society, Washington, DC, 1-51

Table 4.1 Surface tension components of water, DMSO and α -bromonaphthalene (mJ m^{-2}).

Composantes de la tension de surface de l'eau, du DMSO et de l' α -bromonaphthalène (mJ m^{-2}).

<i>Solvent</i>	γ^{TOT}	γ^{LW}	γ^+	γ^-	<i>Reference</i>
Water	72.8	21.8	25.5	25.5	van Oss (1989)
DMSO	44.0	44.0	0	30.0	van Oss <i>et al</i> (1987)
α -bromonaphthalene	44.4	43.6	0.4	0.4	van Oss <i>et al</i> (1987)

Table 4.2 Energetic characteristics of clean membranes (mJ m^{-2})
Caractéristiques énergétiques des membranes propres (mJ m^{-2}).

<i>Parameter</i>	<i>Polysulfone</i>	<i>Polyethersulfone</i>
γ^+	0.64	0.43
γ^-	24.87	29.06
γ^- / γ^+	38.90	67.60
γ^{LW}	38.16	36.59
γ_{13}	2.84	-1.09
Orientation of water molecules (%)	84.52	86.16

Table 4.3 Surface properties upon static adsorption of peptides under different physico-chemical conditions: polar and non-polar contributions ($mJ m^{-2}$) and orientation of water molecules (%).
Propriétés de surface suite à l'adsorption statique des peptides sous différentes conditions physico-chimiques: contributions polaires et non polaire ($mJ m^{-2}$) et orientation des molécules d'eau (%).

Contribution	pH	Polysulfone		Polyethersulfone	
		no EDTA	EDTA	no EDTA	EDTA
Polar (AB)					
Positive (γ^+)	6	1.80	3.56	9.09	9.31
	8	1.04	6.61	8.18	6.59
	10	4.53	4.44	5.44	5.36
	Negative (γ^-)	63.7	59.3	55.6	56.5
		57.9	56.0	55.6	56.9
		56.1	58.3	57.9	58.7
Non-polar (LW)	6	21.4	20.2	16.0	15.8
	8	24.1	18.8	17.1	19.4
	10	21.8	22.7	21.2	21.6
Orientation (%)	6	59.9	44.8	12.0	10.1
	8	69.9	24.6	16.4	24.2
	10	37.6	37.3	30.5	30.6

Table 4.4 Surface pressure developped upon adsorption of casein peptides
Pression de surface développée suite à l'adsorption des peptides caséiques.

<i>pH</i>	<i>Polysulfone</i>		<i>Polyethersulfone</i>	
	no EDTA	EDTA	no EDTA	EDTA
6.0	24.97	19.87	8.30	8.29
8.0	23.45	14.77	9.16	11.22
10.0	17.09	18.06	12.81	13.20

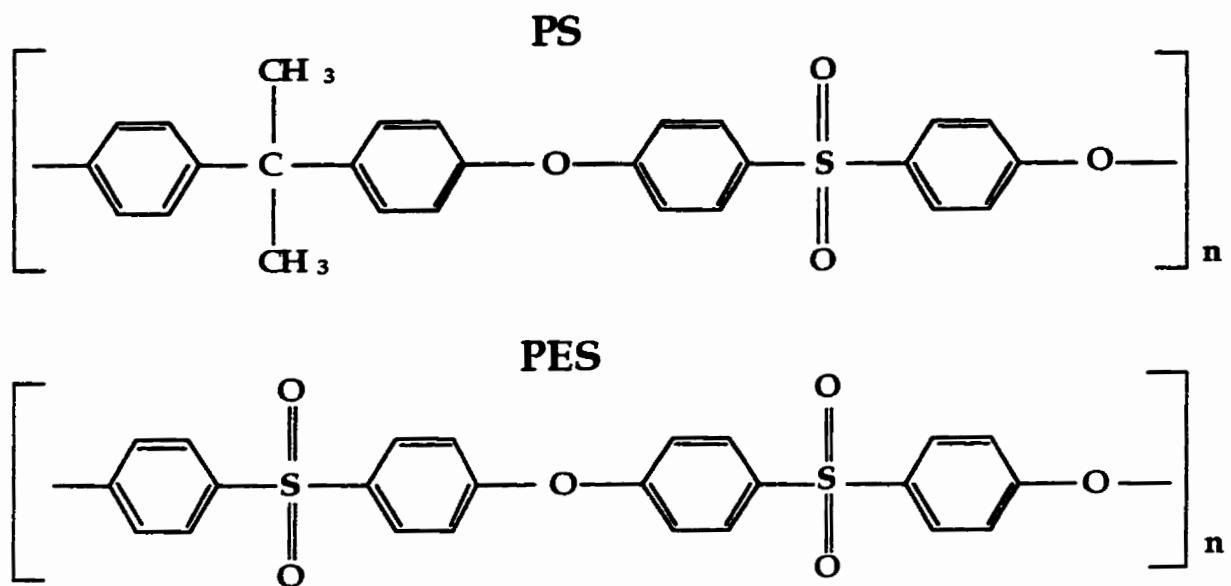


Figure 4.1 Chemical structure of polysulfone (PS) and polyethersulfone (PES).
Structures chimiques du polysulfone (PS) et du polyéthersulfone (PES).

Chapitre 5

IDENTIFICATION OF CASEIN PEPTIDES INTERACTING WITH POLYSULFONE ULTRAFILTRATION MEMBRANES

Ce chapitre sera soumis, sous la forme d'article scientifique, à la revue le Lait (1997).

ABSTRACT

Polysulfone (PSf) ultrafiltration membranes can be used for the fractionation of casein hydrolysates. However, the major limiting factor of this application remains the important permeation flux decline encountered during filtration. Previous studies showed that peptide-membrane interactions could affect both the flux decline and specific rejection properties of PSf. A subsequent study showed that static adsorption of casein hydrolysate on PSf modifies the surface energy parameters of the membrane. Therefore, static adsorption experiments were conducted in order to identify the adsorbed peptides which would initiate fouling of PSf membranes. The adsorption was performed under different physico-chemical conditions, namely pH 6.0, 8.0, and 10.0, without or with addition of EDTA, followed by acidic and basic desorption of adsorbed material. Membranes of 50 kDa (MMCO) were chosen in order to minimize the effect of steric exclusion. The material collected from desorption experiments was referred to as adsorbed peptides and were analyzed by one-line RP-HPLC/mass spectrometer. The modification of physico-chemical conditions (pH/EDTA) of the solution did not influence the adsorption profile of the peptides to a large extent. However, the balance size/hydrophobicity/charge of the peptides reflected more their adsorption behaviour in terms of attractive or repulsive interactions with the membrane. Thus, the peptides were classified in three groups according to these characteristics: I) hydrophobic peptides presenting high affinity with the membrane ($\alpha \geq 1.25$); II) peptides presenting no specificity between total hydrolysate and membrane ($0.75 < \alpha < 1.25$), and III) peptides excluded from the membrane ($0.75 \leq \alpha$) which were classified as acidic, neutral, and basic peptides.

RÉSUMÉ

Les membranes d'ultrafiltration de polysulfone (PSf) peuvent être utilisées pour le fractionnement d'hydrolysats caséiques. Cependant, cette application est limitée par la chute importante des flux de perméation observée durant la filtration. Des études préliminaires ont démontré que des interactions peptide-membrane pouvaient affecter la chute du flux de perméation et les propriétés de rejet du PSf. Une étude subséquente montrait que l'adsorption statique d'un hydrolysat de caséine modifie les paramètres énergétiques de la surface membranaire. Des travaux sur l'adsorption statique ont donc été menés afin d'identifier les peptides adsorbés pouvant initier l'encrassement des membranes de PSf. L'adsorption a été effectuée sous les conditions physico-chimiques suivantes: pH 6,0, 8,0 et 10,0, avec ou sans l'ajout d'EDTA, suivi d'une désorption acide et basique du matériel adsorbé. Des membranes de 50 kDa ont été choisies de façon à minimiser l'effet d'exclusion stérique. Les peptides adsorbés, recueillis de la désorption, ont été analysés par couplage RP-HPLC/spectromètre de masse. La modification des conditions physico-chimiques (pH/EDTA) de la solution a eu peu d'effet sur le profil d'adsorption des peptides. Par contre, la balance taille/hydrophobicité/charge des peptides influençait leur adsorption via des interactions attractives ou répulsives avec la membrane. Les peptides ont donc été classifiés en trois groupes selon ces caractéristiques, afin d'expliquer leur affinité pour la membrane.

INTRODUCTION

Polysulfone ultrafiltration (UF) membranes are widely used in the dairy industry for the processing of whey (Marshall and Harper, 1988) and for the pre-concentration of milk prior to cheese manufacture (Renner and Abd El-Salam, 1991). These membranes can also be used for the fractionation of casein hydrolysates (Brûlé *et al*, 1980; Pouliot *et al*, 1993; Lahl and Braun, 1994). However, membrane fouling constitutes the major limiting factor of this application. Previous work showed important permeation flux declines during the ultrafiltration of casein hydrolysates (Pouliot and Gauthier, 1990; Pouliot *et al*, 1993; Gourley *et al*, 1995). It was first hypothesized that peptides-membrane interactions could explain the low permeation flux values and the specific retractive properties of polysulfone (PSf) for charged and hydroxylated amino acids. A subsequent study on the effect of static adsorption on the surface properties of PSf by means of contact angle measurements (Gourley *et al*, 1994) showed that adsorption of casein peptides onto PSf membranes induced changes in surface energy parameters of the membranes. Specifically, it was found that the high degree of orientation of water molecules at the surface of polysulfone membranes leads to an unstable hydration layer which promotes adsorption. It was found that static adsorption increased the dipole concentration at the surface of the newly formed membrane. In addition, it was suggested that adsorption would involve hydrophobic interactions between polysulfone and peptidic material.

It is generally accepted that specific interactions can occur between components of the solutions and the membrane materials, leading to the modification of the surface of the filtration membrane. It is known that interactions of proteins at interfaces lead to modification of the properties of the surfaces, and alter also physico-chemical and biological properties of the molecules (Horbett and Brash,

1995). In membrane system, such interactions are typically referred to as membrane fouling. Different approaches can be used in order to characterize membrane fouling. The classical approach remains the widely used method of determining the selectivity of the membranes by measuring permeation fluxes and transmission of solutes (Meireles *et al*, 1991; Palecek and Zydny, 1994; Pouliot *et al*, 1994; Gourley *et al*, 1995; Bouhallab and Henry, 1995). Alternative methods are based on contact angle measurements on clean and fouled membranes (Gourley *et al*, 1994), or on the determination of partition coefficients of the molecules on the membrane material by liquid chromatography (LC and HPLC) (Brink and Romijn, 1990; Tam *et al*, 1991). The use of other methods like microscopy (Fritzsche *et al*, 1992) provide information on the extent of fouling by measuring the changes in morphology of the surfaces.

However, these methods usually provide indirect informations concerning the interactions and are complementary to the identification of adsorbed material from complex solutions. Thus, the aim of the present study was to identify the casein peptides adsorbed onto the PSf material in order to determine the nature of the interactions occurring between PSf membranes and the peptidic components of a casein hydrolysate. The adsorption was performed under different physico-chemical conditions, namely pH 6.0, 8.0, and 10.0, with or without addition of EDTA, followed by acidic and basic desorption of adsorbed material. Membranes of 50 kDa (MMCO) were chosen in order to minimize the effect of steric exclusion, since adsorption can modify the pore size of sieving membranes (Meireles *et al*, 1991; Mochizuki and Zydny, 1992; Brink *et al*, 1993; Bouhallab and Henry, 1995). The material collected from desorption experiments was referred to as adsorbed peptides and were analyzed by one-line RP-HPLC/mass spectrometer.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the total hydrolysate from casein

Commercial sodium caseinate (ICN Chemicals, Cleveland, OH, USA) was hydrolyzed as previously reported by Gourley *et al* (1995) using trypsin (Type III-S) from bovine pancreas (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA). The reaction was stopped by ultrafiltration of the reaction mixture using a 30 kDa cut-off membrane, and the permeate was freeze-dried, constituting the casein total hydrolysate (TH) used for the present study.

Conditioning of polysulfone membranes

A plate-and-frame Rayflow 2x100 module (Tech-Sep, Rhône-Poulenc, Miribel, France) equipped with a variable rotary vane pump (model 7116, Cole-Parmer Instrument Company, Chicago, IL, USA) and a temperature-controlled water bath ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) was used for conditioning the membranes. Polysulfone (PSf) flat sheet membranes obtained from Osmonics (Minnetonka, MN, USA) were conditioned at 50°C by a 10-min rinsing (once flow through), a 30-min recirculation of 0.3% NaOH, a 15-min rinsing, a 30-min recirculation of 0.3% HCOOH, and a final 15-min rinse. Distilled deionized water was used throughout the experiment.

Adsorption and desorption of the peptides

The casein total hydrolysate (TH) was solubilized in 500 ml distilled deionized water at 1.65% total solids (w/v). Whenever required, 20 mmol l⁻¹ EDTA ([ethylenediamine]-tetraacetic acid disodium salt, Fisher Scientific, Ontario, Canada) was added, and the pH of the solution was then adjusted to 6.0 , 8.0 or 10.0 using 1% HCOOH or 5% NH₄OH.

The solution was poured in a stainless steel container where 10 PSf membrane sheets (0.2 m² of membrane surface) were placed in a support and maintained separated with rods; the solution was in contact with the PSf for 12 h. Then, the membranes were soaked in 1 l distilled deionized water in order to remove the weakly adsorbed material, and the water was discarded afterward; the pH of rinsing water was adjusted to that of the adsorption.

A sequence of acidic and basic desorption of the peptides was performed. The membranes were first soaked for 12 h in 500 ml of water at pH 3.0 (HCOOH), followed by a second soaking of 12 h in an equal volume of water at pH 11.0 (NH₄OH). The acidic and basic solutions obtained were partially evaporated with a Rotavapor in order to remove volatile compounds. A preliminary analysis by RP-HPLC revealed that the acidic and basic samples were similar in terms of peptidic peaks. Therefore, the two solutions were pooled and freeze-dried. The pooled samples containing adsorbed peptides were further analysed by RP-HPLC and mass spectrometry (LC/MS-MS).

Identification of the peptides adsorbed on PSf membranes

RP-HPLC analyses. HPLC was performed using an apparatus from Waters (625 LC System, Millipore, Waters, Milford, MA, USA) equipped with a 600E System Controller and a 911 Photodiode Array detector. The apparatus was equipped with an analytical RP column, Symmetry™ C-18 column (125 x 2.1 mm id; Waters, Milford, MA, USA). Samples were dissolved (5 mg:1 ml) in Milli Q water (Millipore, F-78051 Saint-Quentin-en-Yvelines, Fr) containing 0.2% trifluoroacetic acid (TFA; Pierce, Touzart et Matignon, Fr). Two buffers, A containing 1.06% TFA in Milli Q water and B containing 0.1% TFA and 80% acetonitrile (Merk, F-94736 Nogent sur Marne, Fr) in Milli Q water, were used for the elution. A linear gradient was performed as follows: 100% A for 5 min, 50% B in 75 min, 80% B in 10 min, 80% B for 2 min, and 100% A in 2 min. At a flow rate of 0.25 ml min⁻¹,

100 µg or 5 mmol sample was injected onto the column, maintained at 40°C, and the absorbance was measured at 214 and 280 nm. Chromatographic data were further transformed and analyzed with a 900 Series Intelligent Interface Nelson (Stang Instruments, F-93320 Les Pavillons sous Bois, Fr).

Electrospray mass spectrometry. The MS analysis of casein peptides was performed by an on-line RP-HPLC-ESI-MS. Samples were initially separated by RP-HPLC according to the elution conditions described above. Eluted peaks were detected by absorbance at 214 and 280 nm, and by total ion current (TIC). The mass spectrometer API III⁺ (Sciex, Thornhill, Canada) was a triple quadrupole MS equipped with an atmospheric pressure ionization ion source. Multiply charged peptide ions were generated by spraying the sample solution through a stainless steel capillary held at high potential. The voltage in the sprayer was usually set at 5 kV for positive ion production. A coaxial air flow along the sprayer was provided to assist liquid nebulization. The nebulizer pressure was usually adjusted in the range 0.3–0.4 MPa. For the on-line RP-HPLC-ESI-MS analysis, splitting of the liquid flow was achieved by zero-dead-volume connection, and the column effluent was diverted to the MS (15% of the effluent) and to the UV detector (85% of the effluent). This arrangement permitted a straightforward correlation of the TIC trace with the UV trace. The connection between the HPLC system and the ion source was a fused silica capillary of 75 µm id. The interface between the sprayer and the mass analyser consisted of a small conical orifice of 100 µm diam, and in our experiments the voltage was set at 70–90 V. A gas curtain formed by a continuous flow (0.8–1.2 l min⁻¹) of nitrogen in the interface region served to break up any clusters. The instrument mass-to-charge (*m/z*) scale was calibrated with propylene glycols. All peptide mass spectra were obtained from the signal averaging of multiple scans. Each scan was acquired over the range of *m/z* values from 400 to 2400 using a step size of 0.3 Da and a dwell time of 0.5 ms. Molecular masses were determined from the measured *m/z* values for the protonated molecules. Results were acquired on an

Apple Macintosh computer and processed using the software package Mac Spec 3.2 Sciex (Sciex, Thornhill, Canada).

Assignment of individual sequences from the molecular masses of peptides was based on: i) the known sequence of bovine caseins, arising from Holstein cows, whose milk contains the main genetic variants $\alpha_{s1}B$ 97%, $\alpha_{s2}A$ 100%, βA^1 53%, βA^2 45%, κA 71% and κB 29% according to Grosclaude (1988), and ii) the presence of a tryptic and/or chymotryptic cleavage site at either end of the sequence, which was considered as a precondition. Assignment of individual sequences was assisted by the use of the Mac Bio Spec data base. The maximum error between observed and calculated (theoretical) masses in our study never exceeded 0.07 %. The mass assignment was confirmed by amino acid sequence determination using tandem mass spectrometry (MS-MS) analysis.

The tandem mass spectrometry analyses were performed on an electrospray mass spectrometer API III⁺ (Sciex), a triple-quadrupole equipped with an atmospheric pressure ionization ion source. The peaks collected after two RP-HPLC separations were evaporated using a Speed-Vac concentrator (Bioblock, Paris, Fr) and solubilized in Milli Q water 60% : acetonitrile 40% : formic acid 0,1% : TFA 0.05%, and were continuously infused with a pump model 22 (Harvard Apparatus, South Natik, MA, USA) at a flow rate of 3 $\mu\text{l min}^{-1}$. Collision-assisted dissociation experiments in the collision quadrupole (Q_2) region were performed using argon with collision energies ranging from 30 to 60 eV. The product ion mass spectra were acquired by scanning the third quadrupole (Q_3) while the first (Q_1) was set for transmitting the precursor ion. Both analysing quadrupoles Q_1 and Q_3 were operated at a resolution of unit m/z ratio.

Calculations

The distribution of peptides between the bulk solution (TH) and material adsorbed onto the membrane surface was characterized using partition coefficients calculated as follows:

$$\alpha = \frac{C_m}{C_b} \quad (5.1)$$

where C_m and C_b are the proportion of peptides in the adsorbed material (m) and in TH (b) as determined by the relative surface area of peptidic peaks from chromatographic profiles obtained by RP-HPLC.

The amino acid sequences of the peptides were determined, as indicated by the MS analyses, from the following genetic variants of caseins: β A¹, α_{s1} B, α_{s2} A, and κ A, according to Swaisgood (1992). The calculation of isoelectric point and hydrophobicity of the peptides was performed with the use of a program provided by the Institut de recherche INRA (Rennes), based on Bigelow (1967) and Tanford (1962). The net charge of the peptides, at the three pH under study, was determined with the pKa values of the amino acids considering that the side chain of histidine at pH 6.0 and that of tyrosine at pH 10.0 are neutral, while the side chain of lysine is positively charged, as well as is the α -NH₃ of the peptidic chain. However, it should be considered that at pH 6.0 the His becomes partially positive, whereas at pH 10.0 Tyr is partially negative, and Lys and the α -NH₃ are partially neutral; these modifications in the net charge of the peptide can impart a different behaviour to the molecules.

Principal component analysis

Principal component analysis was performed in order to classify the peptides according to their characteristics, namely molecular mass, hydrophobicity, and charge, with SAS 6-12 software (SAS Institute Inc, Cary, NC).

RESULTS

Characterization of the total hydrolysate

The chromatographic profile (Figure 5.1) obtained from RP-HPLC analysis of the casein total hydrolysate (TH) showed the occurrence of over 80 peptidic peaks, representing 180 identified molecular masses. Therefore, only the major peaks ($OD > 0.1 \text{ AU/FS}$) were individually collected for their identification by mass spectrometry (MS/MS), and their characteristics are shown in Table 5.1. These data illustrate that the hydrolysate from casein was composed of a large range of peptides differing in molecular mass (490 to 5360 kDa), charge (-5 to +1), pI (4.1 to 10.2), and hydrophobicity (4 to 73 kcal mol⁻¹). Among the 46 identified peptides, 18 are issued from α_{s1} casein, 9 from α_{s2} casein, 14 from β casein and 5 from κ casein. The proportion of these peptides reflects the distribution of each protein among cow's milk caseins, except for the larger amount of α_{s2} casein peptides present in the TH (20% vs 11% α_{s2} casein in total caseins). Also, the peptidic sequence indicates that the trypsin (type III-S) used in this study contained also chymotrypsin; the peptides obtained were formed with a high proportion (17% N-terminal and 24% C-terminal) of chymotrypsin cleavage sites, giving the TH a different character than an hydrolysate obtained with purified trypsin.

Characterization of adsorbed peptides

Mass spectrometry analyses (LC/MS) revealed that each peptide identified in the TH, except the peptide 1-25 from β -casein (no 32), was also found in the adsorbed material under overall physico-chemical conditions studied (pH 6.0, 8.0, 10.0, with or without addition of EDTA). Therefore, a quantitative analysis based on surface area of peptidic peaks was performed in order to determine differences in the adsorbed material caused by the change in physico-chemical conditions of the

solution. Figure 5.2 illustrates the partition coefficients (α) of the peptides between bulk solution (TH) and material adsorbed onto the membrane (Equation 5.1); the peptides are numbered as in table 5.1, and presented in increasing order of hydrophobicity. A value of $\alpha = 1.00$ indicates an equal affinity of the peptide for the membrane and for the solution, $\alpha > 1.00$ suggests a stronger affinity of the peptides for the membrane surface, whereas $\alpha < 1.00$ represents peptides excluded from membrane surface.

It can be observed from Figure 5.2 that α generally increased with the hydrophobicity of the peptide. For example, the peptide no 2 was weakly adsorbed onto the membrane and possesses the lowest hydrophobic character (3.9 kcal mol⁻¹), whereas the peptide no 45 including 12 Pro and possessing the highest degree of hydrophobicity (73 kcal mol⁻¹) also presented the highest α value. The peptide no 46 (β 114-143) showed a different behaviour; this peptide contains 4 Pro and is highly hydrophobic (40.5 kcal mol⁻¹) but possessed a low α value. However, the behaviour of this peptide can be explained by the presence of several negative charges (-4) along the peptidic chain which are repulsed by the O-S-O sites onto the membrane surface. The treatments (pH/EDTA) applied to TH solution did not influence the adsorption profile to a large extent. The majority of the peptides were only slightly, but not consistently affected by the modification of the pH. For example, a few peptides (eg no 36 and 42) present an increasing α with a decrease in pH; these peptides contain both tyrosine and proline in their sequence, in addition to their acidic and hydrophobic character. The adsorption of some other peptides (no 23, 40 and 44) was affected by the combination of pH/EDTA treatments. Also, 9 of the 45 adsorbed peptides presented the same level of adsorption with all treatments, namely no 6, 12, 28, 21, 30, 27, 35, 38, and 43. Most of these peptides possess a non-polar N-terminal aminoacid and a positive charge (Lys, Arg) at the C-terminal position; seven of these peptides contain between 1 to 7 Pro.

The peptides present in the adsorbed material were therefore classified into three groups, according to their α values, namely group I corresponding to $\alpha \geq 1.25$ and referred to as adsorbed peptides, group II with $0.75 < \alpha < 1.25$ representing peptides with no specific affinity for the membrane or bulk solution, and group III with $0.75 \leq \alpha$ and referred to as excluded peptides. Peptides from groups I and III are presented in Table 5.2, namely the adsorbed and excluded peptides, in order to correlate their physico-chemical characteristics to their adsorption behaviour. The peptides from group I possess a high level of hydrophobicity (16 to 73 kcal mol⁻¹), an hydrophobic N-extremity (aliphatic side chain or phenyl ring) and a positive charge (Lys, Arg) at the C-terminal of the molecule and are globally neutral. Opposingly, the excluded peptides (group III) presented different characteristics, and were thus classified according to their charge (acidic, neutral, basic) and hydrophobicity (increasing order). The acidic peptides possessing at least two net negative charges were excluded from the membrane, even peptides having a relatively high degree of hydrophobicity (10 to 40 kcal mol⁻¹). The neutral peptides of low hydrophobicity (< 11 kcal mol⁻¹) had also weak affinity with the surface of the membrane; these molecules all present a Glu in N-terminal and a Lys in C-terminal position. Finally, the group of basic peptides excluded from the membrane surface are short positively charged molecules, with very low hydrophobicity (< 6 kcal mol⁻¹).

DISCUSSION

Two principles are to be considered as driving forces leading to adsorption of peptides, namely the free energy being negative ($\Delta G < 0$), and the size of the molecule or contactable surface area (van Oss, 1994). However, the peptides in solution can also interact with each other by hydrophobic and/or electrostatic interactions in order to minimize the free energy of the system. The adsorption onto the membrane will then only occur if peptides have a stronger affinity for PSf interface than for other peptides in TH. Therefore, the adsorption profile reflects a balance between peptide-peptide and peptide-membrane interactions.

The observation that almost all the peptides did adsorb onto the polysulfone membrane material is somewhat surprising. It was expected that the most hydrophobic peptides would specifically adsorb onto the membrane surface due to the hydrophobic character of the PSf (Kai *et al*, 1985; Brink and Romijn, 1990; Marshall and Daufin, 1995; van der Horst, 1995). However, the peptide β 114-143 (no 46) presenting a high degree of hydrophobicity (40 kcal mol⁻¹) adsorbed less than some other hydrophilic peptides. We must therefore consider that additional parameters influenced the adsorption profile. In fact, the surface of the PSf also presents negative polar sites (sulfonated groups, O-S-O) which impart a highly oriented hydration layer (Gourley *et al*, 1994), and promote adsorption in order to minimize the energy of the system. Mostly all peptides can therefore adsorb to varying degrees depending upon their hydrophobic and/or polar properties and even by the distribution of charges along the molecule, in a manner to decrease the free energy. Consequently, the transmission of the peptide into the permeate will depend on its molecular mass togetherwith low interactions with the molecules in the adsorbed layer. However, the peptide β 1-25 was not found in adsorbed material, at any pH. This peptide possesses 5 net

negative charges, a positive charge at each end of the molecule, and has 4 phosphoseryl residues (Ser-P) and only one aromatic within its chain; these characteristics give the peptide a strong polar character that could stabilize the molecule in aqueous system in addition to the repulsive effect of negative charges with electronegative sites onto the membrane. The behaviour of this peptide corresponds to the observations reported by Nau (1991), where 95% of the fragment β 1-25 was retained by a 10 kDa PSf membrane, despite its 3130 Da molecular mass.

The classification of peptides according to their adsorptive behaviour (Table 5.2) suggests that the molecules within the same class share more than one characteristic, namely molecular mass, hydrophobicity and charge. A more detailed examination of highly adsorbed species (group I) reveals that these neutral peptides have relatively high molecular masses (1268-5360 kDa) and possess hydrophobic sites along the peptidic chain, and a positively charged C-terminal amino acid (Lys, Arg) together with a non-polar amino acid at N-terminal. For example, the peptide α_2 92-113 (no 44) with a phenylalanine (N-terminal) and a lysine (C-terminal) and 8 aromatics along the 22 amino acids peptidic chain, possesses an hydrophobicity of 37 kcal mol⁻¹ and a net charge of zero. Thus, this peptide is endowed with some characteristics that can promote adsorption onto the PSf surface via aromatic (bisphenol and methyl groups) sites of the membrane material. The fragment β -CN 49-97 showed a similar adsorption profile. Daufin *et al* (1995) reported a high unexpected retention of this peptide under an electric field owing the behaviour of highly hydrophobic peptides to their molecular mass and charge, which is in agreement with our results. In addition, a study conducted by Bouhallab and Henry (1995) on the transmission of the β -CN 193-209 resulted in a reduction in adsorption rate and a significant increase in the transmission of this neutral hydrophobic peptide in the presence of a hydrophobic peptides mixture. Therefore, hydrophobic

interactions at the membrane surface and in the media are to be considered in the determination of the peptides behaviour.

Among the peptides excluded from the membrane material (Table 5.2) is a group of acidic molecules (no 20 and 46) possessing the size (1467-3469 Da) and hydrophobicity (10-40 kcal mol⁻¹) for adsorption to occur; however, they possess a net negative charge of -2 or -4 which causes repulsion with polar negative components (O-S-O) of the membrane surface. Within this group, the peptide β 114-143 (no 46) is composed of 30 amino acids (3469 Da), has a high degree of hydrophobicity (41 kcal mol⁻¹) but has a net charge of -4, which is highly repulsive with the membrane. Therefore, the combined effect of charge, hydrophobicity and size appears to be determinant in the nature of the interaction (attractive or repulsive) with the membrane surface. This view supports the observations of Pouliot *et al* (1993) suggesting that non-polar amino acids were not selectively rejected by the membrane and that the charge/hydrophobicity balance of the peptides is the predominant factor determining the fractionation of casein hydrolysates.

The excluded peptides with neutral or basic properties involve short molecules (maximum of 8 amino acids). The neutral peptides could interact with the membrane but these molecules have a low degree of hydrophobicity (< 11 kcal mol⁻¹) in addition to their zero net charge. However, they possess very close opposite charges (Glu⁽⁻⁾ at N-terminal and Lys⁽⁺⁾ at C-terminal), on a short peptidic chain, which can contribute to their interaction with the components of the solution while it can prevent their adsorption onto the membrane material; in addition, peptide-peptide interactions of hydrophobic nature could be promoted for these small molecules in an aqueous media in order to stabilize their structure. Consequently, these molecules were excluded from the membrane. Nau *et al* (1995) observed that the β -casein peptides 100-105 and 108-113, possessing low hydrophobicity and molecular mass, were found in higher

concentration in the retentate ($C_p/C_r \approx 0.5$) at neutral pH and low ionic strength; this indicates that some interactions can occur between these molecules and the membrane surface, but their transmission into the permeate remains higher than that of hydrophobic peptides.

The behaviour of the adsorbed and excluded peptides was confirmed by a principal component analysis. Results shown in Table III revealed that the molecular mass, together with the hydrophobicity of the peptides are included in the first principal factor taking into account 72% of the differences between the peptides. In addition, the net charge of the peptides, included in the second principal component, take into account 27% of their differences. Therefore, the combination molecular mass/hydrophobicity/charge characterizes 99% of the differences between the peptides. The distribution of the peptides according to the first two principal components (figure not shown) clearly separated the group of adsorbed peptides, as well as each group of the excluded peptides, in specific zones. Thus, the combination of characteristics previously stated is determining the affinity of the peptides between the membrane or the aqueous solution.

No general trend was observed concerning the modification of the physico-chemical parameters (pH/EDTA) of the TH solution, even though the results obtained in previous studies (Pouliot *et al*, 1993; Gourley *et al*, 1994; Gourley *et al*, 1995) revealed that adsorption and peptide-peptide interactions were affected by the treatments. It was hypothesized that the addition of EDTA to the solution would induce an effect on basic peptides, minimizing their adsorption onto the membrane due to the electronegativity of EDTA. However, EDTA increased the adsorption of 3 of the 9 basic peptides (no 2, 1 and 12) and only slightly decreased adsorption of peptides no 18 and 31, while the others had the same degree of adsorption as in the samples without EDTA. Added EDTA generally seemed to modify the adsorption profile of the more hydrophilic (< 7 kcal mol⁻¹) and some of the most hydrophobic peptides (no 40, 41, 42 and 44) probably after a

reorganization in the structure of the peptides upon hydrophobic and electrostatic interactions.

From these observations, it can be suggested that highly negatively charged peptides with high molecular mass are probably repelled from the membrane despite their hydrophobicity because of the strong electronegative character of the surface. In contrast, short peptides presenting charges but possessing hydrophobic amino acids are unstable in the solution and would therefore interact with other peptides. Besides, charged peptides presenting a low hydrophobicity would be stabilized in the solution by electrostatic interactions with water molecules or other charged peptides. It must be considered that the information obtained from the adsorption/desorption experiments and identification methods allowed the determination of the adsorbed peptides but after a dissociation step. In fact, the solvents used in RP-HPLC eliminate association between peptides in order to identify them. Therefore we could not determine if the peptides were adsorbed separately or in the form of peptide-peptide complexes. This could explain the discrepancies observed with the modification of pH and addition of EDTA.

CONCLUSIONS

As expected, adsorption of peptides onto hydrophobic PSf membranes generally increases with increasing hydrophobicity of the molecules. However, other characteristics of the peptides seemed determinant in the adsorption profile. The results suggested that the balance size/hydrophobicity/charge of the molecule determines the attractive or repulsive interactions with the membrane, together with peptide-peptide interactions. Among the 45 adsorbed peptides, 11 of them presented specific characteristics that governed their behaviour towards the PSf membrane. It is supposed that the discrepancies observed upon modification of pH and addition of EDTA would be related to the conformation of casein peptides, rich in proline amino acid, and to the competition of the peptides in the interaction with the membrane surface. However, adsorption experiments should be conducted with multicharged species (eg poly-Lys, poly-Glu) in order to precise the effect of EDTA on the adsorption profile of the peptides. In addition, small molecules presenting adsorptive characteristics towards PSf (eg basic peptide with non-polar amino acid) can rapidly stabilize their structure with other molecules in TH solution and be excluded from the membrane, as well as are hydrophobic peptides of high molecular weight endowed with several negative charges.

This study was designed in order to determine preferential adsorption of casein peptides with PSf membrane surface in static conditions, in order to better understand the nature of interactions that could modify the permeability of the membrane during ultrafiltration of casein hydrolysate. Further studies on dynamic adsorption would implement the information concerning the very low permeation fluxes observed, by determining the mass balance between TH, retentate and permeate, together with water fluxes of clean membranes, upon dynamic adsorption and after concentration. In addition, the use of analytical

methods allowing the consideration of the conformation of peptides and peptide-peptide interactions at the membrane surface would give a better knowledge of the fouling phenomena.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the FCAR. We are grateful to Osmonics who supplied the membrane material. We thank Ms G Henry for transforming the HPLC data for the determination of the surface areas, and Dr M Pouliot for his implication in the statistical analysis.

REFERENCES

- Bigelow C (1967) On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. *J Theoret Biol* 16, 187-211
- Bouhallab S, Henry G (1995) Transmission of a hydrophobic peptide through an inorganic ultrafiltration membrane: effect of membrane support. *J Membrane Sci* 104, 73-79
- Brink LES, Romijn DJ (1990) Reducing protein fouling of polysulfone surfaces and polysulfone ultrafiltration membranes: Optimization of the type of presorbed layer. *Desalination* 78, 209-233
- Brink LES, Elbers SJG, Robbertsen T, Both P (1993) The anti-fouling action of polymers preadsorbed on ultrafiltration and microfiltration membranes. *J Membrane Sci* 76, 281-291
- Brulé G, Roger L, Fauquant J, Piot M (1980) Procédé de traitement d'une matière à base de caséine contenant des phosphocaséinates de cations monovalents ou leurs dérivés, produits obtenus et applications. Brevet Fr 2 474 829, INPI, Paris
- Daufin G, Kerhervé FL, Aimar P, Mollé D, Léonil J, Nau F (1995) Electrofiltration of solutions of amino acids or peptides. *Lait* 75, 105-115
- Fritzsche AK, Arevalo AR, Connolly AF, Moore MD, Elings V, Wu CM (1992) The structure and morphology of the skin of polyethersulfone ultrafiltration

membranes: A comparative atomic force microscope and scanning electron microscope study. *J Applied Polymer Sci* 45, 1945-1956

Gourley L, Britten M, Gauthier SF, Pouliot Y (1994) Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurements. *J Membrane Sci* 97, 283-289

Gourley L, Gauthier SF, Pouliot Y (1995) Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied. *Lait* 75, 259-269

Grosclaude F (1988) Genetic polymorphism in the main milk proteins in cattle. Relationship with milk yield, composition and suitability for cheese production. *INRA Productions Animales* 1, 5-17

Horbett TA, Brash JL (1995) Proteins at interfaces II: Fundamentals and Applications. ASC, Washington, DC, 561 p

Kai M, Ishii K, Tsugaya H and Miyano T (1985) Development of polyethersulfone ultrafiltration membranes, In: *Reverse osmosis and ultrafiltration*. Am Chem Society (Surirajan S, Matsuura T, eds) p 21

Lahl WJ, Braun SD (1994) Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology* 48 (10) 68-71

Marshall KR, Harper WJ (1988) Whey protein concentrates, *IDF Bulletin* 233, 21

Marshall AD, Daufin G (1995) Physico-chemical aspects of membrane fouling by dairy fluids In Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes. *IDF special issue* 9504, 8-35

Meireles M, Aimar P, Sanchez V (1991) Effect of protein fouling on the apparent pore size distribution of sieving membranes. *J Membrane Sci* 56, 13-28

Mochizuki S, Zydny AL (1992) Effect of protein adsorption on the transport characteristics of asymmetric ultrafiltration membranes. *Biotechnol Prog* 8, 553-561

Nau F (1991) *Production et séparation par ultrafiltration de peptides trypsiques issus de caseine β bovine*. Thèse, ENSA, Rennes, France

Nau F, Kerhervé, FL, Léonil J, Daufin G (1995) Selective separation of tryptic β-casein peptides through ultrafiltration membranes: Influence of ionic interactions. *Biotechnol Bioeng* 46, 246-253

Palecek SP, Zydny AL (1994) Hydraulic permeability of protein deposits formed during microfiltration: Effect of solution pH and ionic strength. *J Membrane Sci* 95, 71-81

Pouliot Y, Gauthier SF (1990) Effect of selected physico-chemical parameters on the flux decline of casein hydrolysate on polysulfone ultrafiltration membranes. Proc. ICOM'90, August 20-24, Chicago, IL, 273-275

Pouliot Y, Gauthier SF, Bard C (1993) Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes. *J Membrane Sci* 80, 257-264

Pouliot M, Pouliot Y, Britten M, Ross N (1994) Effects of pH and ionic environment on the permeability and rejective properties of an alumina microfiltration membrane for whey proteins. *J Membrane Sci* 95, 125-134

Renner E, Abd El-Salam MH (1991) Application of ultrafiltration in the dairy industry. Elsevier Applied Science, NY, 371 p

Swaisgood HE (1992) Chemistry of the caseins *In: Advanced dairy chemistry-1: proteins.* Elsevier Appl Sci (Fox PF, ed) NY, 63-110

Tam CM, Kutowy O, Talbot FDF (1991) Retention characteristics of alcohols and sugars on polysulfone as a stationary phase with an aqueous mobile phase. *Chromatographia* 32, 224-228

Tanford C (1962) Contribution of hydrophobic interactions to the stability of the globular conformation of proteins. *J Am Chem Soc* 84, 4240-4247

van der Horst HC (1995) Fouling of organic membranes during processing of dairy liquids. *IDF Special issue* 9504, 36-52

van Oss CJ (1994) Interfacial forces in aqueous media. Marcel Dekker, NY, 440 p

Table 5.1. Characteristics of the peptides in the casein total hydrolysate (TH), identified by mass spectrometry.
Caractéristiques des peptides de l'hydrolysat total de caséine (HT), identifiés par spectrométrie de masse.

Peak Number ¹	Peptidic sequence	Molecular Mass ² (Dalton)	Hydrophobicity ³ (kcal mol ⁻¹)	pI	Net Charge at pH 8.0
1	α_1 80-83	525	4.5	9.4	+1
2	β 164-169	649	3.9	9.4	+1
3	α_1 4-7	494	7.1	9.4	+1
4	α_1 125-132	910	5.2	7.0	0
5	β 100-105	646	6.9	6.2	0
6	α_1 120-124	615	5.2	9.4	+1
7	α_1 84-90	831	5.1	4.1	-2
8	α_1 37-42	689	5.6	6.2	0
9	α_1 35-42	947	7.1	6.2	0
10	κ 1-10	1253	6.3	4.1	-2
11	α_1 80-90	1338	9.5	5.4	-1
12	β 177-183	830	11.3	9.0	+1
13	κ 17-21	643	6.8	6.3	0
14	β 33-48	2063	7.0	4.1	-5
15	β 170-176	781	12.5	9.4	+1
16	α_2 200-203	491	10.1	5.8	0
17	β 49-52	513	8.2	7.0	0
18	α_2 189-193	632	9.2	9.4	+1
19	β 108-113	748	10.7	6.2	0
20	α_2 138-149	1467	10.2	4.1	-2
21	α_2 115-125	1196	14.7	10.2	+1
22	κ 98-105	971	10.3	7.0	0
23	α_2 81-91	1369	13.1	6.2	0
24	α_1 106-119	1662	15.5	4.1	-2
25	κ 25-30	796	14.2	5.8	0
26	κ 35-43	1140	16.4	5.8	0
27	α_1 104-119	1953	19.8	4.1	-1
28	α_2 92-98	958	13.4	5.8	0
29	β 184-190	821	10.3	4.1	-1
30	β 191-202	1384	19.4	6.2	0
31	α_2 174-181	980	15.2	9.0	+1
32	β 1-25	3124	21.1	1.7	-5
33	α_1 194-199	748	10.2	5.8	0
34	α_1 152-164	1547	17.9	4.1	-1
35	α_1 166-193	3028	31.9	4.1	-3
36	α_1 152-165	1710	20.7	4.1	-1
37	α_2 99-113	1771	23.7	6.3	0
38	α_1 165-193	3191	34.8	4.1	-3
39	β 203-209	742	15.5	5.8	0
40	α_1 91-100	1268	16.1	6.2	0
41	α_1 23-34	1385	21.5	6.2	0
42	α_1 133-151	2318	28.5	4.1	-2
43	β 69-97	3115	43.2	6.2	0
44	α_2 92-113	2711	37.1	6.3	0
45	β 49-97	5360	73.0	7.0	0
46	β 114-143	3469	40.5	4.1	-4

¹ As identified in Figure 5.1. Tel qu'identifié à la Figure 5.1.

² Determined by mass spectrometry. Déterminé par spectrométrie de masse.

³ Determined according to Bigelow (1967) and Tanford (1962).

³ Déterminé selon Bigelow (1967) et Tanford (1962).

Table 5.2. Amino acid sequence and physico-chemical characteristics of the peptides presenting major differences (groups I and III) in term of partition coefficient (α) between total hydrolysate and adsorbed material.

Séquence en acides aminés et caractéristiques physico-chimiques des peptides présentant des différences majeures (groupes I et III) en terme de coefficient de partage (α) entre l'hydrolysat total de caséines et le matériel adsorbé.

Peptide	Amino acid sequence	α^1	Molecular mass (Da)	Hydrophobicity (kcal mol ⁻¹)	Net charge at pH 8.0
Adsorbed peptides (group I)					
#40	α_s_1 91-100	YLGYLEQLLR	1.76	1268	16.1
#41	α_s_1 23-34	FFVAPFPEVFGK	1.91	1385	21.5
#44	α_s_2 92-113	FPQYLQYLYQGPIVLNP WDQVK	1.58	2711	37.1
#45	β 49-97	IHPFAQTQSLVYPFPGPIH NSLPQNIPPLTQTPV VVPPFLQPEVMGVSK	2.32	5360	73.0
Excluded peptides (group III)					
#20	Acidic α_s_2 138-149 β 114-143	TVDMEUTEVFTK YPVEPFTESQSLTLTDVE NLHLPLPLLQSW	0.69 0.50	1467 3469	10.2 40.5
#5 #9 #19	Neutral β 100-105 α_s_1 35-42 β 108-113	EAMAPK EKVNELSK EMPFPK	0.72 0.68 0.65	646 947 748	6.9 7.1 10.7
#1 #6	Basic α_s_1 80-83 α_s_1 120-124	HIQK LHSMK	0.58 0.59	525 615	4.5 5.2

¹ α = average of the values obtained under the six physico-chemical conditions.

¹ α = moyenne des valeurs obtenues aux six conditions physico-chimiques.

Table III. Results of the principal component analysis characterizing the peptides according to their molecular mass, hydrophobicity, and net charge for each principal component, and the proportion of the total eigenvalues attributable to each component.

Résultats de l'analyse en composant principal caractérisant les peptides selon leur masse moléculaire, hydrophobité et charge nette pour chaque composant principal, et la proportion des valeurs propres attribuables à chaque composant.

Characteristics	Eigenvectors		
	Principal 1	Principal 2	Principal 3
Molecular mass	0,671	0,131	0,730
Hydrophobicity	0,621	0,439	-0,650
Charge	-0,406	0,889	0,213
Proportion	0,720	0,271	0,008

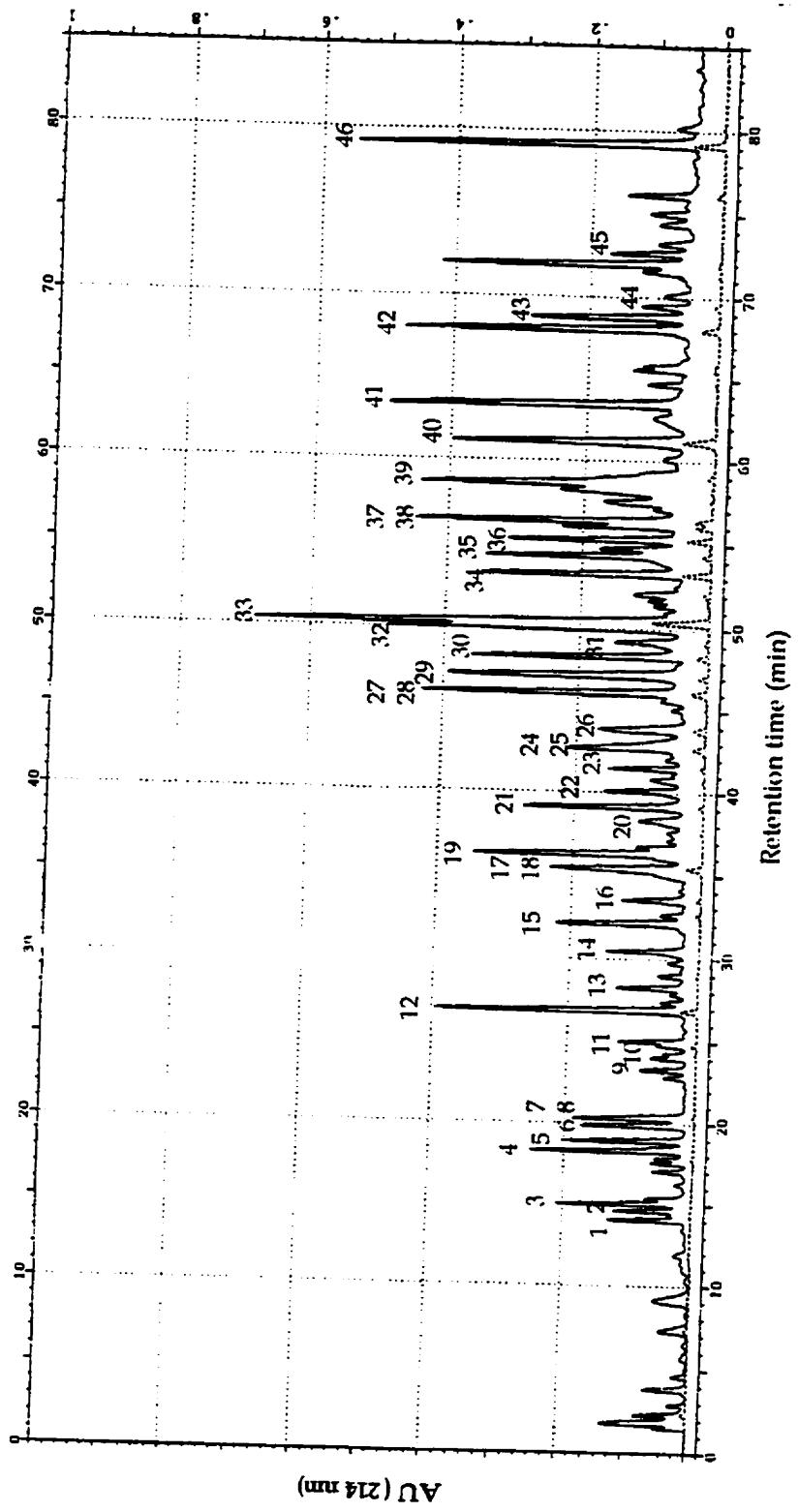


Figure 5.1 RP-HPLC profile of the casein peptides contained in the casein total hydrolysate, and identified by mass spectrometry.
Profil RP-HPLC des peptides caseiniques contenus dans l'hydrolysat total de caséines, et identifiés par spectrométrie de masse.

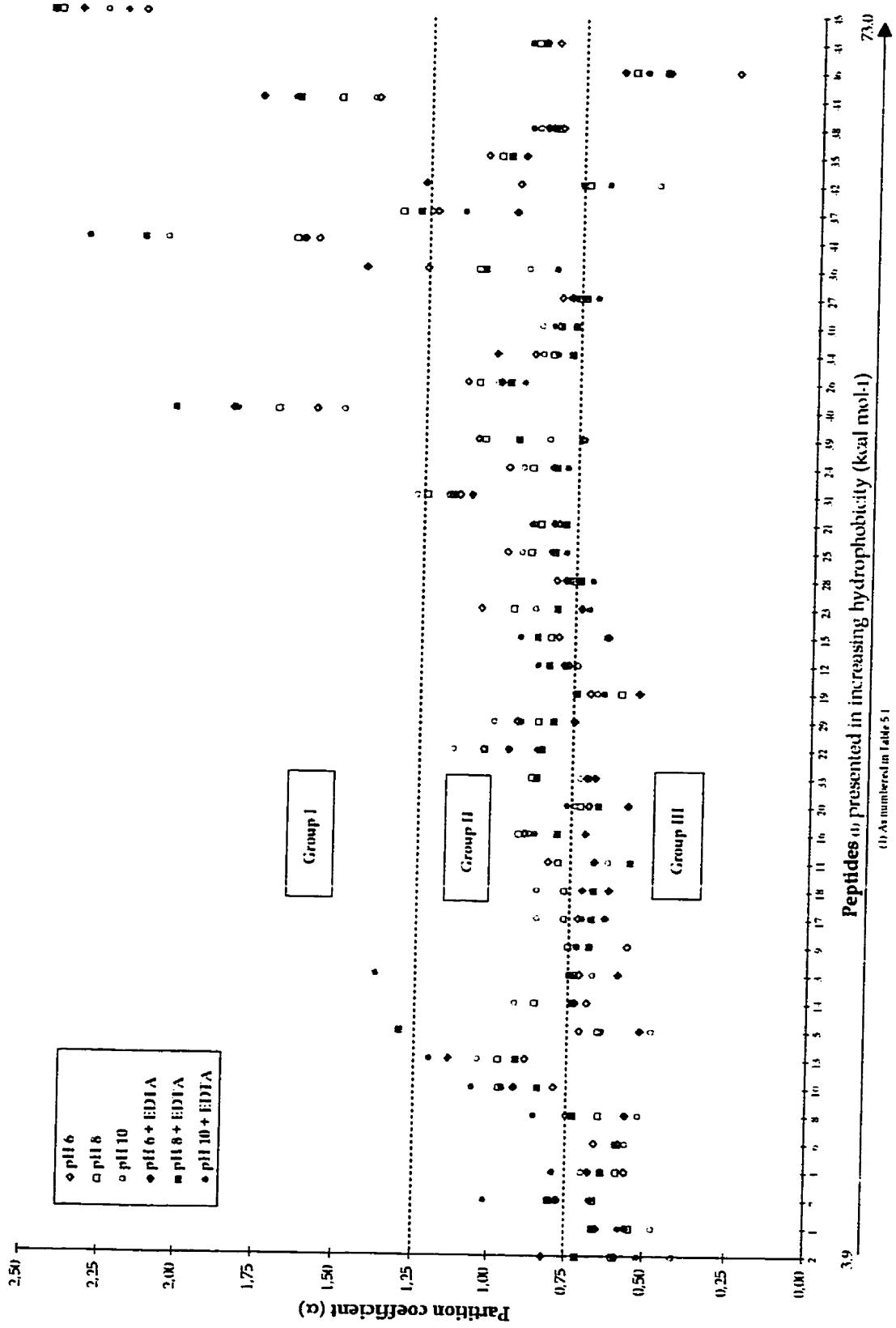


Figure 5.2 Partition coefficient (α) of the casein peptides between total hydrolysate and adsorbed material.
Coefficient de partage (α) des peptides caseïques entre l'hydrolysat total et le matériel adsorbé.

(1) As numbered in Table 5.1

Chapitre 6

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'hypothèse à la base de ce travail soutenait que *lors de l'ultrafiltration d'un hydrolysat caséique, des interactions peptide-membrane modifient les propriétés de surface du matériau membranaire et affectent la perméabilité des membranes*. Cette hypothèse a été vérifiée par l'identification des molécules qui interagissent avec la surface membranaire, modifient ses paramètres énergétiques et causent la baisse des flux de perméation caractérisant l'encrassement des membranes de polysulfone par les hydrolysats caséiques.

La réalisation du premier objectif du travail nous a permis de mettre en évidence la présence d'interactions peptide-matériau membranaire à nature electrostatique. Nous avons démontré qu'en mode dynamique, les conditions physico-chimiques d'une solution d'hydrolysat caséique et la nature des matériaux membranaires modifient la perméabilité des membranes de polysulfone. En effet, nous avons observé que 1) bien que le polyéthersulfone (PES) possède une perméabilité à l'eau supérieure au polysulfone (PSf), l'acidification du milieu occasionne une chute importante des flux de perméation, de façon similaire pour les deux polymères étudiés; 2) l'amélioration des flux de perméation et la modification des composantes du filtrat en terme de masses moléculaires n'est pas proportionnelle à l'augmentation du seuil de coupure des membranes; 3) pour les deux matériaux membranaires, la présence d'un agent séquestrant (EDTA) modifie légèrement les profils de perméation par la baisse du flux initial et de la chute totale du flux, de même que la composition des perméats obtenus (masses moléculaire, azote, acides aminés).

Le deuxième objectif du travail a permis de caractériser et quantifier, par la mesure d'angles de contact, l'effet de l'adsorption en mode statique des peptides caséiques sur la modification des paramètres énergétiques des surfaces membranaires, soient le PSf et le PES. Les résultats ont démontré que les caractéristiques de ces matériaux (monopolarité, hydrophobicité) favorisent

l'adsorption du matériel peptidique à la fois par des interactions électrostatiques et hydrophobes, et que l'adsorption des peptides caséiques sur le PES est moins importante que sur le PSf, mais induit des changements de surface plus considérables que sur le PSf. En effet, les différences observées dans l'énergie de surface suite à l'adsorption des peptides laissent supposer que la nouvelle surface filtrante formée est différente pour les deux matériaux; ceci indique que les peptides couvrent plus de surfaces sur le PES, en adoptant une conformation plus étendue, et diminuent aussi considérablement la perméabilité de la membrane. En effet, l'analyse statistique a révélé que le matériau membranaire contribuait de façon importante que les conditions physico-chimiques du milieu sur les différences observées. Bien que les deux matériaux à l'étude soient homologues, l'adsorption des peptides semble fortement influencée par la structure du matériau membranaire. Le PES ne semble donc pas donner un meilleur rendement que son homologue plus hydrophobe, le PSf. Par contre, l'utilisation de telles membranes pourrait être justifiée lorsqu'une rétention sélective de peptides de caséines serait souhaitée ou encore, lors du fractionnement de matériel protéique moins hydrophobe.

Finalement, le dernier objectif du travail a permis de préciser, en mode statique, la nature des molécules initiant l'encrassement des membranes de PSf par les hydrolysats caséiques. Suite à l'identification et la quantification des peptides contenus dans le matériel adsorbé, il a été conclu que la combinaison des caractéristiques taille/hydrophobicité/charge des peptides caséiques détermine leur affinité entre l'interface membranaire et la solution aqueuse. En effet, une analyse en composant principal a révélé que cette combinaison exprime 99% des différences observées entre les peptides. De façon générale, un peptide neutre, hydrophobe et de masse moléculaire élevée possède les caractéristiques favorisant son adsorption sur le PSf, par opposition à un peptide fortement électronégatif dont l'affinité pour le PSf sera faible, même si sa taille et son hydrophobicité sont élevées. D'autre part, les peptides plus courts (< 12 acides aminés) et faiblement hydrophobes seront soit partagés également entre la

surface membranaire et la solution, soit exclus de la membrane et en proportion plus grande dans la solution. L'affinité supérieure de ce type de peptides pour la phase aqueuse sera alors fonction de la quantité, et de la nature des charges sur la chaîne peptidique.

L'ensemble de ces observations nous permet maintenant de mieux comprendre l'enrassement des membranes de PSf et d'expliquer la baisse importante des flux de perméation lors de l'ultrafiltration des hydrolysats enzymatiques de caséines. Lors de l'étude du comportement des peptides à l'interface solution-matériau membranaire ou de leur fractionnement, la charge et l'hydrophobicité sont indissociables et doivent être considérées conjointement avec la taille des molécules. En effet, il semble que l'adsorption initiale des peptides neutres, hydrophobes et de masses moléculaires élevées soit accentuée par le caractère hydrophobe de la surface membranaire et contribue à la diminution de la perméabilité à l'eau limitant ainsi leur transmission. Simultanément, la répulsion électrostatique entre le matériau membranaire et les peptides électronégatifs favorise l'hydratation de ces peptides dans la solution. L'énergie libre des peptides présentant une affinité intermédiaire entre la surface membranaire et la solution sera déterminante de leur comportement entre les deux phases, selon la nature des sites exposés des molécules adsorbées à la surface de la membrane et ceux des molécules en solution. Les interactions peptide-peptide peuvent alors être favorisées et ce type d'interaction demeure indéfini dans la présente étude. En fait, l'adsorption du matériel peptidique présentant une affinité intermédiaire entre les deux phases serait plus ou moins importante sur la surface membranaire selon la nature des peptides fortement adsorbés. Aussi, les caséines possèdent 30% plus d'acides aminés apolaires à noyau cyclique que les protéines lactosériques, favorisant leur interaction avec le PSf, et 25% moins d'acides aminés polaires non chargés, ces peptides étant peu réactifs avec le matériau membranaire. Le polysulfone semble donc sélectif à une catégorie de peptides modifiant sa surface; ces résultats devront toutefois être confirmés par une étude en mode dynamique.

Lors de la modification du pH de la solution d'hydrolysat, les interactions avec la membrane seront alors plus ou moins importantes selon le degré d'hydratation des molécules alors plus électronégatives ou électropositives, et les interactions hydrophobes en résultant. Le profil d'adsorption, et donc le flux de perméation, sera alors modifié; à pH basique, la répulsion des peptides plus électronégatifs face à la membrane devrait être augmentée, alors qu'à pH acide l'adsorption des peptides hydrophobes et chargés positivement serait favorisée, diminuant considérablement les flux de perméation. Toutefois, la modification des interactions peptide-peptide doit être considérée, prenant en compte la taille/hydrophobicité/charge des molécules. L'ajout d'EDTA à la solution peptidique favorise l'agrégation des peptides qui, par des interactions avec la surface membranaire, diminuent le transfert en début de filtration (J_0) sans toutefois provoquer le blocage des pores; ceci permet alors de maintenir un flux de perméation plus constant lors du fractionnement.

Suivant cette étude, les paramètres pouvant être modifiés afin de réduire l'enrassement et améliorer les flux de perméation sont: 1) le fractionnement à pH basique; 2) si l'application le permet, l'ajout d'un agent favorisant l'agrégation de certains peptides, permettant d'utiliser une membrane de structure plus ouverte; 3) l'utilisation d'une membrane plus hydrophile et autant résistante que le PSf, et dont la structure en surface est moins orientée. Aussi, la morphologie des membranes ayant possiblement un impact sur la conformation des peptides adsorbés et sur l'exposition des sites d'interaction qui en résultent, l'utilisation de membranes de porosité uniforme (*track-etched membranes*) pourrait permettre d'obtenir un profil d'adsorption régulier. Enfin, l'utilisation de membranes chargées, ou d'une succession de membranes hydrophobe et chargée, pour le fractionnement d'un hydrolysat caséique permettrait d'augmenter l'efficacité de la séparation afin d'obtenir des catégories de fractions peptidiques possédant des caractéristiques distinctes. À cet effet, la nanofiltration semble être

un moyen prometteur pour la séparation des acides aminés libres et des sels de la fraction contenant des peptides courts et de ceux de taille intermédiaire.

Il est actuellement impossible de discuter de l'impact des interactions peptide-peptide et de la conformation des peptides, sur leur comportement face à la solution et à la surface membranaire, ni de l'effet de la modification des conditions physico-chimiques sur ce type d'interactions, puisqu'aucune méthode ne permet de les caractériser. Ceci ouvre la voie à un nouveau domaine d'étude et il est très urgent de mettre au point des méthodes pour caractériser ces interactions peptide-peptide afin de mieux comprendre les phénomènes d'enrassement et ainsi, contrôler et diversifier la préparation de produits à haute valeur ajoutée.

Mais, l'adsorption étant inhérente aux procédés de séparation, il est possible de mettre à profit ce phénomène pour le fractionnement des hydrolysats protéiques et la préparation de fractions peptidiques spécifiques. En effet, une meilleure compréhension des mécanismes d'adsorption des peptides aux matériaux membranaires et des conditions physico-chimiques favorisant ou non cette adsorption pourrait permettre de moduler la séparation de ces molécules, et de produire des fractions peptidiques dont les propriétés seraient très différentes et les applications aussi variées; l'optimisation d'un procédé de séparation d'un hydrolysat caséique permettrait d'assurer l'utilisation des diverses fractions composant la solution, tels les phosphopeptides, la fraction glycosylée et les peptides hydrophobes. À cette étape de la recherche, il est permis d'envisager que la concentration des molécules montrant une forte affinité pour les matériaux hydrophobes offriraient également une forte affinité pour l'interface huile-eau d'une émulsion ou encore, pour certains récepteurs membranaires de l'organisme, et pourraient ainsi contribuer au transport des nutriments liposolubles.

Loin d'apporter une solution finale au problème d'encrassement des membranes, cette recherche soulève encore certaines questions et ouvre maintenant la voie à de nombreuses études qui permettront d'élucider les interactions peptide-solution, peptide-peptide et peptide-interface membranaire. Ceci implique tant le secteur de la fabrication des membranes que celui de la production d'hydrolysats, afin de commercialiser des membranes dont les propriétés répondraient aux besoins requis par ce type d'application. De plus, la connaissance de la structure tridimensionnelle des peptides caséiques permettrait de mieux préciser leur comportement aux interfaces; les caséines comportant une teneur élevée en proline, comparativement aux protéines sériques, possèdent sûrement une structure particulière définissant le patron d'adsorption et les interactions peptide-peptide. Aussi, des travaux sur l'adsorption en conditions dynamiques permettrait de préciser le comportement des peptides à l'interface solution-matériau membranaire, et possiblement l'impact de la modification des conditions physico-chimiques du milieu. La mise au point d'une telle méthode permettrait d'évaluer rapidement le comportement de divers produits, dont les hydrolysats, sur plusieurs membranes afin de choisir le matériau approprié pour l'application recherchée. Il serait indiqué de complémenter cette étude en vérifiant: 1) la réactivité du polysulfone selon le type de conditionnement: acide-basique *versus* basique-acide; 2) l'impact du matériau sur l'adsorption des composantes d'une solution modèle, constituée par exemple de poly-Lys ou de poly-Glu; 3) la conformation des peptides en absence et en présence d'EDTA; 4) le comportement des peptides sur des membranes minérales; 5) la nature du substrat utilisé pour la préparation de l'hydrolysat, soit l'utilisation d'un caséinate natif; 6) l'importance des interactions hydrophobes, lors d'une filtration à température élevée, sur l'affinité des peptides entre le matériau membranaire et la solution, et donc sur la perméabilité des membranes. Enfin, une étude permettant d'effectuer simultanément les trois objectifs présentés dans cette thèse, en conditions statiques et en conditions dynamiques, contribuerait à élucider les mécanismes d'encrassement des membranes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références présentées ici sont celles citées dans les Chapitres 1 et 2.

- Adachi S, Kimura Y, Murakami K, Matsuno R, Yokogoshi H (1991) Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. *Agric Biol Chem* 55, 925-932
- Adler-Nissen J (1986) Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier, NY, 427 p
- Agboola SO, Dalgleish DG (1996) Enzymatic hydrolysis of milk proteins used for emulsion formation. 1. Kinetics of protein breakdown and storage stability of the emulsions. *J Agric Food Chem* 44, 3631-3636
- Berthou J, Migliore-Samour D, Lifchitz A, Deletré J, Floc'h F, Jollès P (1987) Immunostimulating properties and three-dimensional structure of two tripeptides from human and cow caseins. *FEBS Letters* 218, 55-58
- Bouhallab S, Mollé D, Léonil J (1992) Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotechnol Lett* 14, 805-810
- Bouhallab S, Mollé D, Léonil J (1993) Continuous hydrolysis of β -casein in a membrane reactor: Preparation of a bioactive peptide. *Biotechnol Lett* 15, 697-702
- Bouhallab S, Henry G (1995) Transmission of a hydrophobic peptide through an inorganic ultrafiltration membrane: effect of membrane support. *J Membr Sci* 104, 73-79
- Bouhallab S, Touzé C (1995) Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor: kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides. *Lait* 75, 251-258

Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, Lottspeich F (1979) Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins). I Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler Zeitschrift für Physiologische Chemie* 360, 1211-1216

Brink LES et Romijn DJ (1990) Reducing protein fouling of polysulfone surfaces and polysulfone ultrafiltration membranes: Optimization of the type of presorbed layer. *Desalination* 78, 209-233

Brink LES, Elbers SJG, Robbertsen T, Both P (1993) The anti-fouling action of polymers preadsorbed on ultrafiltration and microfiltration membranes. *J Membrane Sci* 76, 281-291.

Brûlé G, Roger L, Fauquant J, Piot M (1980) Procédé de traitement d'une matière à base de caséine contenant des phosphocaséinates de cations monovalents ou leurs dérivés, produits obtenus et applications. Brevet 2 474 829, INPI, Paris

Brûlé G, Roger L, Fauquant J, Piot M (1985) Phosphopeptides from casein-based material. Brevet USA 4 495 176

Capannelli G, Bottino A, Gekas V, Trägardh G (1990) Protein fouling behaviour of ultrafiltration membranes prepared with varying degrees of hydrophilicity. *Process Biochem* 26, 221-224

Cheryan M (1986) Ultrafiltration Handbook, Technomic Publ Co, Lancaster, 374 p

Chiba H, Yoshikawa M (1986) Biologically functional peptides from food proteins: New opioid peptides from milk proteins. In: *Protein Tailoring for Food and Medical Uses*, Marcel Dekker, NY (Feeney RE, Whitaker JR eds) 123-153

Chiba H, Tani F, Yoshikawa M (1989) Opioid antagonist peptides derived from κ -casein. *J Dairy Research* 56, 363-366

- Cordano A, Cook DA (1985) Preclinical and clinical evaluation with casein hydrolysate products. In: *Nutrition for special needs in infancy*, Marcel Dekker, NY (Lifshitz F ed) 119-130
- Daufin G, Kerhervé FL, Aimar P, Mollé D, Léonil J, Nau F (1995) Electrofiltration of solutions of amino acids or peptides. *Lait* 75, 105-115
- Diaz O, Gouldsworthy AM, Leaver J (1996) Identification of peptides released from casein micelles by limited trypsinolysis. *J Agric Food Chem* 44, 2517-2552
- Fiat AM, Migliore-Samour D, Jollès P, Drouet L, Sollier CBD, Caen J (1993) Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J Dairy Sci* 76, 301-310
- Gagnaire V, Pierre A, Mollé D, Léonil J (1996) Phosphopeptides interacting with colloidal calcium phosphate isolated by tryptic hydrolysis of bovine casein micelles. *J Dairy Res* 63, 405-422
- Garem A (1995) *Applications de la nanofiltration au fractionnement des hydrolysats peptidiques*. Thèse , ENSAR, Rennes, France, 131p
- Gauthier SF, Paquin P, Pouliot Y, Turgeon SL (1993) Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *J Dairy Sci* 76, 321-328
- Ge SJ, Zhang LX (1996) The immobilized porcine pancreatic exopeptidases and its application in casein hydrolysates debittering. *Appl Biochem Biotech* 59, 159-165
- Gerber HW, Jost R (1986) Casein phosphopeptides: their effect on calcification of *in vitro* cultured embryonic rat bone. *Calcif Tissue Int* 38, 350-357

Gill I, Lopez-Fandino R, Jorba X, Vulfson EN (1996) Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme Microbial Tech* 18, 162-183

Hansen M, Sandström B, Jensen M, Sorensen SS (1997) Casein phosphopeptides improve zinc and calcium absorption from rice-based but not from whole-grain infant cereal. *J Ped Gastr Nutr* 24, 56-62

Huang XL, Catignani GL, Swaisgood HE (1996) Improved emulsifying properties of β -barrel domain peptides obtained by membrane-fractionation of a limited tryptic hydrolysate of β -lactoglobulin. *J Agric Food Chem* 44, 3437-3443

Hugodot B, Bouziane A, Zidoune MN, Tarodo de la Fuente B (1991) Electro-ultrafiltration du lait sur membrane minérale: étude des débits et du colmatage. *Lait* 71, 645-659

Jollès P, Levy-Toledano S, Fiat AM, Soria C, Gillessen O, Thomaidis A, Dunn FW, Caen JP (1986) Analogy between fibrinogen and casein clotting. Effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function. *Eur J Biochem* 158, 379-382

Kai M, Ishii K, Tsugaya H, Miyano T (1985) Development of polyether sulfone ultrafiltration membranes. In: *Reverse osmosis and ultrafiltration*. Am. Chem. Society (Surirajan S, Matsuura T eds) 21-33

Kampa M, Loukas S, Hatzoglou A, Martin P, Martin PM, Castanas E (1996) Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human α_{s1} casein (α_{s1} casomorphin, and α_{s1} casomorphin amide). *Biochem J* 319, 903-908

Kitts DD, Leung R, Nakai S (1991) Extrinsic labelling of caseinophosphopeptides with ^{45}Ca and recovery following thermal treatment. *Can Inst Food Sci Technol J* 24, 278-282

Kohmura N, Nio N, Ariyoshi Y (1990) Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragment of human κ -casein. *Agric Biol Chem* 54, 835-836

Laffineur E, Génetet N, Léonil J (1996) Immunomodulatory activity of β -casein permeate medium fermented by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 79, 2112-2120

Lahl WJ, Braun SD (1994) Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. In Overview: outstanding symposia in food science & technology. *Food Technol* 48, 68-71

Leaver J, Horne DS (1996) Chymosin-catalyzed hydrolysis of glycosylated and nonglycosylated bovine κ -casein adsorbed on latex particles. *J Colloid Interface Sci* 181, 220-224

Lee K and Hong J (1992) Transport of amino acids through ultrafiltration membranes in the presence of electric field. *AIChE Symposium Series* 88, 72-79

Léonil J, Mollé D (1990) Liberation of tryptic fragments from caseinomacropeptide of bovine κ -casein involved in platelet function. *Biochem J* 271, 247-252

Léonil J, Nau F, Mollé D, Maubois JL (1991) Procédé d'obtention, à partir de la caséine bêta, de fractions enrichies en peptides à activité biologique et les fraction peptidiques obtenues. Brevet Fr 2 650 955 A1

Lin SB, Chiang WD, Cordle CT, Thomas RL (1997) Functional and immunological properties of casein hydrolysate produced from a two-stage membrane system. *J Food Sci* 62, 480-483

Maeno M, Yamamoto N, Takano T (1996) Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 79, 1316-1321

Mahmoud MI, Malone WT, Cordle CT (1992) Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J Food Sci* 57, 1223-1229

Mahmoud MI (1994) Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products In Overview: outstanding symposia in food science & technology. *Food Technol* 48, 89-95

Mallubhotla H, Belfort G (1997) Flux enhancement during Dean Vortex microfiltration. 8. Further diagnostics. *J Memb Sci* 125, 75-91

Manson W (1980) The use of milk and milk constituents in pharmaceutical preparations. *Int Dairy Fed Bull* 125, 60-65

Marshall WE (1994) Amino acids, peptides, and proteins. In: *Functional Foods. Designer foods, Pharmfoods, Nutraceuticals* (Goldberg I, ed) Chapman and Hall, NY, 242-260

Maruyama S, Nakagomi K, Tomizuka N, Suzuki H (1985) Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric Biol Chem* 49, 1405-1409

Maubois JL, Roger L, Brûlé G, Piot M (1979) Hydrolysat enzymatique total de protéines de lactosérum. Obtention et applications. Brevet Français INRA, No 79-16-482

Maubois JL, Léonil J (1988) Nouvelles utilisations diététiques et parapharmaceutiques des protéines laitières In: *Nouvelles utilisations du lait. Colloque International, STELA, Québec*, 158-195

Maubois JL, Ollivier G (1992) Milk protein fractionation. *IDF Special Issue* 9201, 15-22

Meisel H, Frister H (1989) Chemical characterization of bioactive peptide from micro digests of casein. *J Dairy Res* 56, 343-349

Miclo L, Perrin E, Driou A, Boudier JF, Iung C, Linden G (1994) Utilisation d'un décapeptide à activité de type benzodiazépine pour la préparation de médicaments et de compléments alimentaires. Brevet Fr 94 14362, SCA d'Artois et des Flandres, Paris

Migliore-Samour D, Jollès PL (1988) Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? *Experientia* 44, 188-193

Mochizuki S, Zydny AL (1992) Effect of protein adsorption on the transport characteristics of asymmetric ultrafiltration membranes. *Biotechnol Prog* 8, 553-561

Mulder M (1996) Basic principles of membrane technology. Kluwer Academic Publishers, 2^e édition, Dordrecht, Pays-Bas, 564 p

Nau F (1991) *Production et séparation par ultrafiltration de peptides trypsiques issus de caséine β bovine*. Thèse, ENSA, Rennes, France

Nau F, Kerhervé, FL, Léonil J, Daufin G (1995) Selective separation of tryptic β -casein peptides through ultrafiltration membranes: Influence of ionic interactions. *Biotechnol Bioeng* 46, 246-253

Panyam D, Kilara A (1996) Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci Technol* 7, 120-125

Parker F, Migliore-Samour D, Floc'h F, Zerial A, Werner GH, Jollès J, Casaretto M, Zahn H, Jollès P (1984) Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur J Biochem* 145, 677-682

Pouliot Y, Gauthier SF (1990) Effect of selected physico-chemical parameters on the flux decline of casein hydrolysate on polysulfone ultrafiltration membranes. Proc. ICOM'90, August 20-24, Chicago, IL, p 273

Pouliot Y, Gourley L, Landry J (1992) Fouling of ultrafiltration membranes by heat-treated whey. *European Dairy Magazine* 12

Pouliot Y, Bard C, Gauthier SF (1993) Fractionation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration hollow fiber membranes. *J Membrane Sci* 80, 257-264

Pouliot Y, Gauthier SF, Bard C (1995) Skimmilk solids as substrate for the preparation of casein enzymatic hydrolysates. *J Food Sci* 60, 111-116

Pouliot Y, Jelen P (1995) Pretreatments of dairy fluids to minimize long-term membrane fouling *In Fouling and cleaning in pressure driven membrane processes. IDF Special Issue 9504* 80-92

Puhan Z (1992) Standardization of milk protein content by membrane processes for product manufacture. *In: New applications of membrane processes. IDF Special Issue 9201*, 23-32

Renner E, Abd El-Salam MH (1991) Application of ultrafiltration in the dairy industry. Elsevier Applied Science, New York, 30-46

Schmidl MK, Taylor SL, Nordlee JA (1994) Use of hydrolysate-based products in special medical diets *In Overview: outstanding symposia in food science & technology. Food Technol* 48, 77-85

Swaisgood HE, Horton HR (1989) Immobilized enzymes as processing aid or analytical tools. *In: Biocatalysis in Agricultural Biotechnology.* (Whitaker JR, Sonnet P, eds) ASC symp Ser 389, American Chemical Society, Washington, DC, 242-261

Tam CM, Kutowy O, Talbot DF (1991) Retention characteristics of inorganic salts and polyethylene glycols on polysulfones. *J Liquid Chromatogr* 14, 45-59

Touraine F, Brûlé G, Maubois JL (1987) Séparation chromatographique de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique de protéines de lactosérum et de caséines. *Lait* 67, 410-436

- Turgeon SL, Gauthier SF (1990) Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: production and characterization. *J Food Sci* 55, 106-110, 157
- Turgeon SL, Gauthier SF, Paquin P (1991) Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: production and characterization. *J Agric Food Chem* 39, 673-676
- Turgeon SL, Gauthier SF, Mollé D, Léonil J (1992) Interfacial properties of tryptic peptides of β -lactoglobulin. *J Agric Food Chem* 40, 669-675
- van der Horst HC, Hanemaaier JH (1990) Cross-flow microfiltration in the food industry. State of the art. *Desalination* 77, 235-258
- van der Horst HC (1995) Fouling of organic membranes during processing od dairy liquids. *IDF Special issue* 9504, 36-52
- van Krevelen DW (1990) Interfacial energy properties *In: Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions.* Elsevier, New York, 227-241
- van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK (1986a) The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces. *J Colloid Interface Sci* 111, 378-390
- van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK (1986b) Solubility of proteins. *J Protein Chem* 5, 385-405
- van Oss CJ, Good RJ (1988) Orientation of water molecules of hydration of human serum albumin. *J Protein Chem* 7, 179-183
- Visser S, Noorman HJ, Slangen CJ, Rollema, HS (1989) Action of plasmin on bovine β -casein in a membrane reactor. *J Dairy Res* 56, 323-333

Wijmans H (1984) Synthetic membranes - Thesis. Alpha, Enschede, Netherlands, 219 p

Yoshikawa M, Tani F, Chiba H (1988) Structure-activity relationship of opioid antagonist peptides derived from milk proteins. In: *Peptide Chemistry 1987*, Osaka: Protein Research Foundation, (Shiba T ed) 473-476

Zioudrou C, Streaty RA, Klee WA (1979) Opioid peptides derived from food proteins, the exorphins. *J Biol Chem* 254, 2446-2449

Zisman WA (1964) Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. In: *Contact angle, wettability and adhesion*. ACS Symp Ser 43, American Chemical Society, Washington, DC, 1-51

ANNEXE 1

Spectrométrie de masse:

Principes et exemple d'identification d'un peptide.

La spectrométrie de masse permet d'identifier des molécules, à l'aide d'homologies de séquences de protéines connues, en déterminant la masse de leurs fragments. Cette méthode permet aussi l'identification d'isotopes et la détermination de l'état d'association d'une molécule avec des ions, tels les sels. Les principes généraux de l'identification des peptides sont présentés dans cette annexe, avec comme exemple la validation d'un peptide contenu dans l'hydrolysat total faisant l'objet de la présente étude.

Lors de l'identification des molécules contenues dans une solution complexe, une colonne de chromatographie liquide en phase inversée, couplée au spectromètre de masse (LC/MS-MS), permet d'effectuer une première identification de la masse des peptides afin d'établir le profil des masses contenues dans la solution. La collecte des pics chromatographiques permet de les purifier, afin d'injecter dans le spectromètre de masses un nombre restreint de peptides et ainsi, optimiser leur identification.

La Figure 1 illustre les diverses parties composant l'analyseur de masses. L'analyse LC/MS-MS consiste à ioniser la solution mixte par nébulisation électrostatique (electrospray); l'appareil fonctionne sous un vide cryogénique et une différence de potentiel assure la trajectoire des ions formés à l'interface. Un quadripôle de préfocalisation permet de ne visualiser que la masse ou la zone de masses que l'on désire déterminer, faisant abstraction des autres molécules présentes dans l'échantillon. Un premier quadripôle de focalisation (Q1) permet de déterminer la masse de la molécule qui sera ensuite fragmentée dans une cellule de collision (Q2) par un bombardement avec des molécules d'argon. Les fragments obtenus sont détectés dans un deuxième quadripôle de focalisation (Q3), puis le signal est enregistré et amplifié (cage de Faraday et multiplicateur d'électrons). Lorsque seule la masse moléculaire est requise, il est possible d'utiliser l'un ou l'autre des deux quadripôles de focalisation. Divers logiciels

permettent de visualiser le spectre, d'ajuster les paramètres de collision, de déterminer la masse des fragments, pour enfin identifier la molécule bombardée.

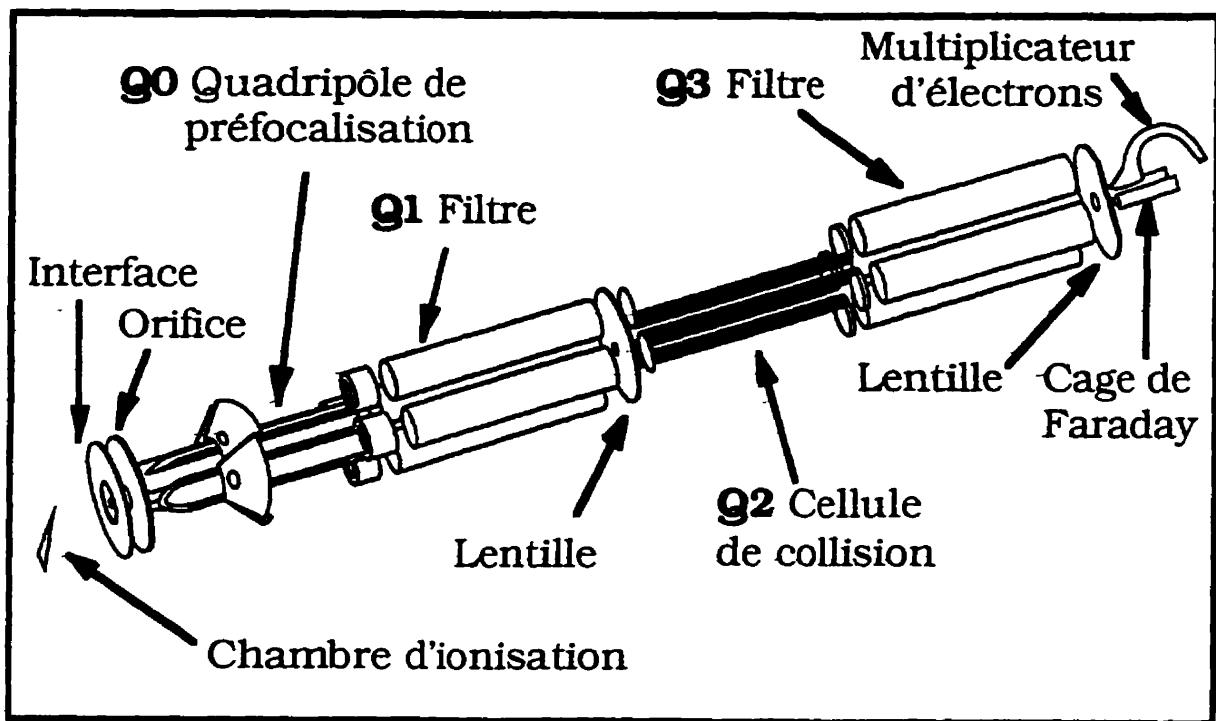


Figure 1 Illustration de la trajectoire des ions dans les diverses composantes du spectromètre de masses (Manuel de la compagnie Sciex, 1994).

La Figure 2 représente le spectre de masses des fragments obtenus d'un des peptides majeurs de l'hydrolysat total de caséines. L'identification du peptide consiste, à l'aide d'un logiciel, à préciser l'enzyme utilisée lors de l'hydrolyse et à déterminer une des caséines et son variant génétique et ce, afin d'obtenir des séquences peptidiques dont la masse se rapproche de celle de la molécule à l'étude (peptides homologues) (Figure 3). Parmi les homologies de séquence en acide aminés suggérées, le peptide retenu possède une masse variant d'au plus 0,5 unité de masse atomique avec celle du peptide à identifier. Lorsqu'une série d'au moins trois masses consécutives correspondent aux masses des fragments obtenus, l'identification du peptide peut alors être validée; autrement, un autre peptide

doit être sélectionné parmi les homologues suggérés ou encore, les critères de sélection doivent être modifiés (enzyme, protéine, variant). L'exemple présenté aux Figures 2 et 3 correspond au peptide 23-34 de la caséine α_{s1} B. La différence entre la masse de deux fragments correspond à la masse d'un résidu d'acide aminé, tel que présenté à la Figure 2. Cette méthode est donc un outil puissant pour l'identification des peptides composant l'hydrolysat complet de caséines, ainsi que les peptides compris dans le matériel adsorbé sur les membranes.

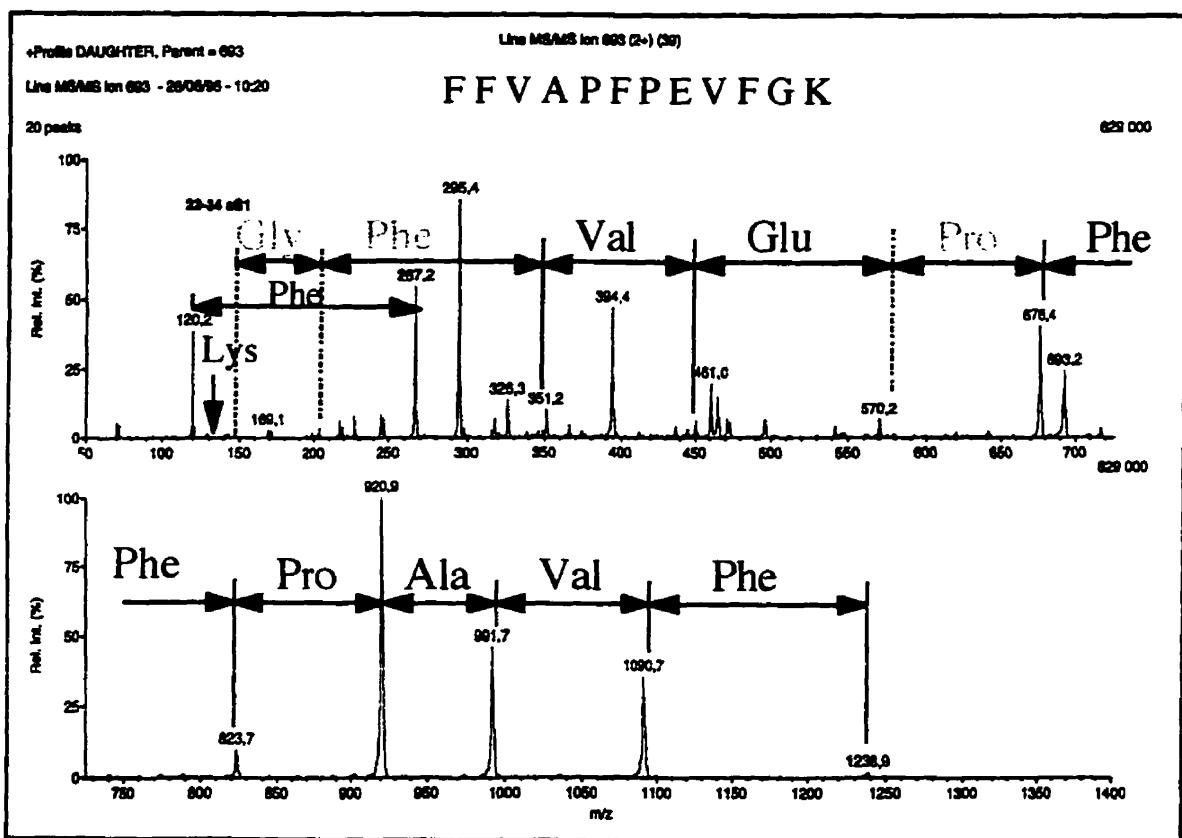


Figure 2 Identification des acides aminés composant un des peptides majeurs de l'hydrolysat total de caséines à partir de la masse des fragments de la molécule obtenus dans la cellule de collision.

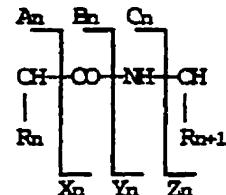
Cas alpha S1 B

Elemental composition: C 72 H 98 N 13 O 15

MH+ Monoisotopic Mass = 1384.73 amu HPLC Index = 95.90
 MH+ Average Mass = 1385.65 amu Bull & Breese value = -5530
 MH+ Nominal Mass = 1384 amu 1 charge(s)

User-Defined Amino Acid Residues:

U - Serine, Phospho



N-Terminus : Hydrogen

C-Terminus : Free Acid

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
 F--F--V--A--P--F--P--E--V--P--G--K
 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

N-terminal Fragments

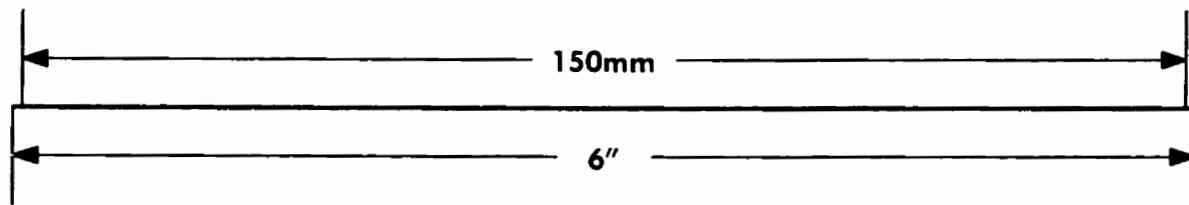
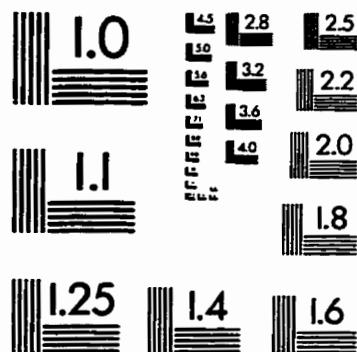
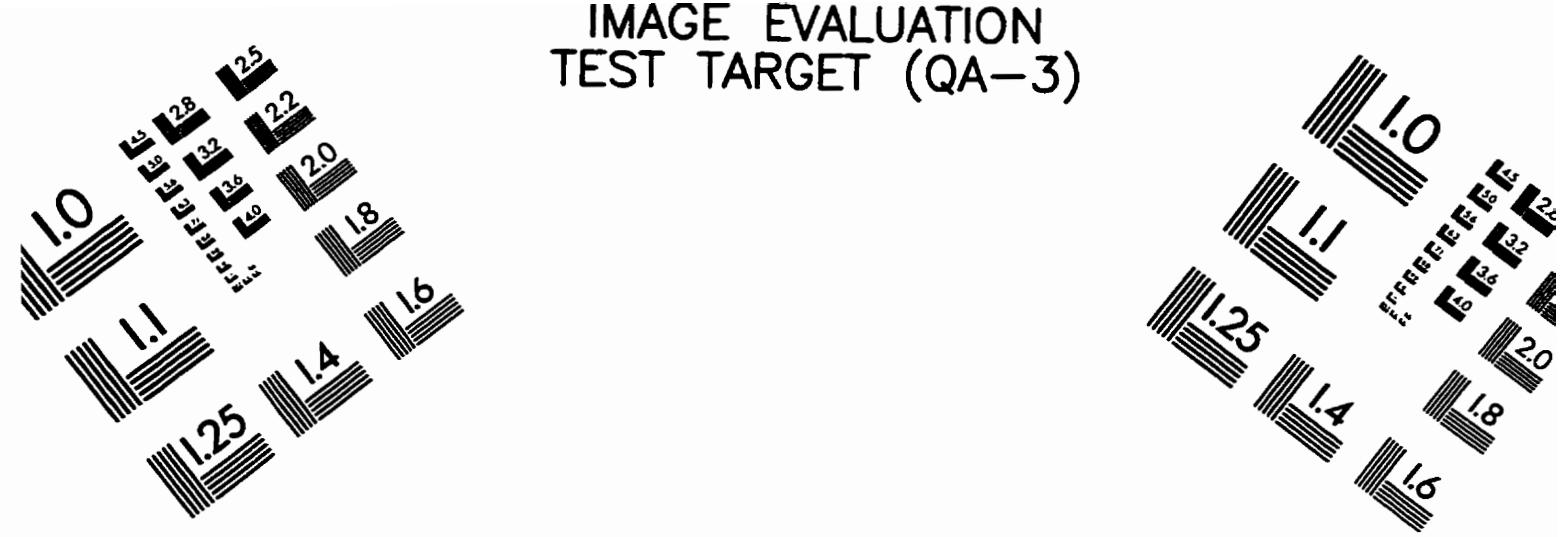
n	a	b	c
0	---	1.01	16.02
1	120.08	148.08	161.09
2	267.15	295.14	310.16
3	366.22	394.21	409.22
4	437.26	465.25	---
5	534.31	562.30	577.31
6	681.38	709.37	---
7	778.43	806.42	821.44
8	907.47	935.47	950.48
9	1006.54	1034.54	1049.55
10	1153.61	1181.60	1196.61
11	1210.63	1238.62	1253.64
12	1338.72	1366.72	---

C-terminal Fragments

n	x	y
12	---	1384.73
11	1263.64	1237.66
10	1116.57	1090.59
9	1017.50	991.53
8	946.47	920.49
7	849.41	823.44
6	702.35	676.37
5	605.29	579.31
4	476.25	450.27
3	377.18	351.20
2	230.11	204.13
1	173.09	147.11
0	45.00	19.02

Figure 3 Séquence en acides aminés et masses des fragments d'un peptide homologue au peptide à identifier.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc.
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved

