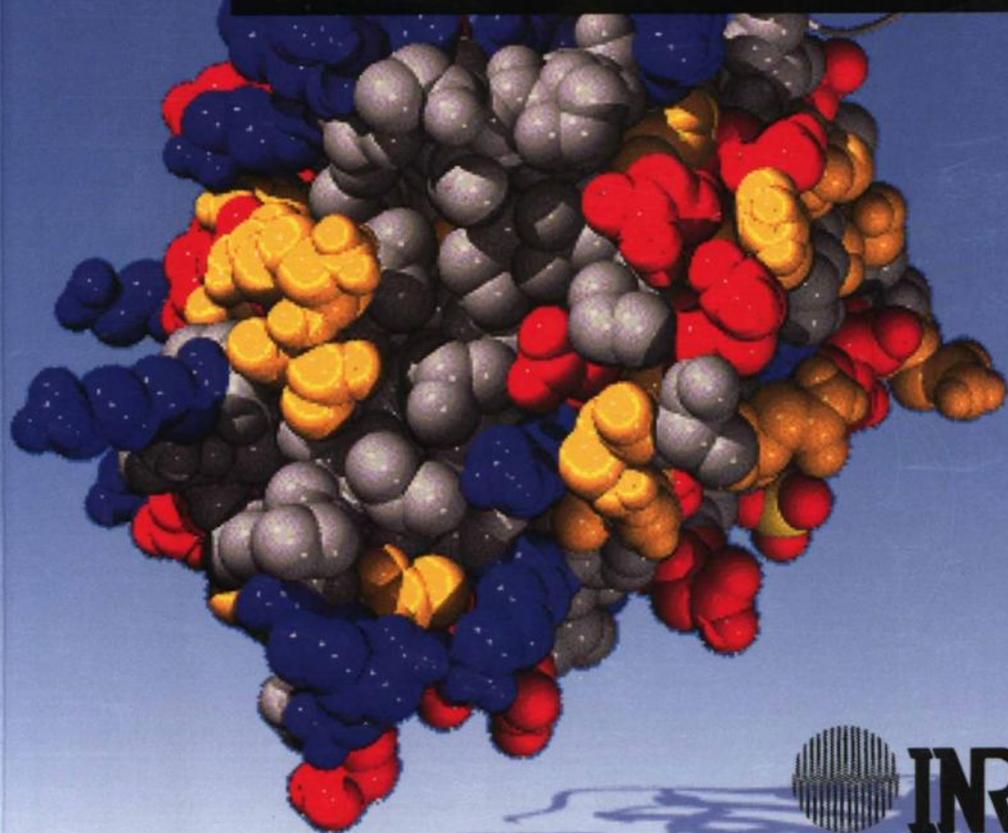


un point sur...

lactoprotéines et lactopeptides

propriétés biologiques

Pierre Jouan



 **INRA**
EDITIONS

Lactoprotéines et lactopeptides

Propriétés biologiques

Pierre Jouan

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
147, rue de l'Université, 75338 Paris Cedex 07

un point sur...

Phytoprotecteurs, protection des plantes, biopesticides

P. BYÉ, C. DESCOINS, A. DESHAYES, coord.
1991, 178 p.

Agricultures et société

C. COURTET, M. BERLAND-DARQUÉ,
Y. DEMARNE, éd.
1993, 326 p.

Élaboration du rendement des principales cultures annuelles

L. COMBE, D. PICARD, coord.
1994, 192 p.

Comportement et bien-être animal

M. PICARD, R.H. PORTER, J.P. SIGNORET,
coord.
1994, 228 p.

Trente ans de lysimétrie en France (1960-1990)

J.C. MULLER, coord.
1996, 392 p.

Teneurs en éléments traces métalliques dans les sols (France)

D. BAIZE
1997, 412 p.

Oiseaux à risques en ville et en campagne Vers une gestion intégrée des populations ?

P. CLERGEAU, coord.
1997, 376 p.

L'information scientifique et technique Nouveaux enjeux documentaires et éditoriaux

P. VOLLAND-NAIL, coord.
1997, 282 p.

Aliments et industries alimentaires : les priorités de la recherche publique

P. FEILLET, coord.
1998, 288 p.

L'homme et l'animal : un débat de société

Arouna P. OUEDRAOGO, P. LE NEINDRE,
coord.
1999, 218 p.

L'eau

G. GROSCLAUDE, coord.

T1. Milieu naturel et maîtrise

1999, 204 p.

T2. Usages et polluants

1999, 210 p.

Environnement et aquaculture

J. PETIT, coord.

T1. Aspects techniques et économiques

1999, 228 p.

T2. Aspects juridiques et réglementaires

2000, 370 p.

Les supports de culture horticoles

P. MOREL, L. PONCET, L.M. RIVIÈRE, coord.
2000, 92 p.

La lutte physique en phytoprotection

C. VINCENT, B. PANNETON,
F. FLEURAT-LESSARD, coord.
2000, 356 p.

Les animaux d'élevage ont-ils droit au bien-être ?

F. BURGAT
avec la collaboration de R. DANTZER
2001, 200 p.

Le bon vivant

Une alimentation sans peur et sans reproche

P. FEILLET
2002, 288 p.

L'organisation vasculaire des Angiospermes : une vision nouvelle

J.-P. ANDRÉ
2002, 144 p.

*À monsieur Jean-Louis Maubois, directeur du laboratoire de recherches
de technologie laitière (Inra), pour ses encouragements et conseils amicaux.*

À Vincent Jouan, pour son aide filiale.

Avant propos

Il est banal de dire et d'écrire que le lait est l'aliment exclusif du nouveau-né. Qu'il soit indispensable à cette période critique de la vie prouve, à l'évidence, qu'il répond intégralement aux besoins physiologiques et biochimiques du nourrisson.

Certaines protéines laitières ont des propriétés nutritionnelles remarquables. Elles le doivent à leur composition en acides aminés, à leur caractère holoprotéique, à leur faible poids moléculaire qui en font des cibles aisées pour les enzymes digestifs. Outre leur capacité nutritive, certaines protéines forment des liaisons sélectives avec des ions minéraux, des acides gras, les vitamines A et D. Elles leur assurent protection, transport et facilitent leur absorption intestinale.

Les protéines du lait peuvent, aussi, être considérées comme des prodrogues. Leur hydrolyse enzymatique génère des lactopeptides doués de propriétés pharmacologiques et thérapeutiques. Des peptides opioïdes, hypotenseurs, antibactériens, anti-thrombiques ont été isolés, identifiés et leurs propriétés biologiques ont été définies. Ces produits « lactaceutiques » devraient, tout naturellement, être la base de la conception d'aliments-santé, de « *Bio-Foods* » ou de « *Functional-Foods* ».

Le lait contient aussi des peptides « orphelins » que l'on peut appeler ainsi, en raison de leur faible concentration. Il s'agit de facteurs de croissance, de cytokines et de chemokines. Ils ne peuvent être négligés en raison de leurs activités biologiques. Ils sont présents dans le lactosérum. Ce co-produit de l'industrie fromagère représente un gisement abondant de protéines et de peptides lactiques.

On dispose actuellement de techniques sélectives et efficaces de séparation, d'isolement, et de purification des protéines et des peptides. Le « *Cracking* » industriel des lactoprotéines et des lactopeptides devrait conduire au développement de produits « lactaceutiques ». Leur exploitation permettrait de valoriser les protéines du lait et de produire des éléments à haute valeur ajoutée. Elle représente un marché d'avenir dans les domaines de la diététique spécialisée et de la prévention de certains troubles métaboliques.

Sommaire

Protéines du lait, protéines de toujours, protéines d'avenir 11
J.-L. Maubois

Le lactosérum

Introduction 19

1. α -lactalbumine 23

- Propriétés physico-chimiques 23
- Composition en acides aminés 24
- Hydrolyse enzymatique 24
- Propriétés nutritionnelles 24
- Liaison α -lactalbumine-polyamines 25
- α -lactalbumine et défense immunitaire 26
- α -lactalbumine et peptide opioïde 26
- α -lactalbumine et hypertension 26
- α -lactalbumine et cancers 27
- Propriétés anti-virales 27
- Propriétés bactéricides 28
- Références bibliographiques 29

2. β -lactoglobuline 31

- Propriétés physico-chimiques 31
- Composition en acides aminés 32
- Hydrolyse enzymatique 32
- Propriétés nutritionnelles 34
- Propriétés vectrices de la β -lactoglobuline 34
- β -lactoglobuline et peptide opioïde 36
- β -lactoglobuline et hypertension 37
- Propriétés anti-virales 37
- Références bibliographiques 39

3. La lactoferrine 43

- Propriétés physico-chimiques 43
- Composition en acides aminés 43

Propriétés nutritionnelles	45
Rôle de la lactoferrine dans l'absorption intestinale du fer	46
Propriétés bactériostatiques de la lactoferrine	47
La lactoferrine	52
Propriétés anti-virales de la lactoferrine	55
Lactoferrine : inflammation – fonction immune	62
Propriétés anti-tumorales	64
Références bibliographiques	66

Les caséines

Introduction	77
4. α_{s1}-caséine	81
Propriétés physico-chimiques	81
Composition en acides aminés	82
Propriétés morphinomimétiques	82
Propriétés hypotensives	83
Propriétés anti-bactériennes et immunostimulantes	85
Liaison à la calmoduline	86
Références bibliographiques	86
5. α_{s2}-caséine	89
Propriétés physico-chimiques	89
Composition en acides aminés	89
Propriétés biologiques	89
Références bibliographiques	91
6. β-caséine	93
Propriétés physico-chimiques	93
Composition en acides aminés	94
Hydrolyse enzymatique	94
Propriétés nutritionnelles	94
Peptides opioïdes : casomorphines	95
Peptides immunostimulants	99
Phosphopeptides	100
Propriétés hypotensives	101
Références bibliographiques	102
7. κ-caséine	109
Propriétés physico-chimiques	109
Composition en acides aminés	110
Hydrolyse enzymatique	111

Propriétés biologiques	111
Références bibliographiques	112
8. Caséinomacropéptide	113
Origine	113
Propriétés physico-chimiques	113
Composition en acides aminés	114
Hydrolyse enzymatique	114
Propriétés nutritionnelles	114
Action sur la régulation de la digestion	115
Propriétés anti-thrombiques	116
Propriétés biologiques diverses	117
Références bibliographiques	117

Conclusion	121
-------------------------	------------

Notions élémentaires sur les acides aminés, les peptides et les protéines	125
--	------------

Protéines du lait, protéines de toujours, protéines d'avenir

J.-L. Maubois

Introduction

Le lait est un milieu extraordinairement complexe. Les biochimistes, les plus experts, estiment que ce liquide doit contenir plus de 100 000 espèces moléculaires différentes. Ces molécules s'assemblent et interagissent au gré de la température, de la lumière ou de la composition de l'atmosphère, dès la sortie de la mamelle. Cette complexité extrême, trouve sa raison d'être, sa finalité, dans le fait que le lait est l'unique réponse alimentaire aux besoins de vie, voire de survie, du jeune mammifère, à la période, peut-être, la plus critique de son existence, celle qui suit sa naissance, période où l'organisme nouveau-né doit tout à la fois entamer une croissance rapide et faire face à une multitude d'agressions externes.

Bien qu'exploitée intuitivement depuis la plus Haute Antiquité, « le fromage présent dans la grotte du cyclope Polyphème, décrit par Homère, n'est-il pas une forme de séparation spécifique de la matière grasse et des protéines du lait de brebis », la fraction protéique du lait a fait, ces vingt dernières années, l'objet de très nombreuses études. Grâce aux connaissances accumulées et à l'extraordinaire développement de technologies de séparations adaptées à leur sensibilité physico-chimique, les protéines du lait sont, sans contestation, le composant « phare » que ce soit en termes de production, de séparation, de purification, de biotransformation et de valorisation dans tous les domaines actuels de la nutrition humaine et ceux futurs de la Nutraceutique.

Quelques rappels sur les protéines laitières

Le lait de vache contient de nombreuses protéines qui sont classiquement regroupées en deux groupes principaux : les caséines, fraction insoluble à pH 4,6 et à 20 °C et les protéines du lactosérum. Le lait de grand mélange, a une teneur en protéines, exprimée par la valeur N x 6,38 de l'ordre de 30-35 g/litre. Environ 78 % de ces protéines sont des caséines, comprenant quatre composants majeurs, dénommés α_1 , α_2 , β et κ , présents dans le rapport suivant : 40 ; 10 ; 35 ; 12. Ces caséines sont organisées, dans le lait, en micelles,

structures dites supramacromoléculaires. Le diamètre des micelles de caséine, constituées à 92 % de protéines et à 8 % de minéraux inorganiques, essentiellement du phosphate de calcium, varie entre 50 et 600 nm, avec une valeur moyenne de 120 nm, ce qui leur donne donc, la propriété de diffracter la lumière, et ainsi de donner au lait sa couleur blanche. La structure des micelles n'est pas établie, faute de méthodologies analytiques adaptées. La stabilité, particulièrement élevée des micelles résulte de deux propriétés : un potentiel électrocinétique de -20 mV et un empêchement stérique créé les segments C-terminaux de la caséine κ glycosylée. La séparation enzymatique de ces segments protubérants par la chymosine, enzyme majeure de l'estomac du nouveau-né, détruit la stabilité des micelles qui s'agrègent pour former un coagulum.

La fraction des protéines du lactosérum contient un très grand nombre de composants. Les principaux, dans le lait bovin, sont la β -Lactoglobuline, l' α -Lactalbumine, la sérum-albumine et les Immunoglobulines avec des teneurs respectives de : 2,7-1,2-0,25-et 0,65 g/litre. Les autres protéines dites mineures en raison de leur faible contenu sont l'objet d'un intérêt croissant du fait de leurs propriétés bioactives. Certaines comme la Lactoferrine et la Lactoperoxydase font l'objet d'une production industrielle.

Le schéma joint résume les voies de séparation et de purification des principales protéines laitières.

Séparation et valorisation des caséines

La caséine entière est préparée industriellement par précipitation au pI – caséine dite isoélectrique – ou par coagulation enzymatique – caséine dite présure – depuis plus de 80 ans. Quelques améliorations de procédé : coagulation en ligne, et enrichissement en protéines du lait de fabrication par UF, ont été apportées, ces dernières années dans la production de caséine présure dont les débouchés sont l'industrie des pizzas, à plus de 90 % mais aussi des marchés-niches : boutonnerie de la haute couture (à partir de galalithe : caséine présure formolée) ; tissu (à partir de Lanital). En raison des difficultés de valorisation du co-produit résultant de la fabrication traditionnelle de la caséine isoélectrique, le lactosérum acide, de nouvelles techniques de production basées sur les propriétés d'échange d'ions des micelles (substitution des ions Ca par des protons à l'aide de résines échangeuses ou par électrodialyse) ont été proposées ces dernières années. Outre une amélioration légère des rendements de précipitation, elles conduisent à un co-produit plus facilement commercialisable. L'essentiel de la caséine isoélectrique est commercialisé sous forme de caséinates alcalins, utilisés en tant qu'ingrédients dans des industries agroalimentaires dites d'aval : charcuterie, salaisonnerie, panification, plats cuisinés, fromages fondus...

Mais le procédé de séparation le plus prometteur est certainement, celui qui conduit à l'obtention de caséine micellaire sous sa forme native. La mise en contact du lait écrémé avec une membrane de microfiltration ayant un diamètre

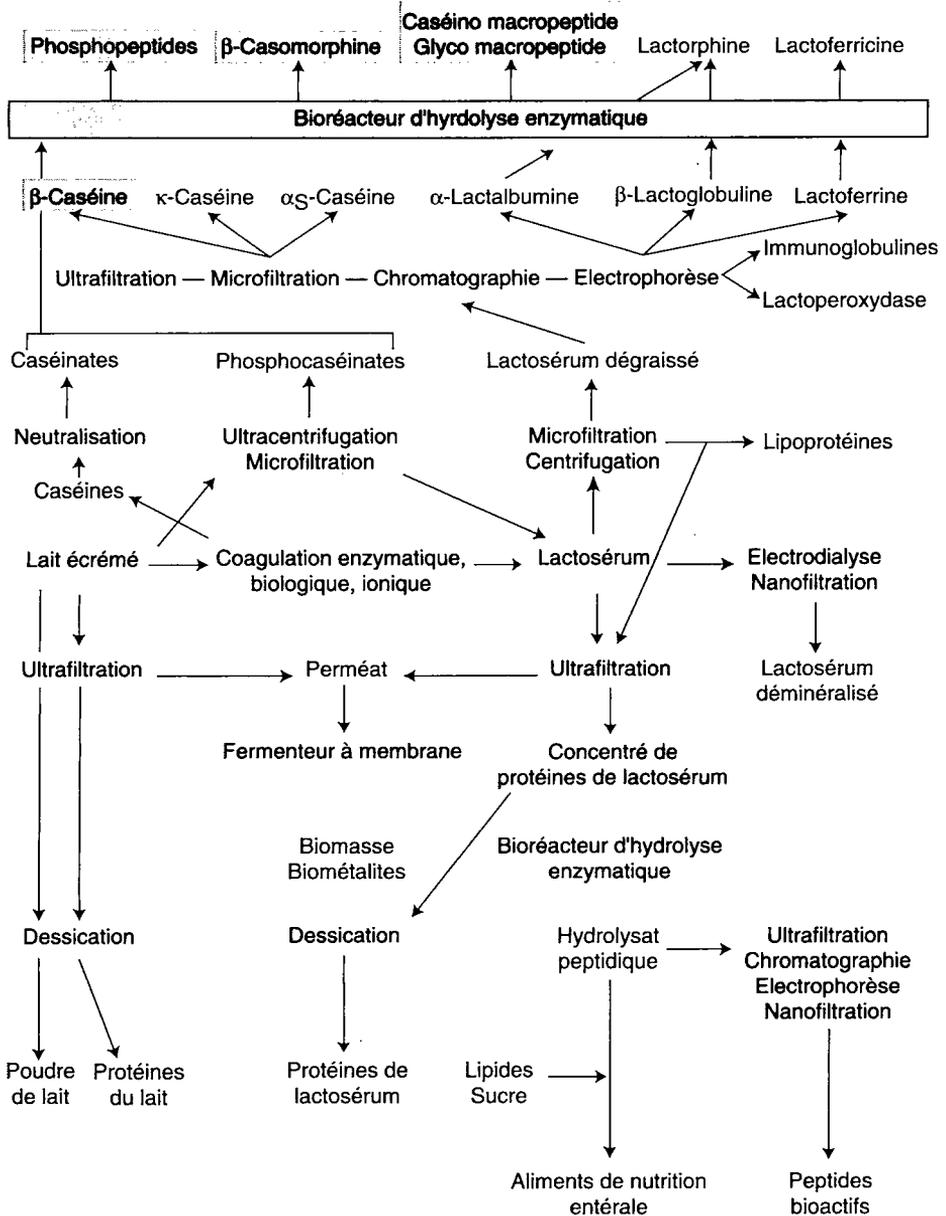


Schéma de séparation des principales protéines du lait.

moyen de pores de 0,1 µm permet d'obtenir dans le liquide retenu par la membrane appelé « rétentat » après diafiltration, une solution purifiée de caséine micellaire. Cette technologie conçue et développée par notre groupe (Fauquant *et al.*, 1988 ; Schuck *et al.*, 1994) est de plus en plus utilisée tant en France qu'à l'étranger car le produit obtenu, utilisable tant à l'état liquide (en fromagerie, par exemple) qu'à l'état de poudre présente d'excellentes propriétés technico-fonctionnelles : pouvoir liant, pouvoir moussant, pouvoir

émulsifiant... Sur un autre plan, l'enrichissement partiel du lait en caséine micellaire par cette technologie selon un procédé breveté par l'INRA conduit à pallier les effets dommageables du traitement thermique appliqué aux constituants du lait lors de sa transformation en poudre. Une nouvelle poudre destinée aux pays consommateurs de fromages mais à production laitière insuffisante, a ainsi été développée. Elle permet, après reconstitution, la transformation en toutes les variétés de fromages.

De nombreuses études actuelles, concernent la mise au point de procédés de séparation des caséines individuelles. Les protéines cibles sont essentiellement la caséine β et la caséine α_1 en raison de leurs intérêts potentiels dans les formulations de laits infantiles (la caséine du lait de femme a une teneur double en caséine β par rapport au lait bovin) et dans les procédés d'isolement de peptides bioactifs.

Séparation et valorisation des protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum sont et de loin, les protéines les plus adaptées à la nutrition des êtres humains. Elles sont les protéines de référence contenant tous les acides aminés essentiels dans les proportions optimales. Mais ce groupe très complexe de protéines n'est présent dans le co-produit de la transformation du lait en fromage ou en caséine « le lactosérum » qu'en faible concentration : 0,6 %. Aussi jusqu'à la fin des années 60, n'était-il que peu ou pas séparé et valorisé.

Avec l'émergence de l'ultrafiltration sur membrane, l'industrie laitière mondiale a réalisé une avancée technologique majeure dans la valorisation de cette fraction protéique. Les membranes utilisées, en matériau polymère ou en céramique, réalisent, en effet, la séparation différentielle et la concentration sélective, des seules protéines et ce, à basse température, avec une consommation énergétique très modérée. Les surfaces de membranes UF, installées dépassent maintenant les 300 000 m², c'est dire que l'ultrafiltre est devenu, en matière d'équipement des laiteries aussi courant que l'écumeuse ou le pasteurisateur à plaques. Toute une palette de produits est, actuellement, commercialisée : concentrés de protéines de lactosérum « CPL » ayant un rapport N \times 6,38/Matière sèche variant entre 0,35 et 0,75 ; isolats de protéines « WPI » avec ce même rapport dépassant 0,90. Les débouchés utilisant tant les qualités nutritionnelles que les propriétés technico-fonctionnelles uniques de ces protéines (solubilité sur toute l'échelle de pH, pouvoirs moussant, gélifiant, émulsifiant, structuration et rétention de l'eau) concernent les industries de la nutrition infantile, de la panification, de la pâtisserie, de la charcuterie, des crèmes glacées, des boissons, des potages, des sauces... Près de 40 % du lactosérum produit par les grands pays laitiers est maintenant traité par ultrafiltration.

Comme pour les caséines, de nombreux travaux actuels sont dédiés à la mise au point de procédés industriels de séparation et de purification des protéines

individuelles de lactosérum. Le pI très basique (9,0 et 9,5 respectivement) de la lactoferrine et de la lactoperoxydase est la propriété utilisée pour leur production industrielle. Les propriétés bactériostatiques et bactéricides de ces protéines sont mises à profit dans les formulations de bains de bouche ou dans l'effet sanitation des nouveaux chewing-gums. La polymérisation réversible, sous traitement thermique modéré de la forme apo (forme dépourvue de l'ion Ca), est utilisée dans les procédés de séparation de la β -lactoglobuline. Outre les marchés concernés par les propriétés de gélification de cette protéine, les débouchés potentiels utiliseraient les propriétés de transport de cette protéine appartenant à la famille des lipocallines : transport de molécules aromatiques, d'acides gras essentiels voire de phéromones. Nombre d'études ont trait aussi à la séparation de l' β -lactalbumine, non seulement parce que c'est la protéine majeure du lactosérum humain (d'où un large débouché dans les formulations infantiles les plus adaptées) mais aussi pour ses propriétés bioactives. L' α -lactalbumine du fait de sa richesse en tryptophane est considérée comme la molécule précurseur des hormones cérébrales : la sérotonine. Son identité de structure avec les molécules de la reproduction chez le mâle lui confère des activités contraceptive et spermicide et aussi, semble-t-il, une forte propriété apoptotique (mort induite) spécifique des cellules cancéreuses du poumon.

Fragmentation enzymatique des protéines laitières

Toutes les protéines du lait contiennent des séquences peptidiques possédant une activité biologique. Les premières études réalisées, il y a une vingtaine d'années ont montré que les protéines majeures du lait contenaient des séquences à activité opioïde, dénommées exorphines. Les plus caractérisées, sont les β -casomorphines. Cette famille de peptides comprenant de quatre à sept acides aminés avec une séquence N-terminale commune Tyr-Pro-Phe-Pro est très résistante aux enzymes du tractus gastrointestinal et est retrouvée dans l'intestin après ingestion de lait et aussi dans le plasma sanguin des femmes enceintes et allaitantes ainsi que des nourrissons. Sur modèles animaux, ces peptides ont montré l'ensemble des activités opioïdes, c'est-à-dire régulation du transport des électrolytes (activité anti-diarrhée), diminution de la douleur, induction du sommeil.

Les caséines α_{s1} , α_{s2} et β contiennent des enchaînements uniques de résidus phosphoséryls qui ont la propriété de séquestrer fortement les oligo-éléments, propriété mise à profit dans des formulations diététiques d'apport de calcium ou de fer, hautement assimilable. D'autres peptides issus de l'hydrolyse tryptique des caséines α_s et β ont montré tant *in vitro* qu'*in vivo* une activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et sont donc à même d'intervenir dans la régulation de la pression sanguine artérielle. La partie C-terminale de la caséine κ , appelée glycomacropeptide a été montrée par 3 équipes de l'INRA, comme ayant une activité inductrice de la sécrétion de la cholécystokinine (hormone digestive régulant la contraction de la vésicule biliaire et la sécrétion des enzymes pancréatiques). Cette propriété est déjà mise

à profit par des firmes diététiques américaines pour proposer des formulations tant coupe-faim que « facilitatrices » de la digestion des graisses. Le fragment N-terminal de ce glycomacropéptide possède la propriété de bloquer les récepteurs spécifiques des chaînes γ du fibrinogène qui apparaissent sur les plaquettes sanguines au cours du processus de la coagulation du sang. Il a donc une propriété dite antithrombotique. Enfin, très récemment une société laitière française a annoncé la mise prochaine en marché d'un peptide dérivé de la caséine α_{s1} présentant une activité anti-stress démontrée.

Les procédés de séparation et de purification de ces peptides utilisent pour la plupart la technologie du réacteur enzymatique développée par l'INRA, il y a plus de vingt ans. Ils sont évidemment protégés par de multiples brevets.

Conclusion

Le lait est, sans contestation aucune, une source unique pour les êtres humains de protéines de haute qualité, présentant des propriétés incomparables, tant sur le plan nutritionnel que sur le plan de la technofonctionnalité. Les acquis décrits à ce jour pour ce qui est des activités biologiques et ceux qui peuvent être espérés à partir des études en cours ont ouvert un nouveau champ d'utilisation dans ce qu'il est convenu d'appeler l'alimentation-prévention. Le XXI^e siècle devrait voir proposer à tous les consommateurs que nous sommes, toute une nouvelle palette de produits de présentation traditionnelle : laits fermentés, fromages, laits-boissons... mais enrichis en protéines ou/et en peptides nous permettant de nous maintenir en bonne santé.

Références bibliographiques

Fauquant J., Maubois J.L., Pierre A., 1988. Microfiltration du lait sur membrane minérale. *Tech. lait.* 1028 : 21-23.

Schuck P., Piot M., Méjean S., Le Graet Y., Fauquant J., Brulé J., Maubois J.L., 1994. Deshydratation par atomisation de phosphocaséinate natif obtenu par microfiltration sur membrane. *Le lait.* 74 : 375-388.

Le lactosérum

