



UMRt BioEcoAgro

Département des sciences des aliments

Institut Charles Viollette

Institut sur la Nutrition et les Aliments
Fonctionnels

Université de Lille, Lille, France

Université Laval, Québec, Canada Faculté des
études supérieures et postdoctorales

École doctorale Sciences de la Matière, du
Rayonnement et de l'Environnement

THÈSE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE - SCIENCES ET TECHNOLOGIES

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LAVAL – SCIENCES DES ALIMENTS

Spécialité : Biotechnologies agroalimentaires, Sciences De L'aliment, Physiologie

Soutenance publique le 7 avril 2025 par :

Hélorie Clouzot

Approche combinée des champs électriques pulsés et de l' α -chymotrypsine immobilisée pour l'obtention de peptides à activités biologiques à partir de protéines agroalimentaires

JURY

Pr. Federico Casanova	Professeur, Université de Danemark, Danemark	Rapporteur
Pr. Romain Kapel	Professeur, Université de Lorraine, France	Rapporteur
Dre. Marie-Pierre Belleville	Professeure, Université de Montpellier, France	Examinatrice
Pre. Lucie Beaulieu	Professeure, Université Laval, Canada	Examinatrice et présidente du jury
Pr. Renato Froidevaux	Professeur, Université de Lille, France	Directeur de thèse
Pr. Sergey Mikhaylin	Professeur, Université Laval, Canada	Directeur de thèse

Résumé

La valorisation des ressources agroalimentaires constitue un enjeu majeur dans un contexte de transition vers des systèmes de production plus durables et efficaces. Les protéines agroalimentaires, en raison de leur abondance, se positionnent comme des substrats de choix pour le développement de produits à haute valeur ajoutée. L'hydrolyse enzymatique constitue une voie prometteuse pour la valorisation des protéines en peptides bioactifs. Toutefois, son efficacité demeure limitée par la structure native des protéines et le coût élevé des biocatalyseurs. Dans ce contexte, cette étude explore l'effet des Champs Électriques Pulsés (CEP) comme prétraitement pour améliorer l'hydrolyse enzymatique de l' α -lactalbumine bovine (α -LA) et des Protéines de Pois (PP), en comparaison avec un prétraitement thermique (75°C). Une approche par étape a été adoptée : l' α -LA, protéine modèle bien caractérisée, a servi de preuve de concept avant d'étendre l'étude aux PP, un mélange protéique plus complexe et particulièrement pertinent pour les applications industrielles. L'hydrolyse a été réalisée avec l' α -chymotrypsine (α -CT), sous forme libre et immobilisée sur un support d'alumine fonctionnalisée à l'aide de dopamine. Cette approche a permis d'analyser l'impact combiné des CEP et de l' α -CT immobilisée sur l'efficacité du processus d'hydrolyse. L'identification et la caractérisation des hydrolysats peptidiques ont été effectuées par chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem afin d'évaluer les modifications du schéma d'hydrolyse induites par ces traitements.

Les résultats montrent que l'efficacité des CEP varie selon la nature de la protéine et les paramètres appliqués. Pour l' α -LA, une force de champs de 15 kV/cm avec 75 impulsions a induit une dénaturation contrôlée, augmentant la surface hydrophobe et l'exposition des groupements -SH, ce qui a doublé le degré d'hydrolyse (DH) et augmenté de 200 % l'abondance relative des peptides produits. Le prétraitement thermique à 75 °C a conduit à une dénaturation plus marquée, multipliant par 4 le DH, mais avec une augmentation moindre de l'abondance relative des peptides (+128 %), soulignant que le DH seul n'est pas un indicateur suffisant de l'efficacité du processus. À l'inverse, pour les PP, des conditions plus modérées (10 kV/cm, 19 impulsions) ont favorisé une dénaturation bénéfique, augmentant le DH d'un facteur 1,6 et l'abondance relative des peptides de 140 %. Une force de champs trop

élevée a cependant mené à une agrégation excessive, réduisant l'accessibilité enzymatique, un phénomène comparable au traitement thermique.

L'étude a également examiné l'impact de l'immobilisation enzymatique de l' α -CT (alumine@CTMS@APTES@DOP-CT) dans le cadre de l'hydrolyse des protéines. Concernant l' α -LA, l'immobilisation a permis une extension de la couverture de séquence de 26 %, favorisant la production de peptides plus longs et enrichis en régions proches des ponts disulfures. Pour les PP, cette approche a induit une diversification substantielle du spectre peptidique, avec la génération de 511 nouveaux peptides, représentant 28 % du total, contre seulement 8 % en présence de l' α -CT sous forme libre. Parmi ces peptides, de nombreuses séquences présentent un potentiel antihypertensif et antidiabétique inédit. Ces résultats révèlent une redistribution des sites de clivage enzymatique dont l'intensité et la nature varient selon la complexité du substrat protéique.

Finalement, les CEP et l'immobilisation enzymatique apparaissent comme des stratégies complémentaires s'imposant comme une alternative innovante aux traitements thermiques conventionnels, d'autant plus que l'analyse de l'éco-efficience a démontré les bénéfices des CEP sous conditions ajustées. Cette stratégie intégrée a donc un potentiel pour une valorisation durable et performante des ressources protéiques agroalimentaires à l'échelle industrielle.

Abstract

The valorization of agro-food resources is a major challenge in the transition towards more sustainable and efficient production systems. Agri-food proteins, due to their abundance, represent ideal substrates for the development of high value-added products. Enzymatic hydrolysis is a promising approach for converting proteins into bioactive peptides. However, its efficiency remains limited by the native structure of proteins and the high cost of biocatalysts. In this context, this study explores the effect of Pulsed Electric Fields (PEF) as a pretreatment to enhance the enzymatic hydrolysis of bovine α -lactalbumin (α -LA) and Pea Proteins (PP), in comparison with thermal pretreatment (75°C). A stepwise approach was adopted: α -LA, a well-characterized model protein, served as a proof of concept before extending the study to PP, a more complex protein mixture particularly relevant for industrial applications. Hydrolysis was carried out using α -chymotrypsin (α -CT), in both free and immobilized forms, on an alumina support functionalized with dopamine. This approach allowed the assessment of the combined impact of PEF and immobilized α -CT on hydrolysis efficiency. The identification and characterization of peptide hydrolysates were performed using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry to evaluate the modifications in the hydrolysis pattern induced by these treatments.

The results show that the effectiveness of PEF varies depending on the protein type and the applied parameters. For α -LA, an electric field strength of 15 kV/cm with 75 pulses induced controlled denaturation, increasing hydrophobic surface exposure and -SH group accessibility, which doubled the degree of hydrolysis (DH) and increased the relative abundance of peptides by 200%. Thermal pretreatment at 75°C led to more pronounced denaturation, quadrupling the DH, but with a smaller increase in peptide abundance (+128%), highlighting that DH alone is not a sufficient indicator of process efficiency. Conversely, for PP, milder conditions (10 kV/cm, 19 pulses) promoted beneficial denaturation, increasing the DH by a factor of 1.6 and the relative abundance of peptides by 140%. However, excessive field strength led to excessive aggregation, reducing enzymatic accessibility, a phenomenon similar to thermal treatment.

The study also examined the impact of α -CT enzyme immobilization (alumina@CTMS@APTES@DOP-CT) in the context of protein hydrolysis. For α -LA,

immobilization extended sequence coverage by 26%, favoring the production of longer peptides enriched in regions near disulfide bonds. For PP, this approach induced a substantial diversification of the peptide spectrum, generating 511 new peptides, representing 28% of the total, compared to only 8% in the presence of free α -CT. Among these peptides, many sequences exhibit novel antihypertensive and antidiabetic potential. These results reveal a redistribution of enzymatic cleavage sites, with intensity and nature varying according to the complexity of the protein substrate.

Ultimately, PEF and enzyme immobilization emerge as complementary strategies, presenting an innovative alternative to conventional thermal treatments, especially since eco-efficiency analysis demonstrated the benefits of PEF under optimized conditions. This integrated strategy holds significant potential for the sustainable and efficient valorization of agri-food protein resources on an industrial scale.

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>ii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i>	<i>vi</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>ix</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>xiii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>xiv</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xvii</i>
<i>Avant-propos</i>	<i>xx</i>
<i>Introduction générale</i>	<i>1</i>
1. Chapitre 1 - État de l'art	4
1.1. Les protéines et leur valorisation : contexte général	4
1.1.1. Introduction aux protéines.....	4
1.1.2. Valorisation des protéines agroalimentaires	6
1.2. Le lactosérum et ses protéines	9
1.2.1. La place de l'industrie laitière.....	9
1.2.2. Le lactosérum	9
1.3. Le pois et ses protéines	20
1.4. Production de peptides : méthodes, bioactivités et enjeux	33
1.4.1. Méthodes de production des peptides bioactifs	33
1.4.2. Peptides à activité antihypertensive et antidiabétique.....	36
1.5. Amélioration de l'hydrolyse enzymatique pour la production de peptides bioactifs 42	
1.5.1. Prétraitements technologiques des protéines	45
1.5.2. L'immobilisation enzymatique	52
2. Chapitre 2 – Contexte du projet	62
2.1. Problématique	62
2.2. Hypothèse de recherche	63
2.3. Objectifs spécifiques	63
3. Chapitre 3 - Prétraitement de l'alpha-lactalbumine par champ électrique pulsé : impact sur la production de peptides à potentiel antihypertenseur et antidiabétique	64
3.1. Transition contextuelle	64
3.2. Résumé	64
3.3. Publication	65
3.4. Abstract	66

3.5. Introduction	66
3.6. Materials and Methods	68
3.6.1. Materials.....	68
3.6.2. Configuration of PEF	69
3.6.3. α -lac pretreatment protocol by PEF	70
3.6.4. Enzymatic hydrolysis of α -lac	71
3.6.5. Determination of Degree of Hydrolysis (DH)	71
3.6.6. Determination of Eco-efficiency.....	72
3.6.7. Circular Dichroism (CD) spectroscopy.....	74
3.6.8. Determination of accessible sulfhydryl groups.....	74
3.6.9. Surface hydrophobicity	75
3.6.10. UPLC-MS/MS analyses.....	76
3.6.11. Screening of antihypertensive and antidiabetic potential of peptide hydrolysates of α -lac..	76
3.6.12. Statistical analyses	77
3.7. Results and Discussion	79
3.7.1. Impact of PEF pretreatment on the DH of α -lac.....	79
3.7.2. Impact of PEF pretreatment on eco-efficiency (EE).....	81
3.7.3. Effect of PEF on the secondary structure of α -lac	83
3.7.4. Effect of PEF on the tertiary structure of α -lac.....	86
3.7.5. Peptide population of final hydrolysates.....	92
3.8. Conclusion and perspectives.....	101
4. <i>Chapitre 4 - Application séquentielle de champs électriques pulsés et immobilisation covalente de chymotrypsine sur des particules d'alumine pour la production de peptides bioactifs aux propriétés antihypertensives et antidiabétiques à partir d'alpha-lactalbumine.....</i>	103
4.1. Transition contextuelle.....	103
4.2. Résumé.....	104
4.3. Publication.....	104
4.4. Abstract	105
4.5. Introduction	105
4.6. Materials and Methods	108
4.6.1. Materials.....	108
4.6.2. Processing of α -LA: Pretreatment and hydrolysis with immobilized α -CT	108
4.6.3. Characterization of alumina-supported immobilized enzyme and the resulting hydrolysates from pretreated and untreated α -LA.....	115
4.6.4. Characterization of α -LA Hydrolysis Catalyzed by Immobilized α -CT.....	118
4.6.5. Statistical analysis	120
4.7. Results and Discussion	120
4.7.1. Characterization of modified alumina particles	120
4.7.2. Enzymatic Activity and Storage Stability of Immobilized α -CT	123
4.7.3. Recyclability study of immobilized α -CT	125
4.7.4. Comprehensive Characterization and Functional Analysis of Peptides	127
4.8. Conclusion and perspectives.....	134
5. <i>Chapitre 5 - Amélioration de l'hydrolyse des protéines commerciales de pois grâce à la combinaison de champs électriques pulsés et d'immobilisation covalente de α-chymotrypsine sur des particules d'alumine.....</i>	137

5.1.	Transition contextuelle.....	137
5.2.	Résumé.....	137
5.3.	Publication.....	138
5.4.	Abstract	139
5.5.	Introduction	139
5.6.	Materials and Methods	141
5.6.1.	Materials.....	141
5.6.2.	Pulsed Electric Field (PEF) system.....	141
5.6.3.	Pea protein pretreatment protocol and hydrolysis by free and immobilized chymotrypsin	142
5.6.4.	Structural characterization of PP by pretreatments.....	145
5.6.5.	Determination of the degree of hydrolysis (DH)	147
5.6.6.	Determination of process eco-efficiency	147
5.6.7.	Peptide identification by RP-UPLC-MS/MS	149
5.6.8.	Screening of antihypertensive and antidiabetic activities of peptide hydrolysates of pea proteins	150
5.6.9.	Statistical analyses	151
5.7.	Results and Discussion	152
5.7.1.	Structural modifications of PP by pretreatments	152
5.7.2.	Impact of PEF pretreatment on the DH of PP.....	160
5.7.3.	Impact of PEF pretreatment on eco-efficiency (EE).....	163
5.7.4.	PP peptide hydrolysates	165
5.8.	Conclusion and perspectives.....	174
5.9.	Supplementary Material.....	176
6.	<i>Chapitre 6 – Discussion Générale.....</i>	<i>178</i>
	<i>Conclusion générale et perspectives</i>	<i>187</i>
	<i>Bibliographie.....</i>	<i>192</i>

Liste des figures

Figure 1.1. Les différentes structures des protéines (Morris et al., 2022).....	4
Figure 1.2. Pyramide des valorisations des protéines agroalimentaires (Bergé, 2008).....	7
Figure 1.3. Schéma simplifié de l'obtention du lactosérum à partir du lait frais (adapté de de Wit, 2001).....	11
Figure 1.4. Les différents procédés de valorisation du lactosérum (adapté de (Soumati et al., 2023).....	15
Figure 1.5. Représentation graphique de l'architecture secondaire de l' α -LA, inspirée des travaux de Farrell et al,(2002). L'organisation structurale est illustrée par des formes géométriques : les hexagones symbolisent les hélices α , les carrés les feuillets β et les cercles les boucles.....	17
Figure 1.6. Structure tertiaire de l' α -LA humaine observée aux rayons X, montrant l'emplacement des liaisons disulfures (jaune) et des sites de liaisons au calcium (rouge)..	18
Figure 1.7. Évolution du nombre de publications sur les peptides bioactifs dérivés de l' α -LA hydrolysée par diverses enzymes entre 1989 et 2025.....	18
Figure 1.8. Extraction d'un isolat de PP par extraction alcaline suivie d'une précipitation (Boye et al., 2010 et Lam et al., 2018)	25
Figure 1.9. Représentation des structures des globulines de pois : (a) légumine, (b) viciline et (c) conviciline. Ces structures sont des exemples de la diversité structurale de ces protéines (Uniprot).....	28
Figure 1.10. Représentation des structures des albumines de pois : (a) PA1a et (b) PA1b (Uniprot).....	30
Figure 1.11. Évolution du nombre d'études sur les peptides bioactifs issus des PP depuis 1993	31
Figure 1.12. Schéma de la méthode de production des peptides bioactifs (Cruz-Casas et al., 2021).....	33
Figure 1.13. Mécanisme d'action du peptide antihypertenseur sur le système rénine/angiotensine et le système kallikréine/kinine. ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine II (Bechaux et al., 2019).	37
Figure 1.14. Représentation schématique des mécanismes hypoglycémisants des peptides inhibiteurs de la DPP-IV (Zhang et al., 2024).....	39
Figure 1.15. Processus d'hydrolyse enzymatique : Interaction enzyme-substrat et libération des produits.....	43
Figure 1.16. Dynamique catalytique des protéases à sérines : étapes du mécanisme réactionnel (Hedstrom, 2002).....	53

Figure 1.17. Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation. CLEA : Cross-Linked Enzyme Aggregates, soit agrégats d'enzymes réticulés (Liu et al., 2018)	55
Figure 3.18. Diagram of the high-voltage electrical system equipped with a PEF for pretreating α -lac solutions (1% w/v): (1) Modulation cabinet with controls containing a high-voltage generator and a modulator, (2) cylindrical reservoir for feeding the α -lac solution, (3) peristaltic pump, (4) α -lac solution (1% w/v), (5) treatment chamber, (6) safety ground, (7) ceramic insulating plates, (8) ground electrodes, (9) high-voltage electrodes, (\rightarrow) flow of the α -lac solution.	69
Figure 3.19. Chymotryptic DH of native α -lac, heat-pretreated, and PEF-pretreated, as a function of reaction time.....	79
Figure 3.20. Comparative effect of thermal pretreatment (positive control) and PEF on the eco-efficiency of α -lac solution.....	82
Figure 3.21. Concentrations of accessible sulfhydryl groups for native, heat-pretreated (75, 85, 90 °C) and pretreated via PEF conditions α -lac solutions (condition 1: 10 kV/cm and 75 pulses, condition 2: 15 kV/cm and 75 pulses, condition 3: 10 kV/cm and 37 pulses, condition 4: 15 kV/cm and 37 pulses, and condition 5: 20 kV/cm and 37 pulses).	86
Figure 3.22. Surface hydrophobicity (H_0) of native, heat-pretreated (75, 85, 90 °C) and PEF-pretreated α -lac (condition 1: 10 kV/cm and 75 pulses, condition 2: 15 kV/cm and 75 pulses, condition 3: 10 kV/cm and 37 pulses, condition 4: 15 kV/cm and 37 pulses, and condition 5: 20 kV/cm and 37 pulses).	89
Figure 3.23. Hierarchical clustering of pretreatment conditions (native, thermal and PEF) and non-specific peptides obtained from chymotrypsin digestion, with similarities measured by Euclidean distance and displayed in a heat map. The color scale indicates the relative abundance of peptide ions: red represents up-regulation, while blue indicates down-regulation.	92
Figure 3.24. Comparison of peptide coverage and α -lac cleavage sites without (A) and with (B) specific α -chymotrypsin selectivity. The letters represent the 123 amino acids of α -lac. The numbers on the left and right indicate the position of the amino acids in the α -lac sequence. Letters in red represent primary α -chymotrypsin cleavage targets, while letters in orange represent secondary α -chymotrypsin cleavage targets. Arrows indicate peptides, with blue arrows representing peptides identified with specific α -chymotrypsin selectivity, and grey arrows representing peptides obtained without specific α -chymotrypsin selectivity. Green highlighting represents sequence coverage of α -lac.	94
Figure 3.25. Schematic representation of α -lac's secondary structure, adapted from Farrell et al. (2002) and Li et al. (2022). Amino acids in red represent primary targets of chymotrypsin, while those in orange indicate secondary targets. Amino acids in hexagons correspond to alpha helices, those in squares to beta sheets, and those in circles to loops. Amino acids highlighted in yellow indicate bioactive or potentially bioactive peptides, while those highlighted in grey represent peptides identified without bioactivity.	98
Figure 3.26. Normalized relative abundance of undocumented potential antihypertensive and antidiabetic peptides across experimental conditions, highlighting distinct variations compared to documented peptides.	99

Figure 4.27. Process workflow for the characterization of immobilized chymotrypsin and its use in the enzymatic hydrolysis of pre-treated α -LA (native, heat- and PEF-pretreated)..	109
Figure 4.28. Schematic representation of the immobilized α -CT production steps, (A) using DOP and (B) using GA.....	111
Figure 4.29. SEM images of particles: (A) alumina, (B) alumina@CTMS@APTES-DOP@CT, (C) alumina@CTMS@APTES-GA@CT, and zoomed views of their respective surfaces to observe surface morphology (D, E, and F).	122
Figure 4.30. Evolution of enzymatic activity (native, alumina@CTMS@APTES-DOP@CT, and alumina@CTMS@APTES-GA@CT) during storage at 4 °C over time (days). Differences between points are statistically significant ($p < 0.05$).....	125
Figure 4. 31. Evolution of the enzymatic activity of alumina@CTMS@APTES-DOP@CT over repeated usage cycles.	127
Figure 4.32. Mapping of cleavage sites and Peptide Coverage of α -LA. The letters represent the 123 amino acids of α -LA, with the numbers on the left and right indicating their position in the sequence. Red letters denote the primary cleavage sites of α -CT, while orange letters indicate the secondary cleavage sites. Arrows illustrate the peptides generated by hydrolysis. The green highlight represents the peptide coverage within the α -LA sequence.....	128
Figure 4.33. Schematic of the secondary structure of α -LA, adapted from (Hélorie, article 1). Amino acids in red correspond to the primary cleavage sites of chymotrypsin, while those in orange indicate the secondary sites. The shape of the symbols distinguishes the different secondary structures: hexagons represent α -helices, squares correspond to β -sheets, and circles indicate loops. Amino acids highlighted in yellow mark bioactive or potentially bioactive peptides, while those highlighted in gray represent identified peptides with no known biological activity.	130
Figure 4.34. Hierarchical clustering of pretreatment conditions (native, thermal and PEF) and non-specific peptides obtained from chymotrypsin digestion, with similarities measured by Euclidean distance and displayed in a heat map. The color scale indicates the relative abundance of peptide ions: red represents up-regulation, while blue indicates down-regulation.	131
Figure 4.35. Venn diagram illustrating bioactive and potentially bioactive peptides (antihypertensive and antidiabetic) resulting from the hydrolysis of α -LA pretreated by CEP using free and immobilized α -CT. Legend: AHP: antihypertensive peptides reported in the literature. ADP: antidiabetic peptides reported in the literature. PAPH: potentially antihypertensive peptides not reported in the literature. PADH: potentially antidiabetic peptides not reported in the literature.	132
Figure 5.36. Experimental workflow of PP pretreatment and enzymatic hydrolysis.....	142
Figure 5.37. Accessible -SH groups of PP native, thermal and PEF pretreatments.....	156
Figure 5.38. Surface hydrophobicity of native PP, and after thermal and PEF pretreatments.	158
Figure 5.39. DH in function of reaction duration during chymotryptic hydrolysis of PP subjected to pretreatments (native, heated, or PEF).	160

Figure 5.40. Eco-efficiency of PP: comparative analysis of PEF processing (PEF 1: 20 kV/cm, 19 pulses; PEF 2: 15 kV/cm, 19 pulses; PEF 3: 10 kV/cm, 19 pulses; PEF 4: 20 kV/cm, 38 pulses; PEF 5: 15 kV/cm, 38 pulses; PEF 6: 10 kV/cm, 38 pulses) and thermal pretreatment (75 °C).	164
Figure 5.41. Heatmap and hierarchical clustering of specific peptides obtained through chymotrypsin digestion under different pretreatment conditions (native, thermal, and PEF). Similarities are assessed using Euclidean distance, and the color scale indicates the relative abundance of peptide ions: red for upregulation and blue for downregulation.	165
Figure 5.42. Venn Diagramm : potentially antihypertensive and antidiabetic peptides sequences. The number in green represents the sequences with exclusively an antidiabetic potential, while the number in red indicates those with only an antihypertensive potential.	168
Figure 5.43. Heat map and hierarchical clustering of specific peptides obtained by digestion with free or immobilized chymotrypsin under different pretreatment conditions (native, thermal 75 °C and PEF 3). Similarities are assessed using Euclidean distance, and the color scale indicates the relative abundance of peptide ions: red for up-regulation and blue for down-regulation.	169
Figure 5.44. Venn diagram of peptides in PP hydrolysates. Sequences common to two or more fractions are shown in black, and unique sequences are shown in condition color. Native_F: peptides obtained from pea proteins by free chymotrypsin. Same principle for 75 °C_F and PEF3_F. Native_I: peptides obtained from pea proteins by immobilized chymotrypsin. Same principle for 75 °C_I and PEF3_I.	171
Figure 5.45. Venn diagramm: Potentially antihypertensive and antidiabetic peptide sequences obtained from immobilized chymotrypsin. The number in green represents sequences with exclusively antidiabetic potential, while the number in red indicates those with only antihypertensive potential.	173
Figure 6.46. Effet combiné des CEP et de l'immobilisation enzymatique sur la production d'hydrolysats de peptides bioactifs de l'α-LA et des PP.	179

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1. Composition moyenne et caractéristiques du lactosérum du fromage et du yaourt grec (Moulin & Galzy, 1984; Chatzipaschali & Stamatis, 2012; Smithers, 2015; Menchik et al., 2019; Sebastián-Nicolás et al., 2020; Pires et al., 2021)	13
Tableau 1.2. Liste non exhaustive de peptides bioactifs obtenus par hydrolyse enzymatique de l' α -LA.....	19
Tableau 1.3. Classification des protéines de la graine de pois et leurs caractéristiques (Lu et al., 2020; Shen et al., 2022)	27
Tableau 1.4. Liste non exhaustive des peptides bioactifs dérivés des PP.	32
Tableau 1.5. Formulations nutraceutiques vendus dans le commerce à base de peptides bioactifs provenant de protéines animales et végétales (López-Barrios et al., 2014; Dullius et al., 2018).....	41
Tableau 1.6. Liste non exhaustive des effets des CEP sur l'hydrolyse des protéines agroalimentaires.....	49

Chapitre 3 et 5

Table 3.1. Conditions of pretreatment of α -lac by PEF	70
Table 3.2. Secondary structural components of α -lac estimated by CD.	84
Table 3.3. Comprehensive screening of referenced and potentially bioactive peptides.....	99
Table 5.4. PEF-pretreatment conditions of PP.	143
Table 5.5. Secondary structural components of PP estimated by CD.	153
Table 5.6. Statistical analysis of DH evolution across different treatments (native, heat and PEF) during PP enzymatic hydrolysis.	176

Liste des abréviations

- ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine (*Angiotensin-Converting Enzyme*)
- α -CT : α Chymotrypsine bovine (*Alpha-Chymotrypsin bovine*)
- α -LA ou α -lac : α -Lactalbumine
- ANG I et II : Angiotensine I et II
- ANS : 1-Anilino-naphthalène-8-sulfonate
- APTES : 3-Aminopropyltriéthoxysilane
- AZO : Azocaséine
- BSA : Albumine sérique bovine (*Bovine Serum Albumin*)
- CD : Dichroïsme circulaire (*Circular Dichroism*)
- CEP : Champ Électrique Pulsé
- CLEA : Agrégats enzymatiques réticulés (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*)
- CTMS : Chlorure de triméthylsilyle (*Chlorotrimethylsilane*)
- DBO : Demande Biologique en Oxygène
- DCO : Demande Chimique en Oxygène
- DH : Degré d'hydrolyse
- DOP : Dopamine hydrochloride
- DPP-IV : Dipeptidyl peptidase IV
- EC : Consommation d'énergie (*Energy Consumption*)
- EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique
- EDX : Spectroscopie de dispersion d'énergie des rayons X (*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*)
- EE : Éco-efficience (*Eco-efficiency*)
- FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)
- GA : Glutaraldéhyde
- GIP : Peptide insulino-trope dépendant du glucose (*Gastric Inhibitory Polypeptide*)
- GLP-1 : Glucagon-like peptide-1
- GRAS : Généralement reconnu comme sûr (*Generally Recognized As Safe*)
- MS : Spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)

MSN : Nanosilice mésoporeuse (*Mesoporous Silica Nanoparticles*)
NaOH : Hydroxyde de sodium
OPA : *O*-phthalaldéhyde
PEF: Pulsed Electric Field
PDA : Polydopamine
PP : Protéines de pois
pI : Point isoélectrique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
RP-UPLC : Chromatographie ultra-haute performance en phase inverse (*Reverse Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography*)
SDS : Dodécylsulfate de sodium (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
-SH : Groupements thiols (sulfhydryle)
SPPS : Synthèse peptidique en phase solide (*Solid-Phase Peptide Synthesis*)
SRA : Système Rénine-Angiotensine
TCA : Acide trichloroacétique
TNBS : Acide trinitrobenzenesulfonique

« Chaque génération, sans doute, se croit vouée à refaire le monde. La mienne sait pourtant qu'elle ne le refera pas, mais sa tâche est peut-être bien plus grande, elle consiste à empêcher le monde ne se défasse » *Albert Camus*

Remerciements

Tout d’abord, je tiens à remercier grandement les membres du comité examinateur de cette thèse : Pr. Federico Casanova et Pr. Romain Kapel, pour avoir accepté le rôle de rapporteur de mon jury de thèse. J’adresse également mes remerciements à la Dre. Marie-Pierre Belleville et à la Pre. Lucie Beaulieu d’avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu’examineurs.

Ensuite, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Pr. Sergey Mikhaylin, mon directeur de thèse à Québec. Je le suis reconnaissante pour sa bienveillance et ses qualités humaines, ce qui a fait de lui un repère de confiance. Parmi les nombreux enseignements qu’il m’a transmis, une phrase résonnera en moi à jamais : « On ne jalouse pas ceux qui nous surpassent, on se rapproche d’eux, on apprend à leurs côtés et l’on progresse ». C’est précisément ce qu’il a été pour moi : une source d’inspiration constante, un mentor exigeant et un éclairer sur le chemin de la rigueur et du dépassement de soi.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude au Pr. Rénato Froidevaux, mon directeur de thèse en France. Son leadership éclairé et ses qualités humaines ont été une source précieuse d’inspiration et de soutien. Grâce à sa confiance et à son accompagnement bienveillant, j’ai non seulement pu tracer mon propre chemin au sein de cette aventure scientifique, mais aussi apprendre à croire en mes capacités. Son approche, alliant rigueur et liberté intellectuelle, m’a permis d’explorer avec audace et assurance les questionnements qui ont jalonné cette recherche.

Merci à vous deux pour votre bonne humeur constante et votre positivité à toute épreuve, qui ont rendu ces années de recherche plus motivantes.

Évidemment, je souhaite exprimer ma profonde gratitude à Mélanie Faucher, ma professionnelle de recherche à Québec, qui, au fil du temps, est devenue bien plus qu’une collègue : une véritable amie. Merci pour ton aide précieuse, tes conseils avisés et ta bienveillance sans faille. Ta disponibilité et ton écoute ont été des piliers essentiels dans la réussite de mon projet de thèse, et sans toi, ce parcours n’aurait certainement pas eu la même

fluidité, ni la même sérénité. Merci aussi pour tous ces moments de joie, de rires et d'aventures partagés, qui ont donné à cette expérience une dimension humaine inestimable. Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude à Barbara Deracinois et Jacinthe Thibodeau pour leur précieuse expertise en chromatographie. Mais bien au-delà de leur savoir, je tiens à les remercier pour leur bienveillance, leur joie de vivre contagieuse et ces moments de partage qui ont rythmé mon parcours. Sans elles, cette thèse aurait sans doute manqué de couleur et de chaleur.

Merci à mon équipe à l'Université Laval (Houssine, Gabriel, Ionică, Bertrand, Francis, Ashley, Delasa, Jonathan, Eya, Jade) pour tous ces moments précieux partagés, aussi bien au laboratoire qu'en dehors, entre parties de golf, soirées karaoké et randonnées. Votre présence a fait de ces années une expérience aussi enrichissante sur le plan scientifique qu'humain. Un merci tout particulier à Eya, une amie au grand cœur, d'une bienveillance et d'un soutien inestimables. Nous avons traversé (presque) chaque étape de cette thèse ensemble, et ce fut un véritable bonheur de te rencontrer et de partager ce parcours à tes côtés.

Je tiens également à adresser un immense merci à tous les étudiants de mon laboratoire à l'Université de Lille. Un merci tout particulier à mes amis Océane, Fatima, Hairati et Florian, dont la compagnie a donné une tout autre saveur à chaque journée. Nos instants d'entraide, nos doutes partagés, nos éclats de rire, nos pauses café, nos moments de joie, nos confidences et notre complicité resteront gravés en mémoire.

Comment pourrais-je écrire ces remerciements sans exprimer ma profonde gratitude envers ma famille et mes amis les plus proches ?

Cette thèse représente bien plus qu'un travail de recherche : elle est le fruit de nombreuses années d'engagement, d'efforts et de persévérance. Mais rien de tout cela n'aurait été possible sans le soutien indéfectible de mes parents. Je ne pourrai jamais assez les remercier pour tout ce qu'ils ont fait et continuent de faire chaque jour pour moi. Leur présence, leur confiance et leur amour inconditionnel ont été mon plus grand pilier. Je remercie également mes grands-parents, ma sœur et toute ma famille proche, qui ont su m'écouter aussi bien dans mes moments de doute et de frustration que dans mes instants de

réussite et de fierté. Merci pour votre patience, votre bienveillance et cet amour qui, même dans les périodes les plus difficiles, a toujours été une lumière rassurante.

À Aude, ma colocataire et amie, à Lille comme à Québec : partager cette aventure avec toi a rendu ce parcours plus agréable et plus fluide. Ton soutien, ta bonne humeur et ta présence ont été précieux tout au long de cette thèse. Merci pour ces montagnes russes d'émotions, pour ton soutien sans faille et pour être simplement la personne géniale que tu es.

Un immense merci à mes meilleur(e)s ami(e)s : Marion, Mélanie, Narimane, Théo, Chanez, Alix, ainsi qu'à mes anciennes collègues de BTS, Manon, Romane et Mélissa. Malgré la distance et le temps que je n'ai parfois pas pu accorder, vous êtes restés présents. C'est dans ces moments que l'on reconnaît les véritables amitiés. Merci d'exister, tout simplement.

Enfin, si cette thèse porte mon nom, elle est le reflet d'un travail collectif, façonné par les idées, les conseils et les encouragements de nombreuses personnes. À toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ce projet, que ce soit par leur expertise, leur soutien ou leur présence tout au long de mon parcours, je tiens à adresser ma plus profonde gratitude. Ne puisse personne ne se sentir oublié dans ces remerciements, tant chaque contribution a été précieuse.

Avant-propos

Cette thèse présente un projet de doctorat, réalisé en cotutelle entre l'Université de Lille, sous la direction du Pr. Rénato Froidevaux, et l'Université Laval, sous la direction du Pr. Sergey Mikhaylin. Les travaux de cette thèse portent sur l'approche innovante de la combinaison des champs électriques pulsés et de l'enzyme immobilisée pour l'obtention de peptides à activités biologiques à partir de protéines agroalimentaires. Le premier chapitre de thèse est l'état de l'art, présenté après l'introduction générale, permettant de faire le point sur les connaissances actuelles et de mieux comprendre la problématique du sujet. Le second chapitre expose l'hypothèse de recherche et les objectifs à atteindre. Les chapitres 3, 4, et 5 des résultats constituent le cœur de cette thèse, rassemblant l'ensemble des travaux réalisés. Enfin, le chapitre 6 vient clore cette thèse par une discussion générale des travaux réalisés tout au long du doctorat, suivie de la conclusion générale et de perspectives pour la poursuite de ce projet. Les trois chapitres de résultats sont rédigés sous forme d'articles scientifiques.

Le chapitre 3 présente les résultats de l'étude de l'effet des champs électriques pulsés comme prétraitement sur la structure de l' α -lactalbumine et son hydrolyse enzymatique par l' α -chymotrypsine. Cet article, intitulé « **Pulsed Electric Field pretreatment of α -lactalbumin: Impact on the Production of Peptides with Antihypertensive and Antidiabetic Potential** » est publié dans *Food and Bioproducts Processing* (<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2025.04.004>). Les auteurs sont: Hélior Clouzot (Candidate au PhD.: planification et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction de l'article), Jacinthe Thibodeau (Collaboratrice externe du projet : assistance de l'étudiante pour les analyses UPLC-MS/MS, le traitement des résultats, la correction et du manuscrit), Laurent Bazinet (Collaborateur externe du projet : méthodologie, correction et révision du manuscrit), Rénato Froidevaux (Directeur de thèse, Université de Lille, supervision scientifique de l'étudiante, correction et révision du manuscrit) et Sergey Mikhaylin (Directeur de thèse, Université Laval, supervision scientifique de l'étudiante, correction et révision du manuscrit).

Le chapitre 4 présente les résultats de l'étude sur l'impact de l'approche combinée des champs électriques pulsés et de l'immobilisation de l' α -chymotrypsine sur l'hydrolyse de l' α -lactalbumine. L'article, intitulé « **Sequential application of pulsed electric fields and covalent immobilization of chymotrypsin on alumina particles for the production of bioactive peptides with antihypertensive and antidiabetic properties from alpha-lactalbumin** » est en cours de soumission. Les auteurs sont: Héliorie Clouzot (Candidate au PhD.: planification et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction de l'article), Jacinthe Thibodeau (Collaboratrice externe du projet : assistance de l'étudiante pour les analyses UPLC-MS/MS, le traitement des résultats, la correction et du manuscrit), Laurent Bazinet (Collaborateur externe du projet : méthodologie, correction et révision du manuscrit), Rénato Froidevaux (Directeur de thèse, Université de Lille, supervision scientifique de l'étudiante, correction et révision du manuscrit) et Sergey Mikhaylin (Directeur de thèse, Université Laval, supervision scientifique de l'étudiante, correction et révision du manuscrit).

Le chapitre 5 présente les résultats de l'étude portant sur l'impact de l'approche combinée des champs électriques pulsés et de l'immobilisation de l' α -chymotrypsine sur l'hydrolyse des protéines de pois. Cet article intitulé « **Enhancement of commercial pea proteins hydrolysis through the combination of pulsed electric fields and covalent immobilization of α -chymotrypsin on alumina particles** » est également en cours de soumission. Les auteurs sont : Héliorie Clouzot (Candidate au PhD.: planification et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction de l'article), Mélanie Faucher (Collaboratrice interne du projet : assistance de l'étudiante pour les manipulations, correction et révision du manuscrit), Jacinthe Thibodeau (Collaboratrice externe du projet : assistance de l'étudiante pour les analyses UPLC-MS/MS, le traitement des résultats, la correction et du manuscrit), Laurent Bazinet (Collaborateur externe du projet : méthodologie, correction et révision du manuscrit), Froidevaux (Directeur de thèse, Université de Lille, supervision scientifique de l'étudiante, correction et révision du manuscrit) et Sergey Mikhaylin (Directeur de thèse, Université Laval, supervision scientifique de l'étudiante, correction et révision du manuscrit).

Introduction générale

Ces dernières années, la valorisation des ressources agroalimentaires est devenue un enjeu majeur, à la croisée des préoccupations économiques, sociétales et environnementales. Parallèlement, l'essor de l'industrie agroalimentaire et la croissance démographique mondiale accentuent la demande en ingrédients protéiques, tant d'origine animale que végétale. Cette dynamique se reflète dans la croissance du marché mondial des ingrédients protéiques, qui était estimé à 50 milliards USD en 2023 et devrait augmenter de 5,4 % d'ici 2030 (GrandviewResearch, 2023). Toutefois, cette expansion repose encore largement sur la production de protéines animales, un secteur dont l'empreinte environnementale est significative en raison de sa forte consommation d'eau et de ressources végétales, de l'importante mobilisation importante des sols et des émissions élevées de gaz à effet de serre (Guéguen et al., 2016). Pour répondre aux enjeux de durabilité, un rééquilibrage des sources protéiques est nécessaire, favorisant l'essor des protéines végétales dans l'alimentation humaine (Guéguen et al., 2016). Néanmoins, les protéines animales demeurent essentielles en raison de leur valeur nutritionnelle élevée. Les protéines laitières, par exemple, occupent une place prépondérante dans les compléments alimentaires et les formulations alimentaires enrichies (Smithers, 2015). À l'inverse, bien que les protéines végétales gagnent du terrain, elles présentent certaines limites. En effet, la plupart d'entre elles ont un profil en acides aminés incomplet, une digestibilité généralement plus faible et peuvent contenir des facteurs antinutritionnels (Ismail et al., 2020). Si différentes stratégies peuvent être mises en place pour améliorer la qualité nutritionnelle et fonctionnelle de ces protéines, une autre voie de valorisation repose sur la production de peptides bioactifs. Ces molécules suscitent un intérêt croissant en raison de leurs propriétés physiologiques spécifiques (Gao et al., 2022; Wang et al., 2022).

L'hydrolyse enzymatique constitue une approche de référence pour la génération de peptides bioactifs, grâce à sa capacité à assurer un clivage spécifique des liaisons peptidiques (Wahab et al., 2020). Cependant, la production efficace de ces peptides bioactifs demeure confrontée à plusieurs verrous technologiques, liés à la fois aux caractéristiques intrinsèques des substrats protéiques et aux contraintes d'utilisation des enzymes.

Certaines protéines présentent une résistance intrinsèque à l'hydrolyse, notamment en raison de leur structure compacte stabilisée par des liaisons intra- et intermoléculaires. C'est notamment le cas de l' α -lactalbumine (α -LA), une protéine globulaire riche en ponts disulfures, et des protéines de pois (PP), qui constituent un mélange complexe de globulines et d'albumines, limitant leur accessibilité aux enzymes hydrolytiques (Tzitzikas et al., 2006; Ge et al., 2024). Pour pallier ces limitations, différentes stratégies ont été développées, notamment l'utilisation de traitements préalables visant à modifier la structure des protéines et à améliorer leur accessibilité à l'hydrolyse enzymatique. Historiquement, les traitements thermiques ont été largement utilisés pour induire des modifications structurales des protéines, favorisant ainsi leur dénaturation et leur susceptibilité aux enzymes. Toutefois, ces procédés sont énergivores et peuvent altérer certaines propriétés fonctionnelles et nutritionnelles (Nicoleta et al., 2010; Jovanović et al., 2016; Agoua et al., 2022). Dans ce contexte, des techniques non thermiques de modifications des protéines telles que la haute pression, la lumière pulsée, le rayonnement ultraviolet et les champs électriques pulsés (CEP) gagnent du terrain (Ismail et al., 2020). Parmi ces technologies émergentes, les CEP apparaissent comme une alternative éco-efficace innovante aux traitements thermiques conventionnels. Cette technologie permet un dépliement partiel des structures protéiques sans altération excessive de leurs propriétés fonctionnelles, favorisant ainsi l'exposition des sites de clivage enzymatique et améliorant l'efficacité de l'hydrolyse (Agoua et al., 2022).

Outre les imitations liées à la structure des protéines, l'hydrolyse enzymatique en phase homogène présente plusieurs limites, notamment la difficulté de récupération des enzymes, leur autolyse, ainsi que des coûts élevés liés à leur utilisation, compromettant ainsi la viabilité économique du procédé (Wahab et al., 2020). Pour pallier ces contraintes, l'immobilisation enzymatique apparaît comme une alternative stratégique. En fixant les enzymes sur un support solide, cette approche améliore leur stabilité, facilite leur séparation du milieu réactionnel et permet leur réutilisation, réduisant ainsi les coûts liés à l'utilisation des biocatalyseurs (Wahab et al., 2020). Lorsque l'immobilisation repose sur des liaisons covalentes avec un support, elle limite également le relargage enzymatique et optimise la durabilité du procédé (Wahab et al., 2020). Cette optimisation est d'autant plus essentielle que le marché des peptides bioactifs connaît une croissance annuelle estimée à 9,9 % entre

2021 et 2028, stimulée par les avancées technologiques et l'intérêt croissant pour leurs applications nutraceutiques et thérapeutiques (Data Bridge Market Research, 2021).

La combinaison du prétraitement des substrats protéiques par CEP et de l'immobilisation enzymatique représente ainsi une stratégie novatrice pour surmonter les limitations actuelles de l'hydrolyse enzymatique des protéines, tout en optimisant l'efficacité de la production de peptides bioactifs.

Dans cette étude, deux sources protéiques complémentaires seront examinées : l' α -LA, une protéine du lactosérum bovin, et les PP, un mélange complexe de protéines végétales. L' α -LA, deuxième protéine majoritaire du lactosérum, est bien étudiée en raison de sa valeur nutritionnelle élevée, de son profil équilibré en acides aminés essentiels et de son fort potentiel à libérer des peptides bioactifs (Permyakov, 2020). Elle est notamment une source de peptides aux propriétés antihypertensives, antimicrobiennes et antidiabétiques (Bhutto et al., 2024a). De plus, sa structure homogène et bien caractérisée en fait un modèle d'étude idéal pour évaluer avec précision les effets des CEP et de l'immobilisation enzymatique sur son hydrolyse.

Les connaissances acquises seront ensuite transposées au mélange de protéines végétales (PP), dont la diversité structurale nécessite une adaptation des conditions de traitement pour optimiser leur hydrolyse et la libération de peptides bioactifs. Ces protéines suscitent un intérêt croissant en tant qu'alternative végétale aux protéines animales et sont utilisées dans de nombreuses formulations alimentaires en raison de leur bonne digestibilité et de leur richesse en peptides bioactifs (Ge et al., 2020). Elles permettent notamment la production de peptides aux effets antihypertenseurs, antidiabétiques et antioxydants (Wang et al., 2022).

L'association des CEP et de l'immobilisation enzymatique permettra ainsi d'évaluer leur effet combiné sur l'efficacité de l'hydrolyse, tout en analysant la production de peptides bioactifs à potentiel antihypertenseur et antidiabétique.

À terme, cette étude devrait contribuer à l'amélioration des bioprocédés enzymatiques, en proposant une stratégie plus performante, économiquement viable et respectueuse de l'environnement, favorisant ainsi l'essor des ingrédients bioactifs et la durabilité des systèmes alimentaires.

1. Chapitre 1 - État de l'art

1.1. Les protéines et leur valorisation : contexte général

1.1.1. Introduction aux protéines

Les protéines occupent une position centrale dans les processus biologiques en orchestrant la quasi-totalité des interactions et réactions moléculaires. Ces macromolécules, constituées d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques, se distinguent par des séquences uniques qui confèrent à chacune d'entre elles une spécificité fonctionnelle remarquable. Elles jouent un rôle fondamental dans des mécanismes tels que la transduction des signaux cellulaires, la régulation de l'expression génétique, l'apoptose, l'immunité, le soutien structurel, ainsi que la catalyse des réactions chimiques indispensables à la survie des organismes vivants (Morris et al., 2022).

Cette diversité fonctionnelle repose sur une organisation structurale hiérarchisée (Figure 1.1).

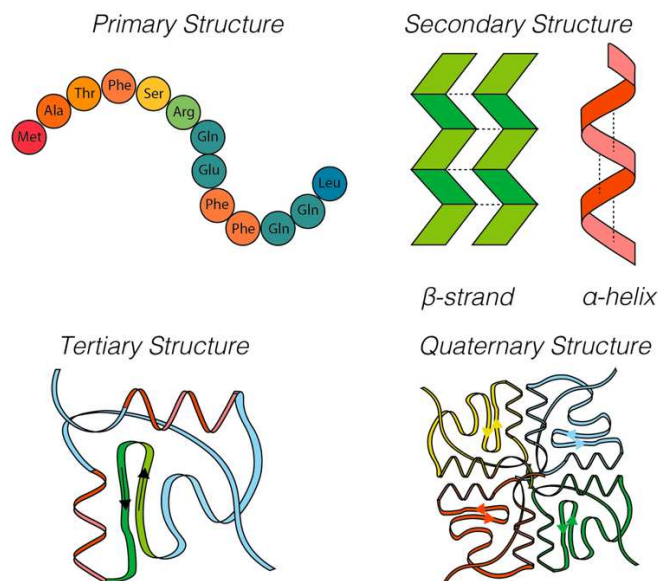


Figure 1.1. Les différentes structures des protéines (Morris et al., 2022)

La structure primaire, correspondant à la séquence linéaire des acides aminés, constitue la base de cette hiérarchie. La structure secondaire émerge sous l'effet de liaisons hydrogènes intramoléculaires, stabilisant des motifs récurrents tels que les hélices α , les feuilletts β

(parallèles ou antiparallèles), les coudes et les pelotes aléatoires. Ces motifs se réorganisent ensuite pour former la structure tertiaire, sous l'influence de diverses interactions intramoléculaires (ponts disulfures, interactions hydrophobes, liaisons ioniques et hydrogènes), conférant à chaque protéine sa spécificité fonctionnelle. Enfin, la structure quaternaire, résultant de l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques, permet des interactions complexes essentielles à de nombreuses fonctions biologiques (Morris et al., 2022). Au-delà de leur rôle fonctionnel, la structure des protéines revêt une importance cruciale dans leur qualité nutritionnelle, en influençant leur digestibilité, leur biodisponibilité, leur profil en acides aminés et la présence de facteurs antinutritionnels (WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007; Sá et al., 2020). Cette qualité nutritionnelle repose en grande partie sur la composition en acides aminés, lesquels se classent en deux catégories : les acides aminés essentiels, indispensables à l'organisme mais nécessitant un apport exogène via l'alimentation, et les acides aminés non essentiels, synthétisés par voie endogène (Boye et al., 2012). Les protéines issues de sources traditionnelles, qu'elles soient animales (viande, œufs, poissons, fruits de mer, produits laitiers) ou végétales (céréales, légumineuses), constituent des piliers de l'alimentation humaine (Henchion et al., 2017). Néanmoins, leur production repose sur une exploitation intensive des ressources naturelles et contribuent négativement à la durabilité environnementale (Grossmann & Weiss, 2021). Des recherches actuelles démontrent une interdépendance entre alimentation, santé et durabilité environnementale, appelant à une révision systémique et urgente des pratiques agroalimentaires mondiales pour concilier ces enjeux tout en garantissant des bénéfices pérennes pour la santé humaine (Caron et al., 2018).

Dans ce contexte, la valorisation des protéines s'impose comme une stratégie essentielle et multifonctionnelle. En intégrant des approches telles que la valorisation des co-produits, l'amélioration des technologies d'extraction et la promotion de sources protéiques alternatives, cette démarche contribue à relever les défis environnementaux et économiques tout en maximisant le potentiel nutritionnel et fonctionnel des protéines. Elle constitue ainsi un levier stratégique pour répondre aux besoins croissants des populations tout en respectant les principes de durabilité et d'innovation.

1.1.2. Valorisation des protéines agroalimentaires

La valorisation des protéines agroalimentaires s'inscrit dans les priorités stratégiques définies par le plan d'action pour l'économie circulaire et la stratégie européenne en faveur de la bioéconomie (Socas-Rodríguez et al., 2021). Cette démarche consiste à exploiter les protéines issues de co-produits industriels ou de déchets agroalimentaires afin de générer des produits à haute valeur ajoutée, tout en contribuant à la réduction des impacts environnementaux (Boboua et al., 2024). Elle constitue une solution essentielle pour limiter les pertes de ressources biologiques et maximiser leur valorisation dans une approche d'économie circulaire. Selon leur origine, ces protéines offrent un large potentiel d'applications, aussi bien dans l'industrie alimentaire que dans d'autres secteurs non alimentaires. Toutefois, leur utilisation dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine est soumise à des réglementations strictes, conformément aux exigences européennes en matière de sécurité alimentaire. Ces réglementations visent à garantir la production de produits exempts de risques sanitaires et adaptés à la consommation humaine (Parlement Européen et Conseil, 2002b). De manière similaire, les produits dérivés utilisés en alimentation animale doivent répondre à des critères de conformité équivalents pour assurer leur innocuité (Parlement Européen et Conseil, 2002a). La valorisation des protéines agroalimentaires suit une hiérarchie en fonction de leur valeur économique, du niveau de transformation requis et de leur capacité d'absorption du marché (Bergé, 2008). Cette hiérarchie peut être représentée sous forme de pyramide, allant des applications à faible valeur ajoutée mais à large échelle, jusqu'aux usages spécialisés en nutraceutique et pharmaceutique, qui se distinguent par leur haute valeur ajoutée (Figure 1.2).

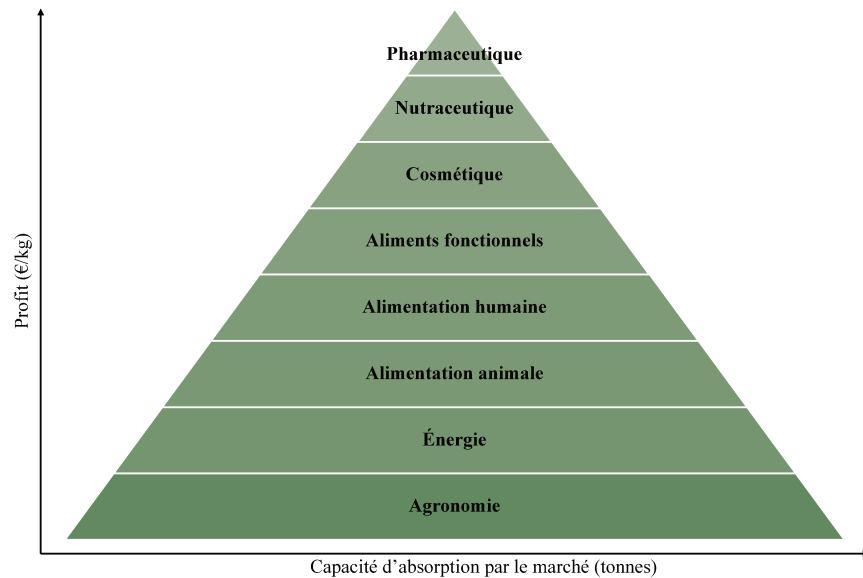


Figure 1.2. Pyramide des valorisations des protéines agroalimentaires (Bergé, 2008)

À la base de cette hiérarchie, les protéines issues de co-produits agroalimentaires sont principalement exploitées dans le domaine agronomique et énergétique. En agriculture, les protéines végétales des tourteaux de soja ou celles issues du sang de mammifères sont transformées en fertilisants organiques ou en biostimulants, contribuant ainsi à l'amélioration des sols et à la réduction du gaspillage agricole (Mirabella et al., 2014). Parallèlement, certaines protéines dérivées du raffinage d'huiles végétales ou d'algues peuvent être utilisées pour produire des biocarburants via des procédés de biocatalyse, améliorant l'efficacité de la conversion des biomasses en énergie renouvelable (Li et al., 2018; Peydayesh et al., 2023). Au niveau supérieur dans la hiérarchie de valorisation, les protéines agroalimentaires sont couramment utilisées dans l'alimentation animale. Le sang et les tourteaux végétaux constituent des sources de protéines essentielles dans l'alimentation du bétail et de l'aquaculture. Cette valorisation optimise l'utilisation des ressources primaires tout en réduisant la dépendance aux protéines conventionnelles (Mirabella et al., 2014; Peydayesh et al., 2023).

Ensuite, les protéines agroalimentaires gagnent en valeur ajoutée lorsqu'elles sont utilisées dans la nutrition humaine, notamment sous forme de concentrés et isolats protéiques. Le lactosérum en poudre, par exemple, est couramment transformé en compléments alimentaires

ou intégré à des boissons fonctionnelles aux propriétés nutritionnelles renforcées (Panghal et al., 2018; Abdo et al., 2022).

Avec l'avancée des biotechnologies, les protéines agroalimentaires sont désormais employées pour des applications innovantes comme la fabrication de biomatériaux et de membranes filtrantes. Par exemple, des résidus de fabrication du tofu ont été transformés en bioplastiques biodégradables, permettant non seulement de réduire la pollution plastique mais aussi de limiter le gaspillage alimentaire (Bagnani et al., 2024). Cette approche illustre comment des ressources alimentaires peuvent être intégrées dans la production de matériaux durables, un domaine qui s'étend également à la purification de l'eau. Les protéines agroalimentaires, notamment des co-produits laitiers, sont ainsi utilisées pour créer des membranes adsorbantes et des hydrogels fonctionnels capables de capter des contaminants comme les métaux lourds ou les résidus organiques. De plus, les nanofibrilles amyloïdes issues du lactosérum offrent une solution pratique et durable pour la filtration de l'eau potable, renforçant l'impact de ces innovations sur la gestion des ressources hydriques (Ramírez-Rodríguez et al., 2020).

Un degré supplémentaire de sophistication est atteint lorsque les protéines sont exploitées pour leurs propriétés techno-fonctionnelles. Dans l'industrie agroalimentaire, certaines protéines issues de la drêche sont utilisées comme émulsifiants, améliorant ainsi la texture et la stabilité des formulations alimentaires (Zhou et al., 2023). Cette capacité à structurer et stabiliser des matrices complexes confère aux protéines un rôle clé dans l'élaboration de produits transformés à haute valeur ajoutée.

Au sommet de cette hiérarchie, les protéines extraites de déchets agroalimentaires ou de co-produits industriels peuvent être transformées en peptides bioactifs par des procédés tels que l'hydrolyse enzymatique ou la fermentation microbienne. Ces peptides, en raison de leurs bioactivités variées, notamment les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antihypertensives et antidiabétiques, trouvent des applications prometteuses en agriculture, en nutrition et dans le secteur pharmaceutique (Boboua et al., 2024). Cette valorisation des peptides bioactifs s'inscrit dans un cadre d'innovation croissante, répondant à des besoins spécifiques dans des secteurs stratégiques. Le développement de ce domaine est soutenu par une expansion significative du marché. Une projection de croissance annuelle de 9,9 % illustre leur importante croissance et leur rôle central dans des applications à haute valeur

ajoutée (Data Bridge Market Research, 2021). Dans ce contexte, le lactosérum, issu de la transformation fromagère, et les protéines de pois, provenant des co-produits de l'industrie agroalimentaire, constituent des sources stratégiques pour la production de peptides bioactifs à haute valeur ajoutée. L' α -LA, l'une des protéines majoritaires du lactosérum, et les PP, étudiées dans ce travail, se distinguent par leur aptitude à générer des peptides bioactifs à la suite d'une hydrolyse enzymatique. Cette capacité leur confère un fort potentiel pour le développement de peptides d'intérêt à visée nutraceutique et pharmaceutique.

1.2. Le lactosérum et ses protéines

1.2.1. La place de l'industrie laitière

La filière laitière occupe une position mondiale stratégique en se classant au deuxième rang des secteurs agroalimentaires, juste après celui de la viande (Fédération Internationale de Laiterie (FIL-IDL), 2019). Une proportion significative de cette industrie est dédiée à la transformation du lait en une vaste gamme de produits dérivés, incluant les fromages, le beurre, les poudres de lait, les yaourts, les desserts, et la crème (FranceAgriMer, 2022; CNIEL, 2024). En 2022, cette production représentait environ 92 % du lait transformé en France, tandis qu'au Canada, elle représentait environ 72 % en 2023 (FranceAgriMer, 2022; CCIL, 2023). La production de fromage, de caséine et de certains types des yaourts concentrés ou égouttés génère un co-produit essentiel : le lactosérum. Doté de propriétés nutritionnelles remarquables et d'un fort potentiel technologique, ce dernier représente un levier stratégique pour l'innovation et la valorisation au sein du secteur agroalimentaire (Smithers, 2015).

1.2.2. Le lactosérum

Le lactosérum est principalement dérivé de produits laitiers issus de divers mammifères, bien que ceux à base du lait de vache constituent la source la plus répandue. Sa production, étroitement liée à l'expansion mondiale de la production laitière, augmente chaque année

d'environ 1 à 2 %, ce qui équivaut à un volume additionnel de près de 14 millions de tonnes par an. Cette croissance soutenue a donné lieu à l'émergence d'un marché mondial structuré autour du lactosérum. En 2021, le prix moyen de la poudre de lactosérum sur le marché international atteignait approximativement 2 500 €/t, témoignant de sa valeur économique significative (Smithers, 2015; Yadav et al., 2015; FranceAgriMer, 2021).

1.2.2.1. Composition du lactosérum

Le lactosérum se décline en deux catégories principales, définies en fonction des procédés de fabrication des produits laitiers tels que les fromages, les yaourts grecs ou les caséines : le lactosérum acide et le lactosérum doux, dont le procédé de fabrication est détaillé (Figure 1.3).

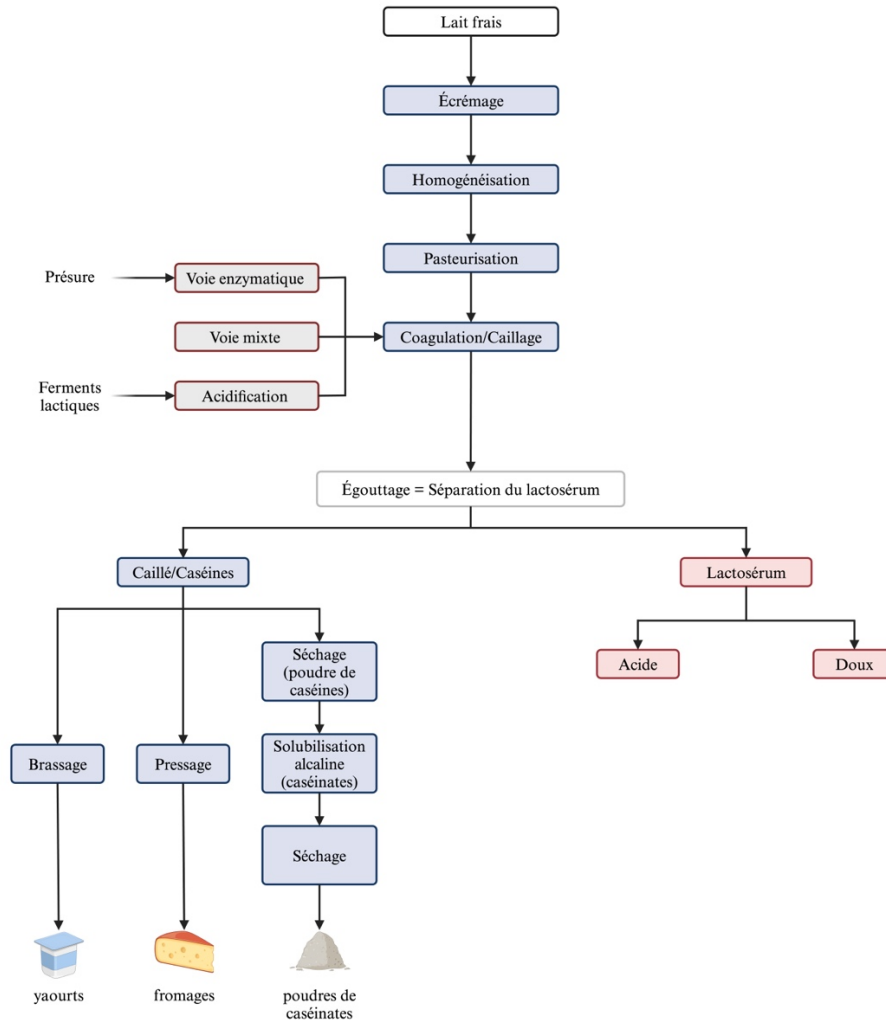


Figure 1.3. Schéma simplifié de l'obtention du lactosérum à partir du lait frais (adapté de de Wit, 2001)

Le lactosérum, particulièrement répandu, est majoritairement issu de la production de fromages à pâtes fermes ou dures. Ce processus repose sur un traitement enzymatique impliquant la coagulation des caséines par la présure, un mélange enzymatique contenant principalement de la chymosine, opérant à un pH avoisinant 6,5. Le lactosérum ainsi obtenu est désigné sous le terme de lactosérum doux. À l'inverse, le lactosérum acide (pH inférieur à 5) résulte de la coagulation des caséines par acidification du lait. Cette acidification est généralement réalisée via une fermentation lactique ou par l'ajout d'acides minéraux ou organiques (Yadav et al., 2015; Menchik et al., 2019; Pires et al., 2021). Les constituants principaux du lactosérum incluent le lactose, les protéines, et les sels minéraux. Toutefois, sa

composition, tout comme celle du lait dont il est issu, varie significativement en fonction du procédé utilisé pour élaborer le produit final, qu'il s'agisse de la coagulation enzymatique ou lactique, ou encore de la fabrication de produits spécifiques comme les fromages, les caséines ou les yaourts concentrés. Par exemple, le lactosérum acide contient généralement moins de lactose et de protéines que le lactosérum doux. Ce déséquilibre résulte de l'activité des ferments lactiques qui convertissent le lactose en acide lactique, réduisant ainsi la teneur en lactose tout en augmentant la concentration en lactate (Tableau 1.1). En conséquence, le lactosérum doux se distingue par une concentration plus élevée en lactose et une teneur plus faible en lactate. La teneur en protéines du lactosérum acide est également inférieure à celle du lactosérum doux. Cette différence est particulièrement marquée dans le lactosérum acide issu de la fabrication de yaourts grecs, en raison du traitement thermique prolongé qui contribue à une dénaturation plus importante des protéines (Tableau 1.1). En outre, divers facteurs externes influencent la composition finale des lactosérums. Parmi ces facteurs figurent l'origine du lait (vache, chèvre, brebis, etc.), les races de vaches, l'alimentation animale ainsi que les variations saisonnières (Moulin & Galzy, 1984; Gyawali & Ibrahim, 2016; Menchik et al., 2019).

Tableau 1.1. Composition moyenne et caractéristiques du lactosérum du fromage et du yaourt grec (Moulin & Galzy, 1984; Chatzipaschali & Stamatis, 2012; Smithers, 2015; Menchik et al., 2019; Sebastián-Nicolás et al., 2020; Pires et al., 2021)

<i>Produit alimentaire</i>	<i>Yaourt grec</i>	<i>Fromage</i>	
<i>Type de lactosérum</i>	<i>Acide</i>	<i>Acide</i>	<i>Doux</i>
Propriétés			
pH	4,2 – 4,5	4,5	6,5
DCO (mg O ₂ /L)	52,4 – 62,4	80 000 – 100 000	> 60 000
DBO (mg O ₂ /L)	45,8 – 50,5	35 000 – 60 000	> 30 000
Constituants (g/L⁻¹)			
Solides totaux	-	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Lactose	35,0	44,0 – 46,0	46,0 – 52,0
Protéines	1,7 – 3,7	4,5 – 8,0	6,0 - 10,0
Matière grasse	-	0,3 – 6,0	5,0 – 6,0
Minéraux	-	4,3 – 7,5	2,0 - 5,9
Lactate	-	5,2 – 8,0	0,5 – 2,0
Sodium	-	0,2	3,1
Phosphates	-	2,0 – 4,5	1,0 – 3,0
Chlorures	-	0,9 – 1,1	1,0 - 1,1
Potassium	1,5 – 1,7	1,3 – 1,8	1,5 – 1,6
Calcium	1,2 – 1,3	1,2 – 1,6	0,4 – 0,6
Magnésium	-	0,1 – 0,2	0,0 – 0,1

Les composants essentiels du lactosérum constituent une ressource stratégique pour la production de produits à haute valeur ajoutée. Au cours des six dernières décennies, l'industrie laitière a considérablement renforcé la valorisation de ce co-produit par le biais de technologies de pointe, transformant son traitement en une démarche à la fois innovante et économiquement durable (Smithers, 2015).

1.2.2.2. Valorisation du lactosérum

Une grande partie du lactosérum est valorisé sous forme d'alimentation animale, notamment pour les porcs, les moutons et les bovins (Soumati et al., 2023). Toutefois, une proportion

significative de ce co-produit demeure encore sous-exploitée. Il est en effet estimé que seulement 50 % du lactosérum produit à l'échelle mondiale est valorisé dans l'industrie alimentaire (Soumati et al., 2023). Compte tenu de sa composition riche en lactose, protéines solubles, vitamines et minéraux, le lactosérum constitue une matrice aux propriétés nutritionnelles et fonctionnelles remarquables. Afin d'en maximiser l'utilisation, diverses approches biotechnologiques et physico-chimiques ont été développées pour le transformer en une vaste gamme de produits industriels (Figure 1.4). Les principaux composants de sa fraction solide servent de substrats pour des applications variées. À l'échelle des valorisations à faibles coûts, le lactosérum est utilisé dans les secteurs de l'agronomie et de l'énergie, notamment pour la production de biomasse microbienne et la génération de biogaz. À des niveaux plus élevés de valorisation, il constitue une ressource précieuse pour la biosynthèse de métabolites tels que les alcools, l'acide lactique, la vitamine B12 et la pénicilline, utilisés en industries pharmaceutique et biotechnologique. De plus, son exploitation permet l'obtention d'arômes, d'additifs alimentaires et d'enzymes, élargissant ainsi ses applications dans les secteurs de la nutrition, des cosmétiques et des ingrédients fonctionnels (Pescuma et al., 2015; Torres de Souza et al., 2019; Sebastián-Nicolás et al., 2020; Mazorra-Manzano et al., 2020; Karim & Aider, 2022; Soumati et al., 2023). Une autre voie prometteuse de valorisation repose sur l'obtention de peptides bioactifs à partir des protéines du lactosérum. Par exemple, des peptides aux propriétés antihypertensives, tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), peuvent être générés par l'hydrolyse enzymatique ciblée des protéines sériques (Mazorra-Manzano et al., 2020). Cette approche est particulièrement pertinente dans le cadre de ce projet, car elle permet d'exploiter le potentiel fonctionnel des protéines agroalimentaires pour produire des hydrolysats peptidiques aux activités biologiques spécifiques. Ainsi, la valorisation du lactosérum par des stratégies adaptées d'extraction et de transformation constitue une opportunité pour le développement de peptides d'intérêt en nutrition et en santé.

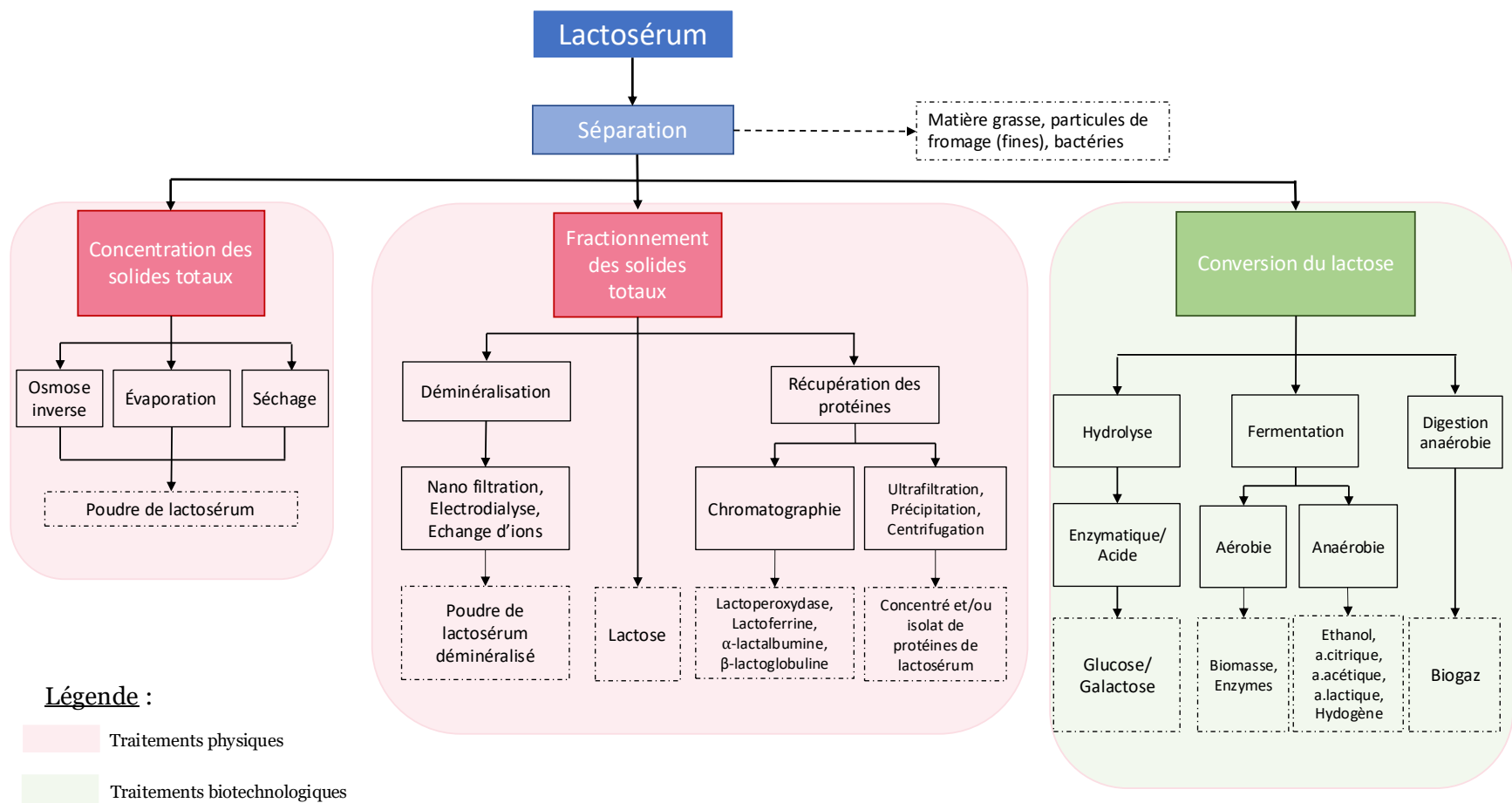


Figure 1.4. Les différents procédés de valorisation du lactosérum (adapté de (Soumati et al., 2023))

1.2.2.3. Les protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum, également appelées protéines sériques (ou protéines de petit lait), sont des molécules globulaires et représentent environ 20 % des protéines totales présentes dans le lait de vache (Mollea et al., 2013). Ces protéines se subdivisent en deux groupes principaux : les protéines majoritaires et les protéines minoritaires (Cheison & Kulozik, 2017; Sebastián-Nicolás et al., 2020). Les protéines minoritaires, qui constituent 6 % des protéines sériques, incluent des immunoglobulines, l'albumine sérique bovine (BSA), des protéoses-peptones, ainsi que diverses enzymes telles que le lysozyme, la lactoperoxydase, la catalase, et les phosphatases (alcalines et sulfhydryles oxydases). À l'inverse, les protéines majoritaires, représentant 14 % des protéines sériques, sont essentiellement constituées de la β -LG et de l' α -LA, qui représentent respectivement 10 % et 4 % des protéines sériques (Smithers, 2015b; Cheison & Kulozik, 2017; Ballatore et al., 2020). La β -LG est la plus abondante et a fait l'objet d'études en raison de son aptitude à générer des peptides bioactifs après hydrolyse enzymatique (Mikhaylin et al., 2017; Agoua et al., 2020a, 2022). Cependant, bien que moins abondante, l' α -LA constitue un substrat d'intérêt pour la production de peptides bioactifs. De plus, l'influence des CEP sur son hydrolyse enzymatique reste largement inexplorée.

1.2.2.4. L' α -LA

L' α -LA est la deuxième protéine majoritaire présente dans le lactosérum humain et bovin (Permyakov, 2020; Shi et al., 2020). Cette protéine globulaire acide, dont le point isoélectrique se situe entre 4,7 et 5,1, possède un poids moléculaire de 14,2 kDa (Mehra et al., 2021). En milieu acide, elle adopte un état de globule fondu caractérisé par un repliement compact, intermédiaire entre les états natif et déplié. Cet état se distingue par la conservation de la structure secondaire et la perte de la structure tertiaire. La liaison du calcium au site spécifique de fixation est essentielle au repliement et à la stabilité structurelle de cette métalloprotéine calcique. En conditions natives, l' α -LA se trouve sous une forme compacte, rendant la protéolyse enzymatique difficile à réaliser. Par ailleurs, elle est reconnue comme la protéine du lactosérum la plus résistante à la chaleur, sa dénaturation intervenant à des

températures supérieures à 65 °C (Yang et al., 2006; Shi et al., 2020; Permyakov, 2020). L' α -LA se compose de 123 résidus d'acides aminés, incluant huit cystéines formant quatre ponts disulfures (Cys⁶-Cys¹²⁰, Cys²⁸-Cys¹¹¹, Cys⁶⁰-Cys⁷⁷ et Cys⁷³-Cys⁹¹) (Figure 1.5).

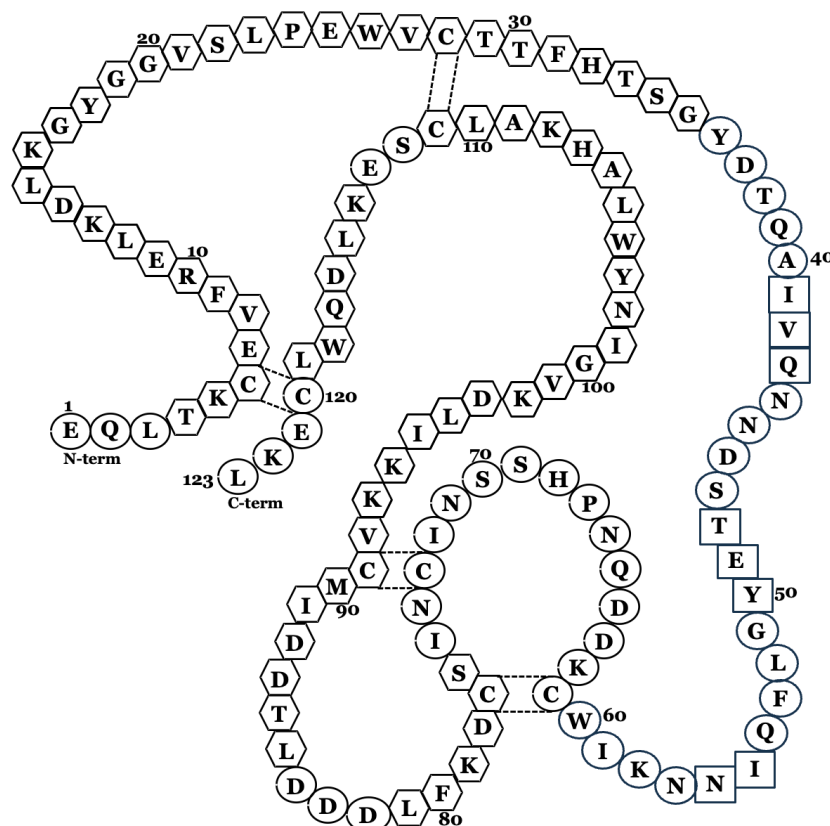


Figure 1.5. Représentation graphique de l'architecture secondaire de l' α -LA, inspirée des travaux de Farrell et al.,(2002). L'organisation structurale est illustrée par des formes géométriques : les hexagones symbolisent les hélices α , les carrés les feuillets β et les cercles les boucles.

Les extrémités de sa chaîne polypeptidique comprennent un résidu de leucine en C-terminal et un résidu d'acide glutamique en N-terminal (Ge et al., 2024). L' α -LA présente une architecture bipartite avec un grand domaine α -hélicoïdal et un petit domaine β (Figure 1.6). Le domaine α est constitué de trois hélices α (résidus 5-11, 23-34 et 86-99), d'une hélice (résidus 105-110) et de deux courtes hélices (résidus 18-20 et 115-118). Le domaine β comprend un feuillet β -plissé antiparallèle composé de trois brins (résidus 41-43, 48-50 et 55-56) et une courte hélice (résidus 77-80). Ces deux domaines sont séparés par une fente centrale (Velusamy & Palaniappan, 2016; Cheison & Kulozik, 2017; Permyakov, 2020; X. Ge et al., 2024).

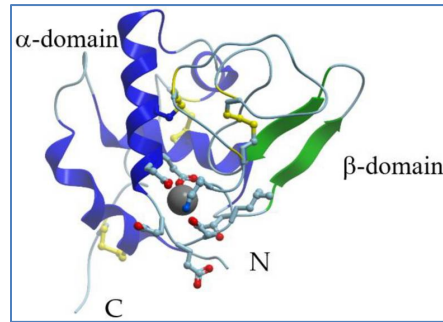


Figure 1.6. Structure tertiaire de l' α -LA humaine observée aux rayons X, montrant l'emplacement des liaisons disulfures (jaune) et des sites de liaisons au calcium (rouge).

1.2.2.5. Les peptides bioactifs d' α -LA

Les molécules bioactives sont définies en tant que « composants alimentaires qui peuvent affecter les processus biologiques ou les substrats et, par conséquent, avoir un impact sur la fonction ou l'état du corps et, en fin de compte, sur la santé » (Bouglé & Bouhallab, 2017). Parmi ces molécules, les peptides bioactifs issus de l'hydrolyse des protéines alimentaires suscitent un intérêt croissant. Dans ce contexte, l' α -LA constitue une source privilégiée de peptides bioactifs, dont les effets varient selon les enzymes utilisées pour son hydrolyse. L'analyse des publications disponibles sur PubMed révèle que les peptides dérivés de l' α -LA hydrolysée par des enzymes (par exemple la pepsine, l'alcalase ou la pancréatine) ont fait l'objet d'un nombre conséquent d'études. Entre 1989 et 2025, 412 recherches ont été publiées sur cette thématique (Figure 1.7), avec une augmentation notable depuis 2016, dépassant 20 publications par an.

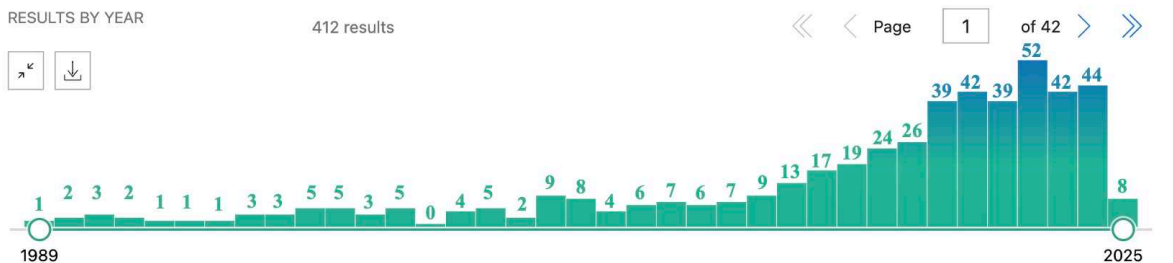


Figure 1.7. Évolution du nombre de publications sur les peptides bioactifs dérivés de l' α -LA hydrolysée par diverses enzymes entre 1989 et 2025

Cette dynamique scientifique témoigne d'un intérêt croissant pour l'exploitation des peptides bioactifs issus de l' α -LA, notamment pour leurs applications en nutrition fonctionnelle et en santé humaine (Tableau 1.2).

Tableau 1.2. Liste non exhaustive de peptides bioactifs obtenus par hydrolyse enzymatique de l' α -LA

<i>Origine</i>	<i>Séquence</i>	<i>Enzyme</i>	<i>Activité biologique</i>	<i>Référence</i>
Lait humain	GLF	Trypsine	Immunomodulateur	(Jaziri et al., 1992)
α -LA d'Agropur US	VSLPEW, SLPEW, LDQWL, VGINYW et GVSLPEW	Pepsine et pancréatine	Inhibiteur de l'ECA	(Xie, Du, et al., 2022)
α -LA bovine	KILKD	Alcalase	- Empêche la résistance à l'insuline induite par le TNF- α dans les adipocytes 3T3-L1 - Suppression de l'inflammation médiée par NF- κ B	(Gao et al., 2022)
α -LA bovine	VGINYWLAHK	Flavorzyme	Antioxydant	(Mann et al., 2015)
α -LA bovine	KVGIN	Pepsine	Antimicrobien	(Théolier et al., 2013)
α -LA bovine	YGLF	Pepsine	Opiode	(Antila et al., 1991)
-	IWCKNDQDPHSS NICNISCDKFLNN DLTNNIMCVK	Endopeptidase lysine c	Stimulant de croissance	(Kanda et al., 2007)

En revanche, les peptides bioactifs dérivés de l' α -LA hydrolysée par l' α -CT restent largement sous-étudiés. Une recherche sur PubMed recense uniquement cinq études publiées entre 1999 et 2025, mettant en évidence un nombre limité de peptides bioactifs identifiés. Ces travaux ont néanmoins révélé plusieurs séquences présentant un intérêt fonctionnel, notamment CKKDDQNPHSCDKF, qui a démontré une activité antimicrobienne, ainsi qu'un hydrolysat contenant 21 peptides, capable d'induire la libération de cholécystokinine et de jouer un rôle dans la régulation de la satiété (Pellegrini et al., 1999; Catiau et al., 2011). De plus, un hydrolysat peptidique issu de l' α -LA de brebis a été décrit pour ses propriétés hypotensives et antidiabétiques, tandis que le peptide IW a été identifié pour son effet hypotenseur (Martin et al., 2018; Iram et al., 2022). Enfin, le peptide RELKDL s'est distingué par sa capacité à moduler la réponse immunitaire (Jacquot et al., 2010).

Ainsi, malgré l'intérêt démontré pour les peptides bioactifs issus de l' α -LA, les recherches portant spécifiquement sur ceux obtenus par hydrolyse à l' α -CT restent insuffisantes. Cette lacune scientifique souligne la nécessité d'études approfondies afin de mieux caractériser ces peptides et d'évaluer leur potentiel bioactif.

1.3. Le pois et ses protéines

1.3.1. La place de l'industrie du pois

Le pois commun (*Pisum sativum L.*), appartenant à la famille des *Fabacées*, figure parmi les premières plantes domestiquées par l'homme. À ce jour, le pois se distingue comme le leader mondial de la production de légumineuses, avec une culture répartie dans plus de 90 pays et une production annuelle avoisinant 16 millions de tonnes (Santos et al., 2019; Lu et al., 2020a; Ludvíková & Griga, 2022). Les variétés de pois se divisent en deux catégories principales selon leur utilisation : le pois de jardin (*P.sativum var. sativum*), destiné principalement à la consommation humaine et le pois fourrager (*P. sativum var. arvense*), utilisé traditionnellement pour l'alimentation du bétail et comme engrais (Lu et al., 2020a; Ludvíková & Griga, 2022).

Parmi les principaux pays producteurs, le Canada se distingue par son rôle prépondérant, se positionnant comme le principal acteur à l'échelle mondiale (Lu et al., 2020a). En 2017, le Canada a produit environ 4,6 millions de tonnes de grains de pois verts et jaunes, grâce à des rendements élevés et des coûts de production compétitifs (200 USD/tonnes) (Ge et al., 2020). Une large part de cette production est exportée, répondant ainsi à une demande croissante pour des sources de protéines végétales sur le marché international (Ge et al., 2020; Lu et al., 2020a). En Europe, la France joue un rôle de premier plan dans la production de pois, occupant la position de leader au sein de l'Union européenne. En 2021, la production française s'élevait à 582 000 tonnes, faisant de cette légumineuse la graine protéagineuse la plus cultivée dans le pays, devant le soja et la féverole. La production française se répartit entre plusieurs usages : 25 % sont destinés à l'alimentation humaine, 43 % à l'alimentation animale, et 32 % sont exportés (Terres Univia, FranceAgriMer, 2021). Cette diversité

d'applications témoigne de l'importance économique et stratégique du pois sur le territoire national.

En conjuguant des dynamiques complémentaires, le Canada et la France illustrent le rôle stratégique du pois dans l'agriculture mondiale. Tandis que le Canada domine les échanges internationaux en répondant aux besoins globaux, la France se positionne comme un acteur clé en Europe, valorisant pleinement les potentialités économiques et environnementales de cette culture essentielle.

1.3.2. La graine de pois et sa composition

La graine de pois se caractérise par une composition majoritairement constituée d'amidon (40 à 50 %), de protéines (20 à 25 %) et de fibres alimentaires (10 à 20 %), présentes sous forme soluble et insoluble. Les lipides, en revanche, y sont faiblement représentés (moins de 2,5 %). Des composés mineurs tels que les vitamines, les minéraux, l'acide phytique, les polyphénols, les saponines et les oxalates complètent ce profil nutritionnel complexe (Tzitzikas et al., 2006; A. C. Y. Lam et al., 2018; Lu et al., 2020a; Wu et al., 2023). Cependant, la composition des graines varie largement en fonction de multiples facteurs, notamment la génétique, les conditions environnementales, les pratiques culturales, la maturité des graines à la récolte, ainsi que les procédés de transformation post-récolte (Tzitzikas et al., 2006; Daba & Morris, 2022). Les fluctuations de la teneur en amidon et en protéines sont particulièrement influencées par des variables abiotiques telles que la qualité du sol, les précipitations ou la température, ainsi que par des caractéristiques propres aux cultivars. Par exemple, des études ont mis en évidence une corrélation positive entre des températures élevées et une teneur accrue en protéines, souvent associées à une réduction des précipitations (Nikolopoulou et al., 2007; Arif et al., 2020). Par ailleurs, des différences géographiques, morphologiques et phénotypiques, comme la forme et la couleur des graines, peuvent moduler ces variations. À titre d'exemple, les accessions provenant d'Europe de l'Ouest ou du Canada présentent généralement une teneur en protéines inférieure à celles originaires d'Europe de l'Est (Jha et al., 2013). Une analyse approfondie des ressources génétiques mondiales (GRIN), basée sur 1 146 accessions de pois, a révélé que les facteurs génétiques et environnementaux étaient les principales sources de variation de la teneur en

protéines, oscillant entre 13,2 % et 30,9 % (USDA, 2025). Ces fluctuations sont sous-tendues par des mécanismes génétiques complexes, impliquant des familles multigéniques responsables de la régulation de l'accumulation des protéines dans les graines (Daba & Morris, 2022). Les interactions entre génotype et environnement, souvent étudiées sur plusieurs cycles culturaux, soulignent l'importance d'une approche intégrative pour optimiser la qualité nutritionnelle et fonctionnelle des graines de pois (Wang et al., 2010; Lam et al., 2018).

1.3.3. Valorisation du pois

Le pois, en tant que ressource clé parmi les légumineuses, se distingue par ses applications variées et son potentiel à répondre aux défis alimentaires, énergétiques et environnementaux actuels (Fatima et al., 2024). En alimentation humaine, ses fibres et protéines fonctionnelles jouent un rôle central dans le développement de produits innovants. Par exemple, elles enrichissent des soupes instantanées et des pains au sarrasin en fibres alimentaires, et contribuent à la formulation de boissons et de yaourts probiotiques enrichis en PP et de riz (Hanan et al., 2020, 2021; Manus et al., 2021). De plus, son utilisation comme substitut à la viande, notamment dans les nuggets enrichis en isolat de PP, offre des alternatives nutritionnellement avantageuses tout en réduisant les coûts des produits carnés (Shoaib et al., 2018). Par ailleurs, l'amidon résistant contenu dans les graines de pois présente des effets bénéfiques sur la santé intestinale, soulignant l'intérêt du pois dans l'amélioration du microbiote et la gestion de la glycémie (Kan et al., 2018; Wang et al., 2021; Wu et al., 2023). Au-delà de l'alimentation humaine, le pois ouvre des perspectives prometteuses dans les domaines technologiques et environnementaux. En biotechnologie, ses coques permettent de développer des matériaux d'emballage biodégradables comestibles, renforcés par des nanocristaux de cellulose, offrant une résistance mécanique et une stabilité thermique accrues (Li et al., 2020). L'encapsulation de composés bioactifs, tels que la curcumine ou le resvératrol, à l'aide d'isolats de PP, illustre également son potentiel dans la protection et la libération ciblée d'agents thérapeutiques (Zhang et al., 2022). Les PP et l'amidon sont également indispensables dans les propriétés texturales en industrie, notamment avec les propriétés de solubilité, de capacité de rétention d'eau et d'huile, de gélatinisation,

d'émulsion ou de mousse (Guo et al., 2018; Ge et al., 2020). Parallèlement, la bioconversion de l'amidon en bioéthanol ou biobutanol souligne son rôle dans la transition énergétique vers des carburants renouvelables (Rehman et al., 2015; Nimbalkar et al., 2018). Le pois contribue aussi à l'assainissement environnemental, avec des applications remarquables dans le traitement de l'eau. Les biochars issus du pois et ses peaux se sont révélés efficaces pour adsorber les métaux lourds, tels que le cuivre, et purifier les milieux aqueux (El-Nemr et al., 2020; A. Kumar et al., 2022).

Les PP et leurs hydrolysats peptidiques se distinguent par des propriétés bioactives remarquables, notamment des effets antioxydants, antihypertenseurs et antidiabétiques, qui les positionnent comme des ingrédients prometteurs pour des applications nutritionnelles et thérapeutiques (Ge et al., 2020). De plus, les farines de pois et les coques de pois (jaune ou vert) permettent un effet protecteur antioxydant (Liu et al., 2019; Guo et al., 2019 ; Guo et al., 2021). Ces effets bénéfiques sont amplifiés par la richesse du pois en polyphénols et en fibres alimentaires, contribuant à la régulation du microbiote intestinal et à l'amélioration globale de la santé humaine (Ge et al., 2020). Cette combinaison unique de composés bioactifs fait du pois une ressource clé pour le développement de produits destinés à prévenir ou à gérer des pathologies chroniques. En parallèle, les co-produits, comme les cosses de pois, offrent une alternative aux sources traditionnelles comme le soja, grâce à leur richesse en acides aminés essentiels, en glucides digestibles (amidon, mono- et disaccharides par exemple) et en minéraux. Avec une digestibilité accrue par rapport à d'autres co-produits végétaux et une faible teneur en facteurs antinutritionnels, ils répondent aux besoins des systèmes d'élevage modernes tout en réduisant les coûts de production et l'impact environnemental (Tassoni et al., 2020).

1.3.4. Les protéines de pois

1.3.4.1. Les méthodes de production des protéines de pois

Trois approches majeures sont couramment employées pour l'extraction des PP : l'extraction par voie alcaline suivie de précipitation, l'ultrafiltration couplée à la diafiltration, ainsi que l'extraction saline associée à la micellisation.

L'extraction par voie alcaline suivie d'une précipitation repose sur la solubilité élevée des protéines de légumineuses en milieu alcalin. Plus précisément, les PP présentent une solubilité minimale à leur point isoélectrique, situé autour de pH 4,5, ce qui permet leur extraction en conditions alcalines, suivie d'une précipitation isoélectrique. Ce procédé constitue la méthode de référence dans l'industrie (Figure 1.8) en raison de son efficacité et de sa simplicité (Lam et al., 2018).

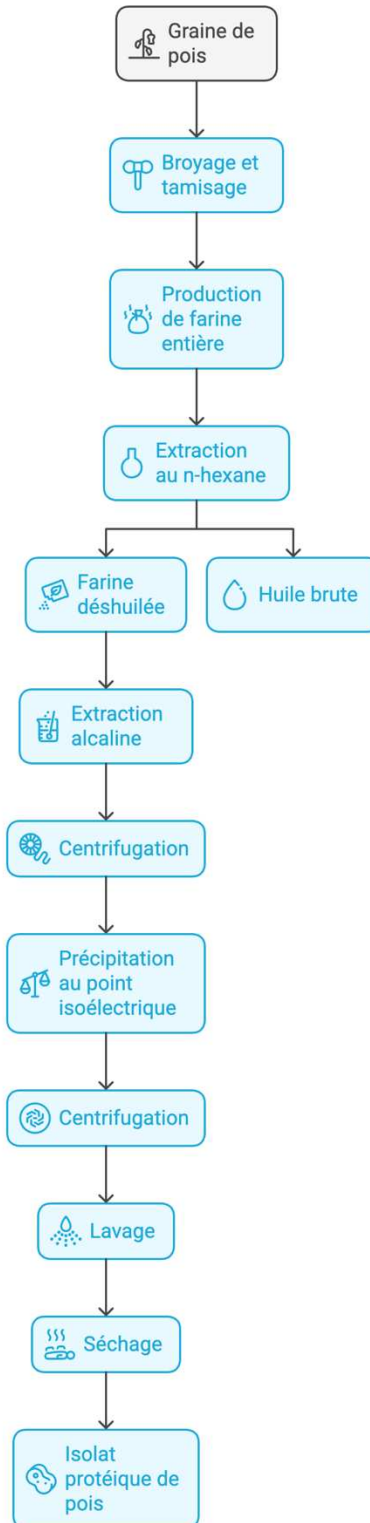


Figure 1.8. Extraction d'un isolat de PP par extraction alcaline suivie d'une précipitation (Boye et al., 2010 et Lam et al., 2018)

La graine de pois est initialement transformée en farine, laquelle subit ensuite un processus de dégraissage. Cette étape essentielle réduit les interactions entre protéines et lipides, augmentant ainsi la solubilité des protéines dans un milieu alcalin (Boye et al., 2010). La farine déshuilée est ensuite solubilisée et homogénéisée dans une solution aqueuse maintenue à un pH alcalin compris entre 8 et 11, généralement ajusté à l'aide d'hydroxyde de sodium, de potassium ou de calcium. Ce traitement s'étend sur une durée de 30 à 180 min. Pour optimiser la solubilisation, une température contrôlée entre 50 et 60 °C peut être appliquée. Après cette étape, le mélange est soumis à une centrifugation pour séparer les protéines solubilisées des composés non solubles. Les protéines sont ensuite précipitées à leur point isoélectrique (pH 4,5) à l'aide d'acides tels que l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique, suivie d'une seconde centrifugation, de lavages successifs et d'une neutralisation. Enfin, le produit est séché par différentes méthodes, telles que le séchage au tambour, la pulvérisation ou la lyophilisation. L'isolat protéique obtenu contient en moyenne 90 % de protéines, bien que ce taux puisse fluctuer entre 80 et 94 % selon les conditions d'extraction. Ces variations influencent le rendement, la pureté, ainsi que les propriétés fonctionnelles de l'isolat final (Lam et al., 2018).

L'ultrafiltration couplée à la diafiltration constitue une méthode d'extraction des protéines reposant sur la séparation moléculaire en fonction de leur poids moléculaire. Grâce à l'utilisation de membranes semi-perméables, il est possible d'isoler sélectivement les protéines en fonction de leur taille et de leurs caractéristiques physicochimiques. L'efficacité du procédé est intrinsèquement liée à plusieurs paramètres, notamment la nature de la membrane utilisée, son seuil de coupure moléculaire, la concentration en protéines dans le filtrat, le volume traité, ainsi que l'ajout éventuel d'une étape de diafiltration, qui permet une épuration plus poussée du mélange. Comparée à la méthode conventionnelle de solubilisation alcaline suivie de précipitation, l'ultrafiltration-diafiltration présente plusieurs atouts majeurs. Elle permet (a) de préserver l'intégrité structurelle et fonctionnelle des protéines en raison de conditions opératoires plus douces, (b) d'obtenir des rendements d'extraction supérieurs, et (c) d'éliminer efficacement les composés antinutritionnels indésirables. Ces atouts se traduisent par des rendements protéiques accrus, conférant à cette technique un fort potentiel pour la valorisation des fractions protéiques, en particulier dans le cadre de leur exploitation au sein de divers secteurs industriels à haute valeur ajoutée (Lam et al., 2018).

L'extraction saline associée à la micellisation repose sur les principes de salting-in et salting-out, suivis d'une phase de dessalement permettant d'ajuster la force ionique du milieu. Dans un premier temps, la farine est mise en suspension dans une solution saline de force ionique maîtrisée et soumise à une agitation durant 10 à 60 min, favorisant ainsi la solubilisation des protéines. Les composés insolubles sont ensuite éliminés par tamisage, filtration, décantation ou centrifugation, ne conservant que le surnageant enrichi en protéines. Une étape de dessalement est alors appliquée afin de réduire la force ionique du milieu, stabilisant ainsi les protéines en solution. En fonction des propriétés de relargage des protéines d'intérêt et de la présence de contaminants protéiques, une précipitation et/ou concentration est réalisée pour affiner leur séparation. Cette méthode d'extraction présente plusieurs atouts majeurs, notamment le maintien de conditions douces, préservant la structure et la fonctionnalité des protéines, ainsi que le respect du pH physiologique du milieu, minimisant ainsi les risques d'altération ou de dénaturation (Lam et al., 2018).

Une fois les protéines extraites, une analyse approfondie de leur composition, de leur structure et de leurs propriétés est nécessaire pour en comprendre la diversité et les fonctionnalités.

1.3.4.1.1. Les PP et leur classification

Quatre groupes de protéines permettent de classer les PP : la globuline, l'albumine, la prolamine et la glutéline (Tableau 1.3).

Tableau 1.3. Classification des protéines de la graine de pois et leurs caractéristiques (Lu et al., 2020; Shen et al., 2022)

<i>Classe</i>	<i>Proportion (%)</i>	<i>Sous-classe</i>	<i>Unité Svedberg</i>	<i>Masse moléculaire (kDa)</i>	<i>Nombres de sous-unités</i>	<i>Masse moléculaire de la sous-unité (kDa)</i>
Globuline	55 – 65	Légumine	11 S	320 – 410	6	60 - 65
		Viciline	7 S	150	3	48 – 50
		Convicine	8 S	180 – 210	3	70
Albumine	18 – 25	/	2 S	48 – 68,5	2	24 - 25
Prolamine	4 – 5	/	/	/	/	/
Glutéline	3 – 4	/	/	/	/	/

Les protéines majoritaires sont les globulines et les albumines hydrosolubles. En effet, elles représentent à elles seules entre 73 et 90 % de la teneur totale en protéines des graines de pois (Tzitzikas et al., 2006). Chaque protéine possède des caractéristiques distinctes et celles-ci sont décrites ci-dessous.

Dans la graine, les globulines constituent les protéines de réserve essentielles, mobilisée après la germination pour fournir l'azote nécessaire au développement embryonnaire (Tzitzikas et al., 2006). Elle représente la fraction majoritaire des protéines de stockage, avec une proportion variant entre 55 et 65 % (Shen et al., 2022). En fonction de leur coefficient de sédimentation, ces protéines se classent en trois groupes distincts : la légumine, la viciline et la conviciline (Figure 1.9) (Lu et al., 2020; Shen et al., 2022).

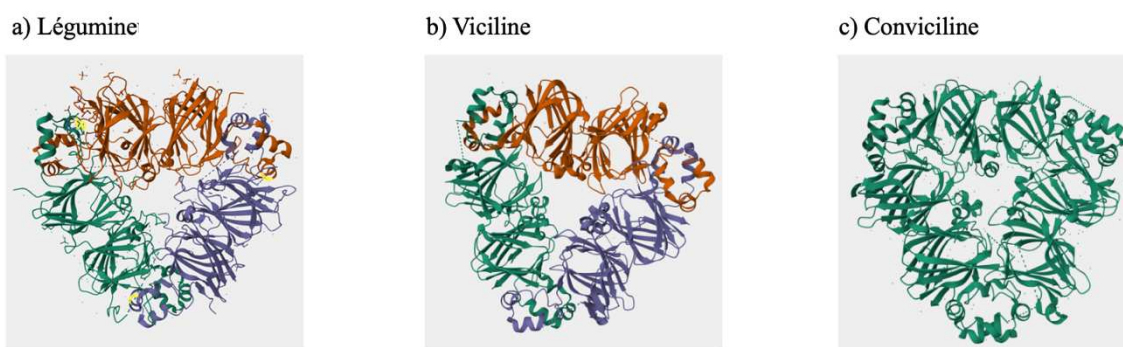


Figure 1.9. Représentation des structures des globulines de pois : (a) légumine, (b) viciline et (c) conviciline. Ces structures sont des exemples de la diversité structurale de ces protéines (Uniprot)

Parmi ces fractions, la légumine et la viciline prédominent avec un ratio d'environ 2:1, tandis que la conviciline est présente en quantité plus limitée (Lam et al., 2018). Ces trois catégories se différencient par leur abondance relative, leur composition chimique et leur structure, influençant ainsi leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles. En particulier, leur aptitude à s'assembler ou à se dissocier ainsi que leurs caractéristiques de surface jouent un rôle déterminant dans leur comportement et leurs fonctionnalités (Lu et al., 2020).

La légumine (11S) est une protéine hexamérique dont la masse moléculaire se situe entre 320 et 410 kDa. Elle est formée de six sous-unités, chacune pesant approximativement 60 à 65 kDa. Ces sous-unités se composent de deux polypeptides, une chaîne acide α (40 kDa) et une chaîne basique β (20 kDa), unies par un pont disulfure. Une forte variabilité structurale est observée au sein de ces chaînes, bien que la chaîne α , plus hydrophile, soit

majoritairement exposée à la surface de la molécule, tandis que la chaîne β , hydrophobe, s'oriente vers l'intérieur et constitue le noyau de la protéine (Lam et al., 2018; Lu et al., 2020; Shen et al., 2022). La viciline (7S) est une protéine trimérique dont la masse moléculaire avoisine 150 kDa. Elle se compose de trois sous-unités monomériques (α , β et γ) de 48 à 50 kDa. En parallèle, la convicine, une variante polymorphe (8S), présente une masse moléculaire comprise entre 180 et 210 kDa (Tzitzikas et al., 2006; Lu et al., 2020). Contrairement à la légumine, la viciline ne contient pas de cystéine, ce qui empêche la formation de ponts disulfures et la rend dépendante principalement des interactions hydrophobes pour sa stabilisation. De plus, la sous-unité γ est souvent glycosylée, ce qui lui confère une certaine hydrophilie, alors que la glycosylation (et donc l'hydrophilie associée) est absente chez la légumine (Lam et al., 2018; Lu et al., 2020).

Les albumines constituent la seconde fraction protéique la plus abondante dans les graines de pois, représentant entre 18 et 25 % de la teneur totale en protéines. Ces protéines cytosoliques, impliquées dans divers processus métaboliques et enzymatiques, possèdent une masse moléculaire de 68,5 kDa et un coefficient de sédimentation de 2S (McCarthy et al., 2016). Elles regroupent plusieurs molécules essentielles à la germination, jouant ainsi un rôle clé dans le développement initial des graines. Cette fraction regroupe diverses molécules fonctionnelles, incluant des enzymes, des inhibiteurs de protéase et d'amylase, ainsi que des lectines, dont la masse moléculaire varie entre 5 et 80 kDa. Parmi ces protéines, deux albumines de faible poids moléculaire, PA1a et PA1b, ont été identifiées : PA1a, constituée de 53 acides aminés, affiche une masse de 6 kDa, tandis que PA1b, composée de 37 acides aminés, présente un poids de 4 kDa (Figure 1.10) (Shanthakumar et al., 2022). Toutefois, le rapport albumine/globuline dans les isolats de PP est susceptible de varier en fonction du génotype ainsi que des conditions de traitement ou d'extraction des protéines. Ces variations modulent leurs caractéristiques physico-chimiques et impactent leurs fonctionnalités (Lu et al., 2020).

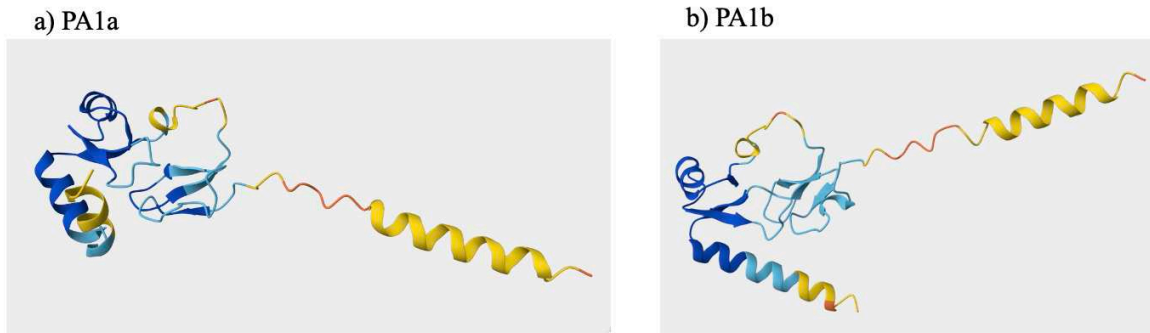


Figure 1.10. Représentation des structures des albumines de pois : (a) PA1a et (b) PA1b (Uniprot)

La prolamine et la glutéline constituent des fractions protéiques minoritaires dans la graine de pois, représentant respectivement environ 5 % et 3 à 4 % de la teneur totale en protéines. Bien que peu abondantes, elles contribuent à la diversité fonctionnelle des protéines du pois (Lu et al., 2020).

Les PP jouent un rôle essentiel dans l'industrie agroalimentaire, où elles sont de plus en plus valorisées pour leurs propriétés nutritionnelles et technofonctionnelles. Elles sont intégrées dans une large gamme de produits, allant des boissons enrichies aux substituts de viande, en passant par les aliments fermentés et probiotiques, illustrant ainsi leur contribution au développement de formulations alimentaires innovantes et durables (Shoaib et al., 2018; Hanan et al., 2020, 2021). Grâce à leur digestibilité élevée, leur profil en acides aminés essentiels et leur polyvalence technologique, elles constituent une alternative de choix aux protéines animales (Tassoni et al., 2020). Au-delà de leur intérêt en tant qu'ingrédients fonctionnels, les PP suscitent un intérêt croissant pour leur potentiel à libérer des peptides bioactifs lors de leur hydrolyse enzymatique. Ces peptides, dont les propriétés antioxydantes, antihypertensives et antidiabétiques sont largement documentées, renforcent la place du pois comme une source stratégique de composés bioactifs à visée nutritionnelle et thérapeutique (Ge et al., 2020).

1.3.4.1.2. Les peptides bioactifs issus des PP

Les peptides bioactifs issus des protéines de pois (PP) par hydrolyse enzymatique présentent principalement des activités antioxydantes, antimicrobiennes, antihypertensives et antidiabétiques (Wang et al., 2022). Parmi les enzymes digestives les plus couramment employées pour générer ces peptides bioactifs, la pepsine et l'alcalase sont particulièrement utilisées (Liu et al., 2019; Wei et al., 2019; Ding et al., 2020; Akbarian et al., 2022).

De nombreuses études ont exploré l'utilisation de différentes enzymes pour l'obtention de peptides bioactifs à partir des PP. L'analyse des données issues de PubMed révèle que 84 études ont été menées sur ce sujet depuis 1993, avec une intensification des recherches à partir de 2016, se traduisant par la publication annuelle de plus de cinq études (Figure 1.11).

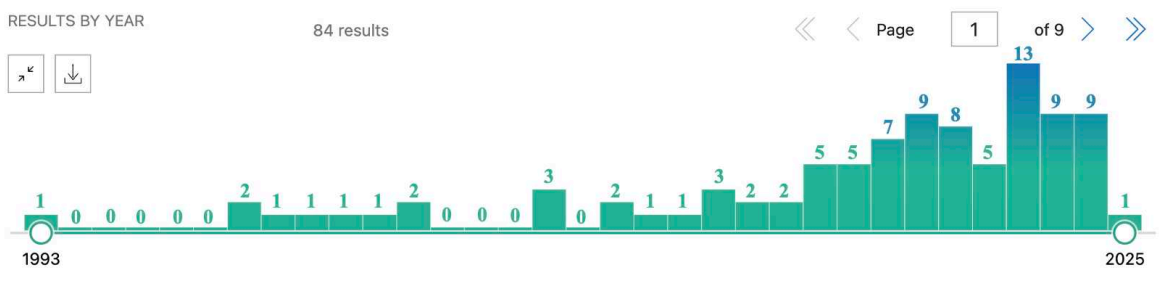


Figure 1.11. Évolution du nombre d'études sur les peptides bioactifs issus des PP depuis 1993

Une liste non exhaustive des peptides bioactifs identifiés est présentée dans le Tableau 1.4

Tableau 1.4. Liste non exhaustive des peptides bioactifs dérivés des PP.

<i>Origine</i>	<i>Séquence</i>	<i>Enzyme</i>	<i>Activité biologique</i>	<i>Référence</i>
PP	YSSPIHIW, ADLYNPR, HYDSEAILF, AGVLPGIK et GHYPNPDIEYG	Alcalase	Antioxydant	(Ding et al., 2020)
PP	LGP, LKP, YW, VY, AKSLSDRFSY, LSDRFS et SDRFSY	Thermolase et pepsine	Inhibiteur de l'ECA, antihypertenseur	(Liao et al., 2019)
PP	ALP, LLP, VLP et SP	Alcalase et neutrase	Antidiabétique	(Wei et al., 2019)
PP	AAASYANGNAP, RGNPAL, WRVSVAPGT et LRWDPIPA	Alcalase	Immunomodulateur	(Liu et al., 2024)

Toutefois, malgré cet intérêt croissant, il semble qu'aucune étude n'ait encore permis d'identifier des peptides bioactifs issus des PP par hydrolyse à l' α -CT. Néanmoins, une recherche a rapporté la production de peptides à activité antihypertensive à partir d'un hydrolysate enzymatique combinant l' α -CT et la thermolysine (Rudolph et al., 2017).

Ainsi, bien que les protéines de pois constituent une source prometteuse de peptides bioactifs, les recherches portant spécifiquement sur leur hydrolyse par l' α -CT demeurent limitées. Cette lacune souligne la nécessité d'investigations approfondies afin de caractériser ces peptides et d'évaluer leur potentiel bioactif.

Finalement, l' α -LA et les PP constituent des précurseurs prometteurs pour la génération de peptides bioactifs. Toutefois, leur exploitation optimale repose sur le développement de stratégies de production performantes, dont les contraintes actuelles requièrent une évaluation approfondie.

1.4. Production de peptides : méthodes, bioactivités et enjeux

1.4.1. Méthodes de production des peptides bioactifs

Les peptides bioactifs sont initialement intégrés sous une forme inactive au sein de leur protéine précurseur et doivent être libérés par des méthodes spécifiques de production protéique afin d'exercer leurs effets biologiques. Diverses stratégies peuvent être employées, incluant l'utilisation d'enzymes digestives endogènes, d'enzymes protéolytiques commerciales, la synthèse chimique ainsi que l'hydrolyse chimique (Figure 1.12).

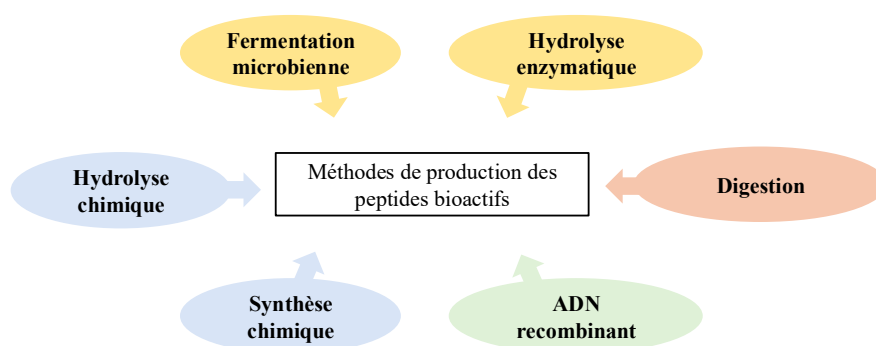


Figure 1.12. Schéma de la méthode de production des peptides bioactifs (Cruz-Casas et al., 2021)

Par ailleurs, certaines transformations alimentaires, telles que le séchage, la fermentation ou la maturation, induisent la libération de peptides sous l'effet d'enzymes microbiennes, de modifications chimiques et de variations de température ou de durée de traitement. En complément de ces méthodes traditionnelles, les avancées en biotechnologie ont conduit au développement de la production de peptides par synthèse d'ADN recombinant, une approche reposant sur le clonage et l'expression génétique dans des micro-organismes spécifiques. Chaque méthode présente des avantages et des limitations, influençant leur efficacité, leur rendement et leur potentiel d'application à l'échelle industrielle (Cruz-Casas et al., 2021).

L'hydrolyse enzymatique est l'une des techniques les plus couramment employées en raison de sa spécificité élevée. Elle repose sur l'action d'enzymes commerciales capables d'assurer une hydrolyse régiosélective et stéréosélective des protéines, permettant ainsi la génération de peptides aux compositions bien définies. Cette approche présente l'avantage de se dérouler dans des conditions modérées, limitant les dégradations non spécifiques et

l'apparition de co-produits indésirables (Cruz-Casas et al., 2021). De plus, elle permet d'accélérer la vitesse de réaction d'un facteur allant de 10^6 à 10^{12} par rapport à une hydrolyse non catalysée (Martínez-Medina et al., 2019). Toutefois, son principal inconvénient réside dans son coût élevé, dû à l'utilisation d'enzymes spécifiques dont la production et la stabilisation sont onéreuses. Par ailleurs, les hydrolysats obtenus nécessitent souvent des étapes de purification complexes pour isoler les peptides bioactifs d'intérêt, ce qui accroît davantage le coût global du procédé et limite son application à grande échelle (Cruz-Casas et al., 2021; Wen et al., 2022).

En parallèle, la fermentation microbienne représente une alternative économique exploitant les capacités hydrolytiques de micro-organismes capables de produire naturellement des protéases dégradant les protéines en peptides bioactifs (Wen et al., 2022). Cette approche présente plusieurs avantages : elle réduit considérablement les coûts de production en supprimant le besoin d'enzymes exogènes et elle présente une grande diversité de protéases microbiennes, ce qui génère des peptides de tailles et de séquences différentes (Cruz-Casas et al., 2021). De plus, l'absence de résidus toxiques en fait une technologie considérée comme respectueuse de l'environnement (Cruz-Casas et al., 2021). Cependant, elle présente aussi des inconvénients majeurs. Le profil peptidique obtenu reste difficile à contrôler, car elle est fortement influencée par la souche microbienne sélectionnée ainsi que par les paramètres de fermentation, tels que le pH, la température, la source de carbone utilisée, la disponibilité des nutriments et l'accès à l'oxygène. Cette variabilité rend la standardisation du processus plus complexe et compromet la reproductibilité des résultats (Toldrá et al., 2018; Cruz-Casas et al., 2021). De plus, certaines bactéries peuvent synthétiser des métabolites indésirables, tels que des exo-polysaccharides, ou des bactériocines, nécessitant ainsi une régulation stricte des conditions de fermentation. Ces composés secondaires peuvent interférer avec les effets biologiques attribués aux peptides bioactifs, soulevant la question de savoir si les bioactivités observées sont exclusivement liées aux peptides ou si elles résultent d'une interaction avec ces molécules annexes (Martínez-Augustin et al., 2014). Ainsi, bien que la fermentation microbienne soit une alternative prometteuse à l'hydrolyse enzymatique, elle nécessite une optimisation rigoureuse afin de garantir la qualité des peptides produits.

Contrairement aux méthodes biologiques, l'hydrolyse chimique repose sur l'utilisation d'acides ou de bases fortes, comme l'acide chlorhydrique ou l'hydroxyde de sodium et de hautes températures pour rompre les liaisons peptidiques (Ulug et al., 2021). Ce procédé est apprécié pour son coût relativement bas comparé à l'hydrolyse enzymatique. Il permet une hydrolyse complète des protéines en un temps réduit, ce qui peut être un avantage pour certaines applications industrielles. Toutefois, cette approche présente plusieurs limitations majeures, notamment un contrôle limité du processus, entraînant une composition chimique hétérogène des hydrolysats. L'utilisation de conditions extrêmes de température et de pH, ainsi que de solvants agressifs, altère significativement la qualité nutritionnelle des peptides obtenus et réduit leurs fonctionnalités technologiques (Ulug et al., 2021). Enfin, son impact environnemental est un enjeu majeur, car elle génère des effluents chimiques (Mora & Toldrá, 2023).

Enfin, les approches de synthèse chimique et biotechnologie recombinante offrent une flexibilité inégalée pour la production de peptides de séquence parfaitement contrôlée. La synthèse chimique, notamment la synthèse en phase solide (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), permet de concevoir des peptides aux structures précises, ce qui constitue un atout majeur dans la recherche pharmaceutique et biomédicale. De même, la biotechnologie recombinante exploite des micro-organismes génétiquement modifiés pour produire des peptides de haut poids moléculaire, difficilement accessibles par hydrolyse enzymatique ou fermentation. Toutefois, ces méthodes présentent des contraintes significatives. La synthèse chimique nécessite des solvants organiques, engendrant un impact environnemental non négligeable, et son coût est généralement prohibitif, limitant son application industrielle. Quant à la biotechnologie recombinante, bien qu'elle soit prometteuse, elle demeure limitée par des coûts de production très élevés, une complexité technologique importante, un rendement faible et des contraintes réglementaires strictes concernant l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (Wen et al., 2022).

En résumé, le choix de la méthode de production des peptides bioactifs repose sur une évaluation rigoureuse des objectifs de production, des coûts et des contraintes environnementales. L'hydrolyse enzymatique et la fermentation microbienne sont privilégiées pour leur efficacité et leur statut GRAS (Generally Recognized as Safe), tandis que l'hydrolyse chimique, bien que moins sélective, demeure une alternative envisageable.

Par ailleurs, la synthèse chimique et la technologie de l'ADN recombinant constituent des voies prometteuses, bien que leur industrialisation soit limitée par des coûts élevés et des réglementations strictes. Toutefois, au-delà des considérations liées à leur mode de production, l'intérêt des peptides bioactifs réside dans leurs propriétés fonctionnelles et leur interaction avec les matrices alimentaires. En particulier, les peptides antihypertenseurs et antidiabétiques se caractérisent par des mécanismes d'action spécifiques, étroitement régis par leur structure et leur séquence peptidique. Leur intérêt est d'autant plus crucial que l'hypertension et le diabète de type 2 représentent des enjeux majeurs de santé publique, touchant respectivement 1,3 milliard et 830 millions de personnes dans le monde, avec une prévalence en constante augmentation (OMS, 2019, 2022). Une compréhension approfondie de ces mécanismes est donc indispensable afin d'optimiser leur production, d'améliorer leur stabilité et de maximiser leur efficacité, notamment dans des formulations alimentaires et nutraceutiques visant la prévention et la gestion de ces pathologies.

1.4.2. Peptides à activité antihypertensive et antidiabétique

1.4.2.1. Les peptides à activité antihypertensive

Les peptides antihypertenseurs agissent principalement en modulant le système rénine-angiotensine (SRA), un régulateur clé de l'homéostasie cardiovasculaire (Bechaux et al., 2019). Ce système repose sur une cascade enzymatique initiée par la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I (ANG I) sous l'action de la rénine, une enzyme sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires du rein (Figure 1.13). L'ANG I est ensuite transformée en angiotensine II (ANG II) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Cette dernière joue un rôle central dans la régulation de la pression sanguine, car l'ANG II est un puissant vasoconstricteur qui, en se liant à ses récepteurs spécifiques, stimule la sécrétion d'aldostérone, favorise la rétention hydrosodée et augmente ainsi la pression artérielle. Parallèlement, l'ECA intervient dans la dégradation de la bradykinine, un peptide vasoactif doté de propriétés vasodilatatrices. Son inhibition entraîne une accumulation de bradykinine, intensifiant la réponse hypotensive et amplifiant l'effet antihypertenseur des peptides inhibiteurs (Xue et al., 2021; Fan et al., 2022). Ainsi, l'action de ces peptides repose sur une

double modulation des voies physiologiques : la réduction de la vasoconstriction induite par l'ANG II et le maintien d'un niveau élevé de bradykinine favorisant la vasodilatation.

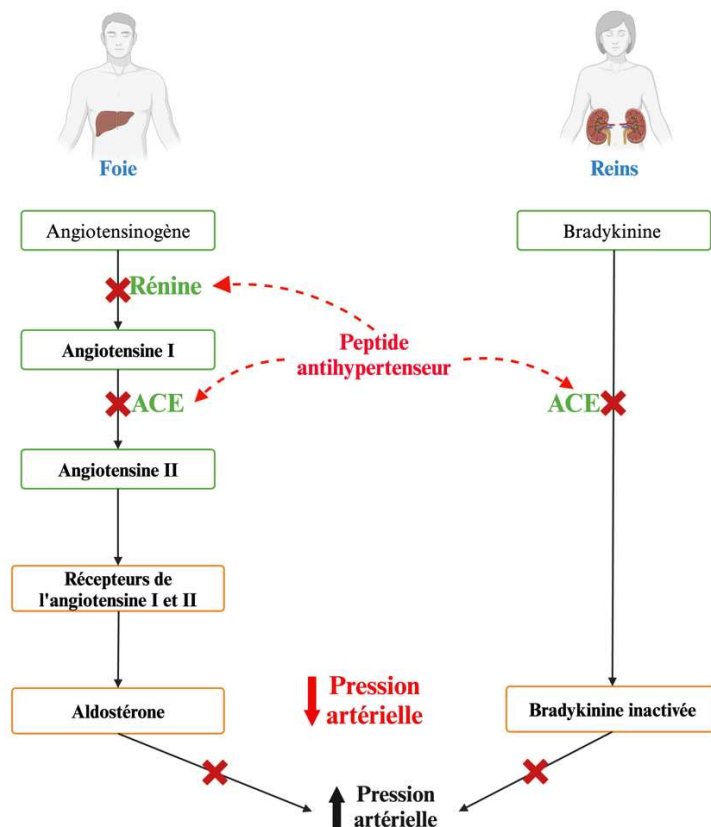


Figure 1.13. Mécanisme d'action du peptide antihypertenseur sur le système rénine/angiotensine et le système kallikréine/kinine. ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine II (Bechaux et al., 2019).

Sur le plan moléculaire, l'ECA est une métalloprotéase possédant un site actif contenant un ion Zn^{2+} , indispensable à son activité catalytique, ainsi que trois sous-sites catalytiques majeurs (S1, S1' et S2). Les peptides inhibiteurs exercent leur action en se liant spécifiquement à ces sites via des interactions hydrogène et hydrophobes, entrant ainsi en compétition avec le substrat naturel. De plus, certains inhibiteurs présentent une affinité pour l'ion Zn^{2+} , entraînant sa chélation et une altération de la catalyse enzymatique, bloquant ainsi la conversion de l'ANG I en ANG II (Xue et al., 2021). Cette synergie d'actions confère aux peptides inhibiteurs de l'ECA un intérêt majeur dans le contrôle de l'hypertension, justifiant leur valorisation dans le développement d'agents antihypertenseurs d'origine peptidique. Leur potentiel est d'autant plus attractif que les traitements conventionnels reposent

principalement sur des inhibiteurs synthétiques de l'ECA, tels que le captopril, l'énalapril et le lisinopril. Bien que ces molécules aient démontré une efficacité clinique avérée, elles sont fréquemment associées à des effets secondaires indésirables, notamment une altération du goût, des éruptions cutanées et une augmentation de l'activité de la rénine plasmatique. Dans ce contexte, les peptides inhibiteurs d'origine agroalimentaire suscitent un intérêt croissant en raison de leurs propriétés avantageuses. Dérivés de protéines animales ou végétales, ils se distinguent par une biodisponibilité accrue, une moindre toxicité et une meilleure tolérance, avec l'absence d'effets indésirables majeurs (Fan et al., 2022). Toutefois, leur efficacité dépend étroitement de leur composition en acides aminés, qui influence leur affinité pour l'ECA et leur mode d'interaction avec son site actif (Bechoux et al., 2019). Les peptides composés de moins de 20 résidus et présentant une masse moléculaire inférieure à 3 kDa sont particulièrement valorisés pour leur capacité à inhiber l'ECA. Leur efficacité repose sur la formation d'interactions stabilisatrices avec les sites catalytiques de l'enzyme, notamment par l'établissement de liaisons hydrogène, d'interactions hydrophobes et de forces de Van der Waals à proximité de l'ion zinc, élément essentiel à l'activité enzymatique (Gallego et al., 2018a; Ichim et al., 2024). De plus, la présence de résidus hydrophobes, tels que la proline en position N- et C-terminale, ainsi que d'acides aminés chargés comme l'acide glutamique et la lysine, joue un rôle déterminant dans l'optimisation de ces interactions moléculaires, renforçant ainsi l'affinité des peptides pour l'enzyme et leur capacité à moduler son activité catalytique (Cheung et al., 1980; Abdelhedi et al., 2017; Chi et al., 2024).

1.4.2.2. Les peptides à activité antidiabétique

Les peptides inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV) jouent un rôle clé dans la modulation de la glycémie, en particulier chez les patients atteints de diabète de type 2 souffrant d'un déficit de sécrétion d'insuline. Ces peptides exercent leur effet en inhibant la DPP-IV, une sérine protéase impliquée dans l'hydrolyse des incrétines, notamment le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le polypeptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP) (Figure 1.14).

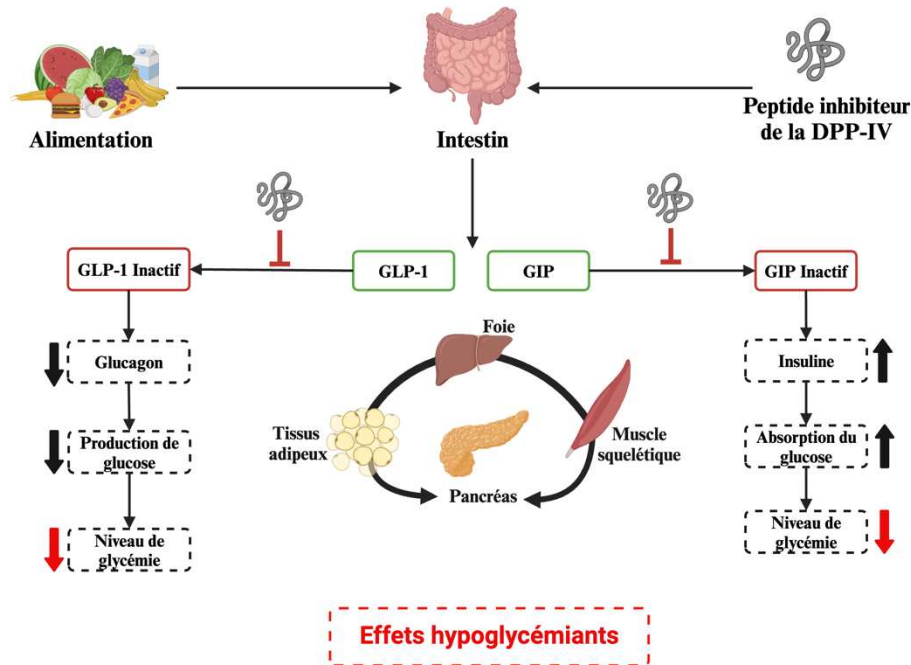


Figure 1.14. Représentation schématique des mécanismes hypoglycémisants des peptides inhibiteurs de la DPP-IV (Zhang et al., 2024).

Ces hormones sont essentielles à la régulation postprandiale du glucose, car elles stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques et inhibent la libération de glucagon par les cellules α , réduisant ainsi la production hépatique de glucose (Bechaux et al., 2019; Zhang et al., 2024). Toutefois, leur demi-vie est considérablement réduite en raison de leur clivage rapide par la DPP-IV, limitant leur efficacité métabolique. L'inhibition de la DPP-IV permet de prolonger l'activité des incrétines et d'intensifier leurs effets sur la sécrétion d'insuline, améliorant ainsi le contrôle de la glycémie (Zhang et al., 2024). Cette enzyme possède deux principales poches catalytiques : une poche hydrophobe (S1) et une poche chargée (S2), essentielles à son activité enzymatique (Zheng et al., 2019). Les peptides inhibiteurs interagissent avec ces régions via des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des forces électrostatiques, perturbant ainsi la reconnaissance et l'hydrolyse des substrats naturels de la DPP-IV. L'intérêt grandissant pour ces peptides réside dans leur origine naturelle, notamment lorsqu'ils proviennent de protéines alimentaires (Zhang et al., 2024). En raison des contraintes inhérentes aux traitements conventionnels du diabète de type 2, telles que la nécessité d'injections fréquentes d'insuline et l'apparition d'effets secondaires, ces molécules suscitent un intérêt croissant en tant qu'alternative thérapeutique (Bechaux et al., 2019). Par ailleurs, leur incorporation dans l'alimentation sous forme de

suppléments est envisagée comme une approche préventive susceptible de réduire le risque de survenue de cette pathologie (Bechaux et al., 2019). Toutefois, l'efficacité de ces peptides repose en grande partie sur leur structure, qui conditionne leur interaction avec la DPP-IV. En effet, les peptides présentant une activité inhibitrice optimale vis-à-vis de la DPP-IV sont généralement constitués de 2 à 8 acides aminés, avec une masse moléculaire comprise entre 200 Da et 1 kDa (Mu et al., 2023). La présence de résidus hydrophobes tels que la leucine, l'isoleucine ou la valine en position N-terminale joue un rôle déterminant dans l'affinité pour l'enzyme. Par ailleurs, la présence d'une proline en seconde position N-terminale renforce significativement cette inhibition en stabilisant l'interaction compétitive avec le site actif de la DPP-IV (Nongonierma et al., 2016). De plus, des résidus hydrophobes additionnels, notamment l'alanine, la leucine et la proline, ainsi qu'une charge nette comprise entre -2,9 et 1,1 à pH 7, contribuent à la stabilisation des interactions enzymatiques, favorisant ainsi l'efficacité de l'inhibition (Zhang et al., 2016; Mu et al., 2023).

1.4.2.3. Défis et enjeux réglementaires des peptides bioactifs

Bien que les peptides bioactifs suscitent un intérêt croissant en raison de leurs propriétés physiologiques bénéfiques, leur production et leur mise sur le marché rencontrent plusieurs obstacles majeurs. Parmi ceux-ci, l'absence d'un cadre réglementaire harmonisé constitue un frein important à leur développement. Les critères d'approbation et les exigences en matière d'allégations de santé varient considérablement d'un pays à l'autre, créant des disparités qui compliquent leur reconnaissance en tant qu'ingrédients fonctionnels. Tandis que certaines réglementations facilitent leur intégration dans des formulations alimentaires ou nutraceutiques, d'autres imposent des standards plus stricts, exigeant des preuves scientifiques approfondies et des études cliniques robustes. Cette hétérogénéité réglementaire ralentit leur adoption à l'échelle internationale, limitant leur accessibilité aux consommateurs et restreignant leur potentiel d'innovation dans le domaine de la santé et de la nutrition (Duffuler et al., 2022). Malgré ces contraintes, plusieurs peptides bioactifs provenant de protéines animales (lactosérum) et végétales (soja) ont déjà été commercialisés et intégrés dans des formulations nutraceutiques (Tableau 1.5).

Tableau 1.5. Formulations nutraceutiques vendus dans le commerce à base de peptides bioactifs provenant de protéines animales et végétales (López-Barrios et al., 2014; Dullius et al., 2018)

Nom du produit	Fabricant	Type de produit	Bioactivité peptidique	Allégation de santé
Gamme de produits BioZate®	Davisco, États-Unis	Isolat de protéines de lactosérum hydrolysé	Fragments de β -lactoglobuline	Réduction de la pression artérielle
Vivinal® ALPHA	Borculo Domo Ingrédients (BDI), Pays-Bas	Ingrédient/hydrolysé	Peptide dérivé du lactosérum	Détente et sommeil
Praventin™	DMV International, Pays-Bas	Complément alimentaire/gélule	Hydrolysé de protéines de lactosérum enrichi en lactoferrine	Réduction de l'acné
DermylexMC	Advitec, Inc., Canada	Complément alimentaire/comprimé	Extrait de protéine de lactosérum XP-828L	Réduit les symptômes du psoriasis
Hilmar™ 8390	Ingrédients Hilmar, États-Unis	Complément alimentaire	Hydrolysé de protéines de lactosérum	Inhibition de l'ACE, inhibition de l'enzyme DPP-IV
NOP-47™	Glanbia Nutritionals, États-Unis	Complément alimentaire et applications pharmaceutiques	Peptide dérivé de lactosérum	Propriétés anti-inflammatoires
Lunasine	Reliv, États-Unis	Complément alimentaire	Peptide de dérivé du soja	Hypocholestérolémiant

Au-delà des contraintes réglementaires, les coûts de production élevés constituent une barrière importante. Les protéines et leur hydrolyse enzymatique requièrent des matières premières de haute qualité et des procédés coûteux, limitant ainsi leur accessibilité industrielle. En parallèle, la diversité des hydrolysats issus de différentes sources protéiques agroalimentaires, aux caractéristiques variées, constitue un défi majeur pour la standardisation des produits finaux. Par ailleurs, les propriétés organoleptiques des peptides, notamment leur goût amer, posent un défi supplémentaire en termes d'acceptabilité par les consommateurs et nécessitent des stratégies adaptées pour améliorer leur palatabilité (Duffuler et al., 2022). Pour répondre à ces enjeux, plusieurs solutions émergent afin d'améliorer l'accessibilité et la rentabilité des peptides bioactifs. L'une des stratégies les plus prometteuses consiste à valoriser les co-produits agroalimentaires, au lieu d'utiliser exclusivement des protéines purifiées. Cette approche permet de réduire considérablement

les coûts de production tout en favorisant une économie circulaire et limitant le gaspillage des ressources agricoles. L'immobilisation enzymatique représente également une avancée majeure, offrant la possibilité de réutiliser les enzymes pour plusieurs cycles d'hydrolyse, diminuant ainsi les coûts associés aux catalyseurs et améliorant la stabilité des processus. En complément, les techniques d'hydrolyse conventionnelles peuvent être optimisées ou combinées avec des technologies innovantes, afin d'augmenter le rendement en peptides bioactifs, d'améliorer la spécificité enzymatique et de garantir une meilleure reproductibilité industrielle. Enfin, l'uniformisation des procédés de production constitue un autre levier essentiel pour assurer la qualité et la conformité réglementaire des peptides bioactifs. Définir des protocoles standardisés permettrait d'améliorer la reproductibilité des résultats et d'accélérer leur reconnaissance par les agences de sécurité alimentaire (Duffuler et al., 2022). Outre ces enjeux de production et de réglementation, la biodisponibilité des peptides bioactifs représente un autre défi majeur. Une fois ingérés, ces peptides sont soumis à l'action des enzymes gastro-intestinales, notamment la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine, qui fragmentent les séquences peptidiques et peuvent altérer leur activité biologique. Cette instabilité enzymatique limite considérablement leur efficacité *in vivo*, certains peptides étant rapidement dégradés en fragments inactifs ou en acides aminés libres avant d'atteindre leur site d'action. De plus, le transport transépithélial constitue un autre facteur limitant leur biodisponibilité : les peptides doivent traverser la barrière intestinale intacte pour exercer leurs effets biologiques. Ainsi, la mise au point de peptides plus résistants à la digestion et mieux absorbés est essentielle pour garantir leur efficacité en tant qu'agents thérapeutiques ou nutraceutiques (Pei et al., 2022).

1.5. Amélioration de l'hydrolyse enzymatique pour la production de peptides bioactifs

L'hydrolyse enzymatique des protéines est un processus au cours duquel une molécule d'eau est ajoutée à une liaison peptidique, entraînant sa rupture et libérant ainsi deux fragments : un groupe carboxyle en C-terminal et un groupe amine en N-terminal (Cheison & Kulozik, 2017). Ce mécanisme, catalysé par des enzymes spécifiques, est largement utilisé pour produire des peptides bioactifs à partir de protéines agroalimentaires. Toutefois, son

efficacité dépend de plusieurs paramètres, notamment la nature du substrat protéique, les caractéristiques de l'enzyme utilisée et les conditions d'hydrolyse appliquées (Valencia et al., 2015; Nasri, 2017). L'interaction entre l'enzyme et son substrat constitue une étape déterminante du processus (Figure 1.15).

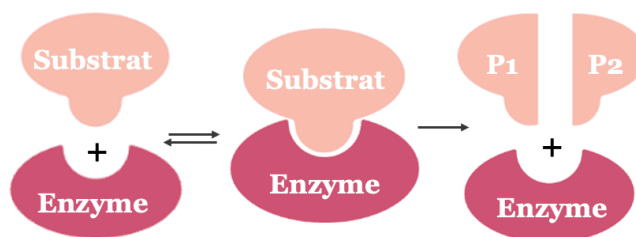


Figure 1.15. Processus d'hydrolyse enzymatique : Interaction enzyme-substrat et libération des produits

L'enzyme se fixe sur des sites spécifiques de la protéine grâce à son site actif qui possède des résidus capables d'établir des liaisons temporaires avec la chaîne peptidique du substrat protéique (Cruz-Casas et al., 2021). Ces interactions, impliquant principalement des liaisons hydrogène, des forces hydrophobes et des interactions de Van der Waals, permettent la formation d'un complexe enzyme-substrat dans une conformation catalytiquement favorable. Une fois ce complexe stabilisé, l'enzyme catalyse la rupture des liaisons peptidiques, libérant ainsi des peptides aux propriétés biologiques spécifiques (Cruz-Casas et al., 2021). Deux principales stratégies sont couramment employées pour réaliser l'hydrolyse enzymatique : l'hydrolyse en batch et l'utilisation d'enzymes immobilisées (Cheison & Kulozik, 2017). La méthode batch, bien que simple et répandue, présente plusieurs inconvénients, notamment un coût enzymatique élevé, dû à l'utilisation unique des enzymes, leur perte d'activité progressive par inactivation ou autolyse, et la nécessité d'une concentration enzymatique importante pour maintenir une productivité suffisante. De plus, le coût élevé s'accompagne d'une faible productivité et de la formation de métabolites secondaires indésirables, résultant parfois de l'autolyse enzymatique (Cruz-Casas et al., 2021). En revanche, l'immobilisation enzymatique permet de prolonger l'activité des biocatalyseurs en facilitant leur réutilisation, ce qui améliore la rentabilité du procédé (Nasri, 2017). De son côté, l'hydrolyse assistée par membranes d'ultrafiltration optimise le processus en contrôlant la taille des peptides produits, améliorant ainsi la sélectivité et la purification des hydrolysats (Rizzello et al., 2016). L'environnement réactionnel joue également un rôle essentiel dans l'optimisation de

l'hydrolyse enzymatique. Une dégradation progressive des protéines peut se produire lorsque les peptides libérés deviennent eux-mêmes des substrats enzymatiques (Cheison & Kulozik, 2017). Toutefois, certains peptides intermédiaires peuvent moduler l'activité enzymatique en agissant comme inhibiteurs, influençant ainsi la cinétique de la réaction et le profil des hydrolysats obtenus (Valencia et al., 2015; Nasri, 2017). Une maîtrise fine de ces paramètres est donc essentielle pour orienter la production de peptides d'intérêt tout en maximisant l'efficacité du procédé.

Si ces paramètres influencent considérablement l'efficacité du processus, l'hydrolyse enzymatique des protéines demeure confrontée à deux limitations majeures. D'une part, la structure tridimensionnelle compacte des protéines et l'organisation rigide de leurs éléments secondaires, notamment les hélices α , restreignent l'accessibilité des sites de clivage aux protéases, réduisant ainsi l'efficacité du processus (Dullius et al., 2018). D'autre part, le coût élevé des enzymes et leur impact environnemental constituent des obstacles majeurs pour une transposition industrielle. L'utilisation d'enzymes en grande quantité entraîne une hausse des coûts de production et génère des résidus enzymatiques dans les effluents industriels, soulevant ainsi des préoccupations écologiques et économiques (Dullius et al., 2018).

Face à ces défis, l'intégration de stratégies complémentaires apparaît essentielle pour améliorer à la fois l'efficacité et la rentabilité de l'hydrolyse enzymatique. Parmi les approches prometteuses, certaines technologies permettent de moduler la structure compacte des protéines, favorisant ainsi un relâchement partiel de leur conformation native et augmentant l'exposition des sites de clivage enzymatique (Ulug et al., 2021). Parallèlement, l'immobilisation enzymatique représente une solution efficace pour accroître la stabilité des biocatalyseurs et réduire leur consommation, garantissant ainsi une meilleure recyclabilité et une diminution des coûts de production (Nasri, 2017).

L'association de ces deux stratégies constitue une avancée majeure dans l'optimisation de l'hydrolyse enzymatique, en améliorant l'accessibilité des substrats aux enzymes tout en assurant une gestion plus durable et économiquement viable des ressources enzymatiques. Ces innovations peuvent améliorer l'efficacité de la production des peptides bioactifs, avec un impact réduit sur l'environnement et des perspectives d'application à l'échelle industrielle.

1.5.1. Prétraitements technologiques des protéines

1.5.1.1. Le traitement thermique

Le traitement thermique constitue l'une des méthodes conventionnelles les plus employées dans l'industrie agroalimentaire, en raison de son efficacité à modifier les propriétés physico-chimiques des protéines alimentaires (Mirmoghtadaie et al., 2016). L'application de chaleur induit une modification de leur conformation, entraînant une dénaturation partielle et une altération de leur structure secondaire. Ce phénomène s'accompagne de plusieurs conséquences possibles, telles que l'agrégation des protéines, une augmentation de leur hydrophobie de surface, une modification des interactions moléculaires (hydrophobes, électrostatiques, etc.) ainsi qu'un déplacement de leur point isoélectrique (Lam & Nickerson, 2015; Malik & Saini, 2019). De plus, la chaleur favorise l'augmentation de la biodisponibilité des sites de clivage enzymatiques. À titre d'illustration, il a été démontré que l' α -LA devient plus sensible à l'hydrolyse par la trypsine après un chauffage à 85 °C, en raison de la réorganisation de sa conformation et de la libération de fragments peptidiques plus accessibles aux enzymes (Bertrand-Harb et al., 2002; Lam & Nickerson, 2015b). De même, un chauffage à 76 °C, correspondant à la température de dénaturation des PP, entraîne une désorganisation de la structure secondaire, favorisant ainsi l'exposition des régions hydrophobes et facilitant leur digestion (amylase, trypsine et pancréatine) (Hall & Moraru, 2021). Toutefois, malgré ces bénéfices, le traitement thermique demeure énergivore.

Dans ce contexte, l'intérêt se porte aujourd'hui sur des technologies alternatives non thermiques, visant à optimiser la production de peptides bioactifs en réduisant la consommation énergétique (Nicoleta et al., 2010; Ulug et al., 2021).

1.5.1.2. Les technologies émergentes

Les technologies émergentes, notamment les hautes pressions hydrostatiques, les micro-ondes, les CEP et les ultrasons, suscitent un intérêt croissant en raison de leur capacité à accroître la sensibilité des protéines à l'hydrolyse enzymatique. Ces approches ont démontré leur efficacité dans l'amélioration de l'hydrolyse des protéines de lactosérum et de pois en modifiant leur structure conformationnelle, facilitant ainsi leur accessibilité aux enzymes et

optimisant la production de peptides (Laguna et al., 2017; Ma et al., 2017; Mikhaylin et al., 2017; Jiang et al., 2018; Munir et al., 2019; Agoua et al., 2020a; Carullo et al., 2020; de Oliveira et al., 2020; Meng et al., 2021). Cependant, l'efficacité de chacune de ces technologies repose sur une optimisation rigoureuse des paramètres de traitement, visant à identifier les conditions optimales pour maximiser la réactivité enzymatique tout en minimisant les effets indésirables susceptibles d'altérer le processus d'hydrolyse. Les CEP représentent une technologie non thermique particulièrement prometteuse dans ce contexte. En induisant une modification de la structure des protéines, les CEP facilitent l'interaction enzyme-substrat, favorisant ainsi l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique. De plus, ils préservent l'intégrité des peptides bioactifs en limitant l'élévation intense de température. Cependant, leur application à l'échelle industrielle demeure confrontée à des défis majeurs, notamment les coûts d'investissement élevés et les exigences réglementaires en cours d'adaptation (Gavahian, 2024). Les micro-ondes, bien qu'ils réduisent le temps de traitement face à un traitement thermique conventionnel, peuvent entraîner une hétérogénéité dans la production des peptides (Gavahian, 2024).

En conclusion, ces technologies émergentes offrent des perspectives innovantes pour améliorer l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique et valoriser les peptides bioactifs issus des protéines alimentaires. Le choix de la technologie optimale repose sur plusieurs critères, notamment l'impact sur la structure protéique, l'efficacité énergétique et la faisabilité industrielle (Rocha et al., 2018; Arshad et al., 2020).

Dans cette étude, les CEP seront privilégiés en tant que stratégie de prétraitement des protéines, offrant ainsi une approche innovante et éco-efficace pour optimiser l'hydrolyse enzymatique tout en améliorant la valorisation des co-produits agroalimentaires.

1.5.1.3. Les CEP

Les CEP appartiennent à la famille des traitements électriques à haute tension, une catégorie d'électro-technologies pulsées (Agoua et al., 2022). Contrairement aux procédés conventionnels, les CEP réduisent significativement la consommation énergétique et peuvent limiter, voire éliminer, l'utilisation d'eau, offrant ainsi une alternative plus durable aux traitements classiques (Rocha et al., 2018; Arshad et al., 2020). Leur principe repose sur

l'application d'un champ électrique externe, d'intensité modérée à élevée, sur une durée très brève. Ce champ est généré entre deux électrodes immergées dans une solution ou directement appliqué sur un produit à traiter, induisant des modifications ciblées des structures biologiques sans recourir à des températures excessives (Arshad et al., 2020).

Les CEP reposent sur l'association de deux parties d'équipement essentielles : un générateur d'impulsions de haute tension et une chambre de traitement, dont la conception joue un rôle déterminant dans l'efficacité du procédé. Le générateur d'impulsions assure la conversion du courant continu en impulsions électriques brèves et contrôlées, nécessaires à l'application du champ électrique sur la matrice à traiter. Ces impulsions, de durée et d'intensité adaptées, sont transmises à travers la chambre de traitement, où elles interagissent avec le produit ciblé. La chambre de traitement, quant à elle, permet l'établissement du contact électrique avec le produit grâce à la présence de deux électrodes séparées par un isolant diélectrique, dont l'une est reliée au générateur et l'autre à la terre. Pour garantir un champ électrique homogène et une efficacité optimale, il est crucial que la chambre soit entièrement remplie, limitant ainsi la formation de bulles d'air qui pourraient perturber la répartition du champ électrique et nuire à la reproductibilité du traitement (Alirezalu et al., 2020). Selon l'application visée, ces chambres peuvent être statiques ou dynamiques. Les premières sont adaptées aux traitements en mode discontinu (batch), où un volume défini est traité avant d'être évacué, tandis que les secondes permettent une application en flux continu, répondant ainsi aux exigences des processus industriels de grande échelle. Dans ce cadre, les configurations rectangulaires et cylindriques sont les plus couramment employées, en raison de leur compatibilité avec les infrastructures de production existantes et de leur capacité à assurer une distribution homogène du champ électrique au sein du produit (Grimi et al., 2011; Delsart et al., 2015; Rocha et al., 2018; Arshad et al., 2020).

Toutefois, l'efficacité du traitement ne repose pas uniquement sur la conception de la chambre de traitement, mais également sur plusieurs paramètres physiques et électriques qui modulent son impact sur les matrices biologiques. La force du champ électrique appliqué, la durée et la forme des impulsions, ainsi que la conductivité électrique du produit sont autant de variables qui influencent la perméabilisation des membranes cellulaires et l'altération des structures macromoléculaires (Rocha et al., 2018; Arshad et al., 2020). La force du champ électrique externe constitue le facteur prédominant dans la dénaturation des protéines,

comme cela a été démontré dans plusieurs travaux. Une force de champ plus élevée favorise une rupture plus efficace des liaisons disulfures, ce qui accentue le dépliement protéique et améliore par conséquent l'hydrolyse enzymatique (Zhang et al., 2017; Dong et al., 2020). Exprimée en kV/cm, elle peut être modulée en fonction du substrat à traiter, de la durée du traitement et du nombre d'impulsions appliquées. Une force plus élevée peut ainsi permettre de réduire le temps de traitement ou le nombre d'impulsions nécessaires, optimisant ainsi l'efficacité énergétique du procédé. En parallèle, la durée du traitement et la forme des impulsions jouent un rôle déterminant dans la réponse des biomolécules aux CEP (Grimi et al., 2011). Le temps effectif d'application électrique est défini par la multiplication de la durée de chaque impulsion (exprimée en μs) par le nombre total d'impulsions délivrées au produit (Grimi et al., 2011). Plusieurs études ont mis en évidence que l'augmentation du nombre d'impulsions pouvait favoriser la rupture des liaisons disulfures, entraînant la libération de groupement thiols, un phénomène corrélé à un dépliement partiel des protéines, facilitant ainsi leur hydrolyse enzymatique ultérieure (Li et al., 2007; Zhang et al., 2017). L'ensemble de ces paramètres doit donc être rigoureusement maîtrisé afin d'optimiser l'application des CEP tout en garantissant une reproductibilité industrielle optimale (Rocha et al., 2018). Au-delà du contrôle de ces variables, il est essentiel de comprendre les interactions des CEP avec les protéines alimentaires afin d'exploiter pleinement leur potentiel. Leur mécanisme d'action repose sur des effets électro-physiques qui modifient certaines propriétés des protéines, influençant ainsi leur sensibilité aux transformations enzymatiques.

Les CEP exercent leur action sur les protéines alimentaires à travers deux mécanismes théoriques majeurs : les réactions électrochimiques aux interfaces électrodes-solution et la polarisation moléculaire induite par le champ électrique. Lorsque les CEP sont appliqués, l'électrolyse de l'eau à la surface des électrodes entraîne la formation de gaz tels que l'hydrogène et l'oxygène, ainsi que la production d'ions H^+ et OH^- . Plus précisément, l'oxygène subit une photolyse conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde (O_2^-), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui peuvent interagir avec les protéines en modifiant leurs groupements fonctionnels, notamment les résidus thiols et les acides aminés aromatiques. En parallèle, la migration des biomolécules chargées sous l'influence du champ électrique favorise des réarrangements

structuraux via des forces électrostatiques. Bien que l'application d'impulsions de courte durée ait pour objectif de minimiser ces réactions, elles restent susceptibles d'influencer la structure et la stabilité des protéines selon les conditions expérimentales employées (Giteru et al., 2018). En plus de ces phénomènes électrochimiques, les CEP induisent une polarisation des protéines qui modifie la distribution de leur charge électrique et entraîne des altérations conformationnelles. Cette perturbation électronique modifie les moments dipolaires des liaisons peptidiques, favorisant ainsi l'augmentation de l'entropie de l'état déplié des protéines. Il en résulte une exposition des régions hydrophobes initialement enfouies (groupements thiols et hydrophobes) et une désorganisation partielle des structures secondaires, en particulier des hélices α (Li et al., 2007; Mazurkiewicz et al., 2015; Giteru et al., 2018). Ce dépliement structural est notamment observé dans diverses matrices telles que les isolats de protéines de soja, l' α -LA, les protéines de canola ou encore les protéines myofibrillaires de poulet (Li et al., 2007; Robles-López et al., 2012; Zhang et al., 2017; Dong et al., 2020). D'autres travaux ont également rapporté une augmentation significative de la sensibilité des protéines à l'hydrolyse sous l'effet des CEP (Tableau 1.6).

Tableau 1.6. Liste non exhaustive des effets des CEP sur l'hydrolyse des protéines agroalimentaires.

Impact technologique	Produit	Effets	Conditions	Références
Amélioration de la sensibilité à l'hydrolyse	β -lactoglobuline	Amélioration des performances d'hydrolyse et libération de peptides avant ajout de protéases	- α -chymotrypsine et trypsine, - 30 à 300 impulsions, 10 μ s et 20 kV/cm	(Agoua et al., 2020a)
	Protéines du muscle de bœuf	Amélioration de l'hydrolyse de 18 à 31 %	- 20 μ s, 500 à 2000 Hz, - 1 à 1,25 kV/cm	(Chian et al., 2019)
	Blanc d'œuf (ovotransferrine, ovalbumine et lysozyme)	Amélioration de la digestion des protéines et minimisation de leur agrégation	- pepsine ou pancréatine, - 1,4 à 1,8 kV/cm - 20 μ s et 300 Hz	(Liu et al., 2018)
	Microalgues (protéine de <i>Scenedesmus almeriensis</i>)	Augmentation du DH de 10 % (40,8 à 50 %)	- 40 kV/cm, 1 μ s et 75 kJ·kgsus ⁻¹ - Enzyme : alcalase	(Akaberi et al., 2019)
	Fève	Amélioration de la digestibilité des protéines de 29,51 à 60,28 %	- 7,5 kV/cm, 500 Hz, 6 μ s - Pepsine et trypsine	(Ren et al., 2025)

En plus de leur action sur l'hydrolyse enzymatique, les CEP s'inscrivent dans une démarche de réduction des coûts dans l'industrie agroalimentaire. Bien qu'ils présentent un fort potentiel en tant que technologie durable, leur impact environnemental et économique reste encore principalement exploratoire et ne peut être directement comparé aux traitements thermiques conventionnels à ce stade. Certaines études ont néanmoins mis en évidence une réduction de 20 % de la consommation d'électricité et l'élimination de l'utilisation du gaz naturel lors de l'application des CEP pour la pasteurisation d'aliments liquides, entraînant ainsi une diminution significative des émissions de CO₂ (Toepfl et al., 2006; Pereira & Vicente, 2010). Toutefois, ces résultats doivent être interprétés avec précaution, car l'évaluation de la durabilité des CEP en tant que prétraitement des protéines repose sur des méthodologies et des contextes expérimentaux spécifiques, rendant difficile une comparaison stricte avec les procédés thermiques classiques. Par ailleurs, une étude récente a démontré que l'utilisation des CEP pouvait accroître de 17 % la production de peptides issus d'hydrolysats de β -lactoglobuline, en comparaison avec des échantillons non traités ou préchauffés (Agoua et al., 2022). De plus, les scores d'éco-efficience des peptides bioactifs générés après prétraitement par CEP étaient en moyenne 35 fois plus élevés que ceux obtenus après préchauffage. L'amélioration de la libération de peptides bioactifs et l'augmentation des scores d'éco-efficience observées dans cette étude constituent des indicateurs encourageants. Toutefois, ils ne peuvent être directement extrapolés à l'ensemble des applications industrielles des CEP. En effet, la variabilité des conditions de traitement (force de champ, durée des impulsions, etc.) et la diversité des matrices protéiques traitées nécessitent une analyse plus approfondie pour évaluer avec précision les bénéfices énergétiques et environnementaux réels de cette technologie. Ainsi, bien que les CEP s'inscrivent dans une perspective prometteuse d'éco-efficience, des études complémentaires sont requises afin de standardiser les méthodologies d'évaluation et de mieux quantifier leur impact global sur l'industrie agroalimentaire (Giteru et al., 2018). Enfin, l'un des atouts majeurs des CEP réside dans leur capacité à être intégrés aux chaînes de production existantes grâce à la possibilité de traiter les aliments en continu, ce qui améliore la productivité tout en limitant les interruptions de production. Cependant, malgré leur potentiel économique, leur adoption à grande échelle reste freinée par certains obstacles, notamment le coût initial des équipements et le manque de normalisation des protocoles d'application selon les matrices

alimentaires traitées. Néanmoins, avec l'évolution des technologies et la demande croissante pour des procédés plus durables et efficaces, les CEP apparaissent comme une solution prometteuse pour concilier performance économique et responsabilité environnementale dans le secteur agroalimentaire (Arshad et al., 2021).

1.5.2. L'immobilisation enzymatique

1.5.2.1. Les protéases

Parmi les biocatalyseurs, les protéases occupent une place centrale en raison de leur capacité à hydrolyser sélectivement les liaisons peptidiques, ouvrant ainsi la voie à la production de peptides bioactifs d'intérêt (Cheison & Kulozik, 2017). Cependant, toutes les protéases ne possèdent pas la même spécificité de clivage ni la même stabilité, ce qui influence directement la nature et la fonctionnalité des peptides générés. Dans ce contexte, l' α -chymotrypsine apparaît comme une enzyme de choix en raison de sa spécificité de clivage ciblant préférentiellement les liaisons peptidiques situées en C-terminal des acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine), ainsi que de certains résidus hydrophobes (leucine, méthionine et histidine) (Carullo et al., 2020; Famutimi et al., 2024). En outre, la chymotrypsine (EC 3.4.21.1), tout comme la trypsine bovine, appartient à la famille des protéases à sérine. Elle est synthétisée sous une forme inactive, le chymotrypsinogène, qui subit une activation protéolytique en cascade pour donner naissance à l'enzyme active. Cette protéase présente un pH optimal de 7,8 et un point isoélectrique (pI) de 8,75. Son poids moléculaire est estimé à 25,2 kDa, et elle est constituée de 241 résidus aminoacylés, organisés en trois chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures intra- et interchaînes, assurant ainsi sa stabilité structurale. Le site actif de l' α -chymotrypsine est composé d'une triade catalytique hautement conservée, constituée des résidus His⁵⁷, Asp¹⁰² et Ser¹⁹⁵. Cette triade est essentielle à son activité enzymatique (Hedstrom, 2002). L' α -chymotrypsine exerce son action catalytique en hydrolysant les liaisons peptidiques, un processus qui implique le franchissement de trois étapes clés communes à l'ensemble des protéases (Figure 1.16) : (i) activation de la liaison amide : l'oxygène carbonyle interagit avec un résidu acide, induisant une distorsion de la liaison peptidique, naturellement très stable, (ii) activation de la molécule d'eau : l'eau, étant un médiocre nucléophile, est activée par une base afin d'améliorer son pouvoir réactif et (iii) protonation du groupe amine avant son expulsion : les amines constituant des groupes partants faibles, leur protonation facilite leur libération au cours de l'hydrolyse (Hedstrom, 2002).

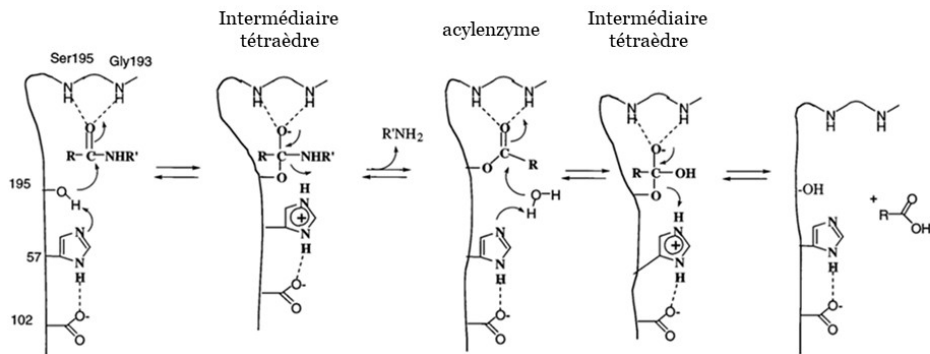


Figure 1.16. Dynamique catalytique des protéases à sérines : étapes du mécanisme réactionnel (Hedstrom, 2002)

Grâce à sa spécificité pour les résidus aromatiques, la chymotrypsine est fréquemment associée à la production de peptides bioactifs aux propriétés fonctionnelles variées (Toldrá et al., 2020). Elle a notamment été utilisée pour l'hydrolyse de protéines sériques du lait, générant des hydrolysats riches en peptides bioactifs (Olvera-Rosales et al., 2023 ; Saubenova et al., 2024). Par ailleurs, des études récentes ont mis en évidence que le recours à un prétraitement par CEP avant l'hydrolyse enzymatique par α -chymotrypsine permettait d'accroître significativement l'efficacité de l'hydrolyse de la β -lactoglobuline, en favorisant une meilleure accessibilité des sites de clivage enzymatique (Mikhaylin et al., 2017 ; Agoua et al., 2020a). Cependant, son utilisation sous forme libre est limitée par une stabilité réduite, une difficulté de récupération et une impossibilité de réutilisation efficace dans les procédés industriels. Pour pallier ces contraintes, son immobilisation sur un support solide constitue une alternative prometteuse, permettant non seulement de prolonger son activité catalytique, mais aussi de faciliter son intégration dans des procédés en continu (Wahab et al., 2020). À notre connaissance, l' α -chymotrypsine n'a toutefois pas encore été utilisée pour l'hydrolyse de α -LA en combinaison avec les CEP dans ce contexte spécifique. L'exploration de cette approche dans le présent travail constitue donc une preuve de concept pour l'amélioration ciblée de l'hydrolyse enzymatique par prétraitement physique.

1.5.2.2. Principes généraux de l'immobilisation enzymatique

L'amélioration des procédés biotechnologiques s'inscrit dans une dynamique d'économie circulaire visant à conjuguer efficacité industrielle et réduction de l'empreinte environnementale. Dans cette perspective, l'immobilisation enzymatique constitue une approche clé, offrant une meilleure stabilité des biocatalyseurs, tout en facilitant leur récupération et leur réutilisation, contribuant ainsi à une diminution des coûts de production et des pertes enzymatiques (Sheldon et al., 2021). Contrairement aux enzymes libres, souvent limitées à un usage unique, celles fixées sur un support peuvent être exploitées sur plusieurs cycles réactionnels, favorisant leur intégration dans des procédés en continu et réduisant la consommation énergétique associée aux transformations industrielles (Sheldon et al., 2021). L'immobilisation enzymatique ne se limite pas à un simple procédé de fixation, mais représente un outil d'ingénierie biocatalytique permettant d'ajuster la stabilité, la spécificité et la résistance des enzymes aux conditions réactionnelles souvent éloignées de leur environnement physiologique (Boudrant et al., 2020). L'efficacité de cette approche repose sur plusieurs paramètres, notamment le choix du support, la méthode d'immobilisation et les conditions de fixation de l'enzyme, qui influencent directement le rendement catalytique final (Boudrant et al., 2020; Wahab et al., 2020). Cependant, le succès de l'immobilisation ne saurait se résumer au seul taux d'enzyme fixé sur le support, mais doit également intégrer des critères tels que la récupération de l'activité enzymatique et la stabilité du biocatalyseur. Ainsi, en prenant en compte ces différents facteurs, l'immobilisation de la chymotrypsine sur un support approprié pourrait constituer une stratégie pertinente pour améliorer sa stabilité et son efficacité catalytique, contribuant ainsi à une hydrolyse enzymatique plus performante et à une augmentation du rendement en peptides bioactifs, dans une perspective économiquement viable. Ainsi, afin d'optimiser les performances des enzymes immobilisées, il est essentiel de sélectionner une méthode d'immobilisation adaptée aux exigences du bioprocédé visé.

1.5.2.3. Les méthodes d'immobilisation et leurs supports

Les stratégies d'immobilisation des enzymes se subdivisent en deux grandes catégories en fonction de la nature des interactions établies avec le support : les méthodes physiques et les méthodes chimiques. Les premières, telles que l'adsorption et le piégeage, reposent exclusivement sur des interactions non covalentes. En revanche, les méthodes chimiques, incluant la fixation covalente et la réticulation, impliquent la formation de liaisons covalentes (Figure 1.17) (Liu et al., 2018).

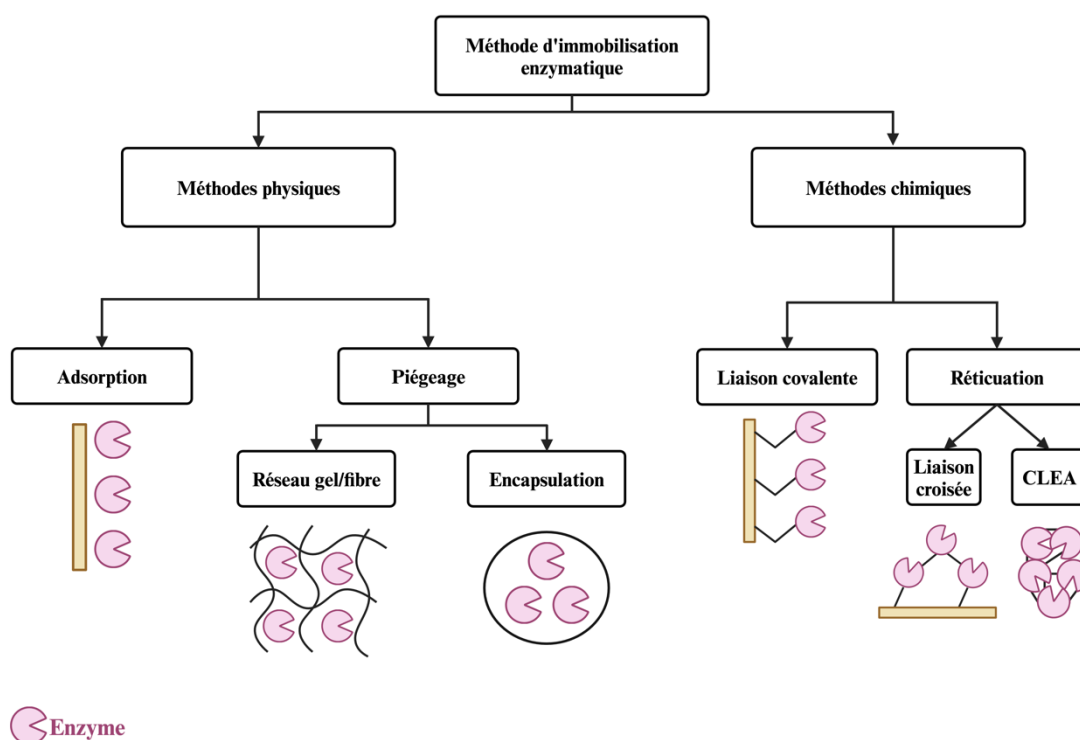


Figure 1.17. Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation. CLEA : Cross-Linked Enzyme Aggregates, soit agrégats d'enzymes réticulés (Liu et al., 2018)

1.5.2.3.1. Adsorption

L'adsorption constitue une stratégie d'immobilisation enzymatique simple, économique et peu intrusive, permettant de préserver l'activité catalytique des enzymes. Cette méthode

repose sur des interactions non covalentes, incluant les liaisons hydrogène, les forces de Van der Waals, ainsi que les interactions hydrophobes et électrostatiques, établies entre l'enzyme et la surface du support. Son principal avantage réside dans l'absence de modifications chimiques ou d'agents de couplage, facilitant ainsi la mise en œuvre et la régénération des supports (Hartmann & Jung, 2010; Liu et al., 2018). Cependant, la stabilité des enzymes immobilisées par adsorption demeure limitée en raison du caractère réversible des interactions enzyme-support. De faibles variations des paramètres environnementaux, tels que le pH, la température ou la force ionique, peuvent induire un relargage enzymatique, réduisant l'efficacité du procédé et pouvant contaminer le milieu réactionnel (Hartmann & Kostrov, 2013; Liu et al., 2018).

1.5.2.3.2. Piégeage

Le piégeage enzymatique est une technique d'immobilisation où les enzymes sont confinées dans des matrices polymériques réticulées, permettant la diffusion des substrats et des produits. Cette approche, simple et économique, repose sur deux stratégies principales : l'encapsulation et le piégeage en réseaux. L'encapsulation consiste à enfermer l'enzyme dans une membrane semi-perméable, tandis que la réticulation l'immobilise au sein d'un réseau polymérique tridimensionnel (Liu et al., 2018). L'un des principaux avantages de cette technique réside dans la préservation de la conformation native des enzymes, en raison de l'absence de liaisons covalentes avec le support. Cela permet de maintenir une activité catalytique élevée tout en réduisant la lixiviation enzymatique, améliorant ainsi la stabilité du système. Cependant, un inconvénient majeur du piégeage enzymatique réside dans la présence de barrières de diffusion inhérentes aux réseaux polymériques. Ces obstacles peuvent limiter l'accès des substrats macromoléculaires à l'enzyme, réduisant ainsi l'efficacité globale du processus catalytique (Liu et al., 2018).

1.5.2.3.3. Liaison covalente

La fixation covalente est une méthode d'immobilisation enzymatique largement étudiée en raison de sa stabilité et de sa capacité à prévenir le relargage des enzymes (Yushkova et al.,

2019). Elle repose sur l'établissement de liaisons covalentes entre les groupes fonctionnels du support et les résidus d'acides aminés de l'enzyme, notamment la lysine, la cystéine, l'acide aspartique et l'acide glutamique (Liu et al., 2018). Ces interactions sont facilitées par des agents de fonctionnalisation et d'activation tels que le glutaraldéhyde, le carbonyldiimidazole ou le N-hydroxysuccinimide (Hettiarachchy et al., 2018; Sigurdardóttir et al., 2018). Cette technique présente plusieurs avantages, notamment un contrôle de l'orientation de l'enzyme, facilitant les interactions avec des résidus spécifiques, le maintien de la conformation active de l'enzyme, une augmentation de la stabilité, avec une meilleure résistance aux variations de pH et de température, une réduction du relargage enzymatique et une prolongation de la réutilisation du biocatalyseur (Wu et al., 2015). Toutefois, la fixation covalente peut entraîner des altérations conformationnelles de l'enzyme, compromettant son activité catalytique. Ces modifications résultent principalement de la rigidification de sa structure ou de l'obstruction partielle de son site actif due aux interactions chimiques avec le support. De plus, les réactions induites par l'immobilisation peuvent affecter directement les résidus impliqués dans la catalyse, entraînant une diminution significative de l'efficacité enzymatique (Liu et al., 2018). L'intégration d'un bras extenseur constitue une solution efficace pour atténuer ces effets en maintenant une certaine flexibilité moléculaire, limitant ainsi les contraintes stériques et préservant l'efficacité catalytique de l'enzyme immobilisée (Wahab et al., 2020).

1.5.2.3.4. Réticulation

La réticulation enzymatique repose sur la formation de liaisons covalentes entre les enzymes elles-mêmes ou entre les enzymes et des agents réticulants bifonctionnels, tels que le glutaraldéhyde. Ce procédé repose sur des réactions intermoléculaires qui permettent de stabiliser les enzymes au sein de matrices de support, renforçant ainsi leur stabilité et leur réutilisabilité en milieu réactionnel. Toutefois, cette immobilisation rigide peut altérer l'activité catalytique en modifiant la conformation enzymatique ou en restreignant l'accessibilité du site actif. Par ailleurs, la réticulation peut être exploitée pour la synthèse des agrégats d'enzymes réticulés (CLEA), une approche permettant d'obtenir des

biocatalyseurs hautement stables et insolubles sans nécessiter de support externe (Liu et al., 2018).

Le choix de la méthode d'immobilisation est un facteur déterminant influençant l'efficacité et la performance du biocatalyseur. Dans cette étude, où l'enzyme est destinée à l'hydrolyse d'une protéine, la fixation covalente se révèle être la stratégie la plus adaptée. En effet, elle assure une immobilisation robuste tout en préservant l'accessibilité du site actif, ce qui est essentiel pour des substrats de grande taille comme les protéines (Liu et al., 2018). À l'inverse, des méthodes telles que l'encapsulation ou le piégeage dans des matrices polymériques pourraient limiter l'efficacité catalytique en raison de l'encombrement stérique et des contraintes de diffusion des macromolécules. Par ailleurs, le choix du support d'immobilisation joue un rôle clé, influençant non seulement la stabilité de l'enzyme, mais aussi sa disponibilité pour l'interaction avec le substrat et son efficacité catalytique globale.

1.5.2.3.5. Les supports d'immobilisation

Généralement, trois grandes catégories sont distinguées : les supports organiques, les supports inorganiques et les supports hybrides.

Les supports organiques comprennent des polymères synthétiques et des biopolymères issus de sources naturelles renouvelables, qui sont particulièrement appréciés pour leur biodégradabilité et leur compatibilité avec les systèmes biologiques (Bayón et al., 2018; Yushkova et al., 2019; Wahab et al., 2020).

Les supports inorganiques, tels que les céramiques poreuses et les nanoparticules, sont largement employés en raison de leur forte porosité, de leur grande résistance thermique et mécanique et de leur stabilité microbienne. Parmi ces matériaux, on retrouve l'oxyde d'aluminium (Al_2O_3), le dioxyde de zirconium (ZrO_2), la silice (SiO_2), le dioxyde de titane (TiO_2), l'oxyde de graphène (GO) et divers supports magnétiques. Ces supports possèdent une large surface spécifique, une structure poreuse facilitant la diffusion des substrats, une densité élevée de pores de taille uniforme et une grande compatibilité avec divers solvants organiques, ce qui les rend particulièrement adaptés à l'immobilisation enzymatique (Topoglidis et al., 2003; Zhou & Hartmann, 2013; Yushkova et al., 2019; Wahab et al., 2020).

Les supports hybrides, combinant des composants organiques et inorganiques, sont quant à eux utilisés pour réduire l'impact environnemental et la toxicité associée à certains supports, tels que les nanoparticules magnétiques (Sureshkumar & Lee, 2011; Hosseinipour et al., 2015; Wang & Jiang, 2019).

Le choix du support et de la méthode d'immobilisation est un paramètre fondamental pour garantir une stabilité et une efficacité catalytique optimales. Il repose sur une approche rationnelle intégrant les propriétés physico-chimiques du matériau ainsi que les exigences spécifiques de l'enzyme et de la réaction ciblée. Dans cette perspective, l'oxyde d'aluminium, ou alumine, se distingue comme un support particulièrement adapté à l'immobilisation enzymatique, en raison de sa porosité, de sa stabilité thermique et chimique, ainsi que de sa capacité à établir des interactions favorisant un ancrage robuste du biocatalyseur. Ces caractéristiques, détaillées ci-après, en font une alternative prometteuse aux supports classiques pour l'optimisation des performances enzymatiques dans des conditions industrielles.

1.5.2.3.6. L'oxyde d'aluminium (ou alumine)

L'alumine est un oxyde d'aluminium existant sous plusieurs phases cristallines, notamment α , δ , γ et θ (Bragg et al., 1931). Parmi ces formes, la γ -alumine ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) est particulièrement prisée comme support catalytique en raison de sa structure poreuse qui favorise une fixation multipoint des enzymes, améliorant ainsi leur stabilité et leur résistance par rapport à une surface plane (Heilmann et al., 2003). Cette propriété est essentielle pour éviter le relargage enzymatique et assurer un ancrage robuste du biocatalyseur. La γ -alumine est obtenue par déshydratation thermique de la boehmite à des températures comprises entre 400 et 450 °C, conduisant à la formation de phases métastables qui influencent directement ses caractéristiques structurales et sa capacité à interagir avec les biomolécules. Ce matériau possède une surface spécifique inférieure à 250 m²/g et un volume poreux avoisinant 0,5 cm³/g, des propriétés qui jouent un rôle clé dans l'immobilisation des enzymes (Heilmann et al., 2003).

L'efficacité de l'immobilisation enzymatique sur l'alumine dépend d'un ensemble de paramètres, incluant la morphologie et la taille des pores du support, la structure et la conformation de l'enzyme, ainsi que des facteurs environnementaux tels que le pH du milieu réactionnel, la présence de solvants organiques, et la charge de surface du support. Une distribution homogène de pores mésoporeux facilite une meilleure diffusion des substrats et des produits, évitant ainsi les phénomènes de diffusion restreinte qui pourraient entraver l'activité enzymatique. Cet aspect est particulièrement important pour des enzymes de grande taille comme la chymotrypsine, qui nécessite un accès optimal à son site actif. Par ailleurs, la stabilité chimique et thermique de l'alumine constitue un atout majeur par rapport aux supports polymériques, souvent sensibles aux variations de température et de pH. Cette robustesse la rend particulièrement adaptée aux bioprocédés industriels, où les enzymes doivent conserver leur activité malgré des conditions réactionnelles potentiellement contraignantes. L'utilisation d'un support aussi stable permet également une réutilisation prolongée des enzymes immobilisées, réduisant ainsi les coûts opérationnels et renforçant la viabilité économique du procédé (Pourmadadi et al., 2022). En comparaison avec d'autres supports inorganiques tels que la silice mésoporeuse ou l'oxyde de titane (TiO₂), l'alumine présente l'avantage d'être moins coûteuse, plus accessible et facilement modifiable, tout en conservant des performances comparables. De plus, sa biodégradabilité mieux contrôlée et son impact environnemental potentiellement réduit sont des arguments supplémentaires en faveur de son utilisation pour des applications biotechnologiques durables (Pourmadadi et al., 2022).

Bien que l'alumine soit moins fréquemment utilisée comme support d'immobilisation enzymatique que d'autres matériaux (Zucca & Sanjust, 2014), elle a principalement été explorée pour des applications d'adsorption, notamment avec l' α -CT, où des taux d'immobilisation élevés de 95 à 96 % ont été rapportés (Pugnière et al., 1988; Coletti-Previero & Previero, 1989). Toutefois, cette approche repose sur des interactions non covalentes, rendant l'enzyme sujette au relargage sous l'effet de variations du pH, de la force ionique ou des cycles d'utilisation successifs. Pour pallier cette limitation, la liaison covalente, notamment avec le glutaraldéhyde (GA), a été explorée, permettant d'atteindre un taux d'immobilisation de 94 % sur certains supports (Ghafourifar et al., 2013).

Cependant, la rigidité induite par la réticulation peut altérer l'activité catalytique en réduisant la flexibilité conformationnelle de l'enzyme. C'est dans ce contexte que l'utilisation de dopamine (DOP) a suscité un intérêt croissant. Ce composé, inspirés des adhésifs biologiques des moules marines, permet de créer une couche organique biocompatible favorisant l'ancrage des enzymes via des interactions réversibles ou covalentes (Bayramoglu et al., 2020). Des études antérieures ont montré que la fonctionnalisation de supports hybrides par la DOP améliore la rétention d'activité enzymatique et la durabilité des biocatalyseurs. Par exemple, l'immobilisation sur des nanofibres fonctionnalisées avec du GA n'a permis de conserver que 55,6 % de l'activité native, tandis que l'utilisation de silice magnétique greffée au DOP a permis de préserver jusqu'à 86,6 % de l'activité enzymatique (Bayramoglu et al., 2020; Wong et al., 2017).

Enfin, les études portant spécifiquement sur la fonctionnalisation de l'alumine pour l'immobilisation de la chymotrypsine restent rares. Cette lacune scientifique souligne l'intérêt d'explorer cette approche dans ce travail, afin d'évaluer son potentiel en termes de stabilisation enzymatique et d'optimisation des performances catalytiques.

2. Chapitre 2 – Contexte du projet

2.1. Problématique

Dans un contexte où la valorisation des co-produits agroalimentaires et la réduction de l’empreinte environnementale sont prioritaires, l’optimisation de l’hydrolyse enzymatique est un levier stratégique pour accroître la production de peptides bioactifs. Toutefois, plusieurs limitations compromettent son efficacité, sa rentabilité et son application industrielle. Parmi ces contraintes, la structure intrinsèque des protéines représente un obstacle majeur à leur hydrolyse enzymatique. Certaines, à l’instar de l’ α -LA, adoptent une conformation globulaire particulièrement stable, renforcée par des ponts disulfures, limitant l’accessibilité des sites de clivages aux enzymes protéolytiques. D’autres, comme les PP, sont des mélanges complexes où les interactions intramoléculaires et intermoléculaires restreignent la disponibilité des liaisons peptidiques, rendant leur hydrolyse enzymatique peu efficace. Face à ces limitations, différents traitements préalables ont été développés afin de modifier la structure des protéines et d’améliorer leur accessibilité aux enzymes. Les traitements thermiques, fréquemment utilisés dans cette optique, induisent un dépliement partiel des protéines, facilitant leur hydrolyse. Cependant, ces procédés sont fortement consommateurs d’énergie. Plus récemment, les CEP se sont imposés comme une alternative non thermique prometteuse, permettant d’induire un réarrangement structurel des protéines. Toutefois, malgré leur potentiel, leur usage a été historiquement principalement orienté vers d’autres applications industrielles comme l’inactivation d’enzyme, la stérilisation de produits liquides ou encore l’extraction de composés. Ainsi, bien que les CEP puissent induire des modifications structurales favorisant l’hydrolyse enzymatique, leur application dans ce domaine reste insuffisamment étudiée et nécessite une adaptation rigoureuse des conditions opératoires. En parallèle des contraintes structurelles des substrats, l’instabilité des enzymes sous forme libre représente un obstacle supplémentaire limitant l’efficacité et la durabilité du procédé. Les biocatalyseurs solubles sont particulièrement sensibles aux variations de pH et de température, ce qui réduit leur durée de vie et altère leur activité catalytique. Par ailleurs, leur utilisation unique augmente les coûts liés à leur renouvellement et restreint leur viabilité économique. Malgré les avancées en hydrolyse enzymatique, les stratégies actuelles restent

limitées, ciblant soit la modification des enzymes, soit celle du substrat, sans approche conjointe intégrant les contraintes structurelles des protéines et la stabilisation des biocatalyseurs. À ce jour, aucune étude n'a exploré une stratégie combinée visant à améliorer l'accessibilité des sites de clivage tout en renforçant la stabilité enzymatique pour accroître l'efficacité catalytique et la production de peptides bioactifs. Ce projet de doctorat s'inscrit dans cette perspective, en évaluant l'impact d'une telle approche sur l'optimisation du processus d'hydrolyse et la valorisation industrielle des ressources agroalimentaires.

2.2.Hypothèse de recherche

Le prétraitement de l' α -LA et des PP par les CEP favorise leur dépliement partiel, améliorant ainsi l'accessibilité des sites de clivage spécifiques à l' α -CT immobilisée sur de l'alumine, afin d'accroître l'efficacité de l'hydrolyse et de favoriser la libération de peptides bioactifs.

2.3.Objectifs spécifiques

Afin de vérifier l'hypothèse formulée et atteindre le but de ce projet, quatre objectifs ont été fixés.

Objectif 1 : Déterminer l'influence des CEP sur la structure et l'hydrolyse de l' α -LA et des PP par l' α -CT.

Objectif 2 : Comparer les performances d'hydrolyse de l' α -CT sous forme libre et immobilisée.

Objectif 3 : Étudier l'effet combiné des CEP et de l'hydrolyse enzymatique catalysée par l' α -CT immobilisée sur la production, le profil et les caractéristiques des hydrolysats peptidiques issus de l' α -LA et des PP.

Objectif 4 : Évaluer le potentiel bioactif des hydrolysats peptidiques de l' α -LA et des PP par un screening ciblé de leurs activités antihypertensives et antidiabétiques.

3. Chapitre 3 - Prétraitement de l'alpha-lactalbumine par champ électrique pulsé : impact sur la production de peptides à potentiel antihypertenseur et antidiabétique

3.1. Transition contextuelle

L'état de l'art a mis en évidence la nécessité de recourir à un prétraitement innovant et respectueux de l'environnement afin de moduler la structure des protéines alimentaires, favorisant ainsi une dénaturation contrôlée, une meilleure susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique et une augmentation du rendement en peptides bioactifs. Dans ce contexte, cette étude s'est concentrée sur l' α -LA, une protéine majoritaire et bien caractérisée du lactosérum, choisie comme modèle afin d'examiner son potentiel de valorisation en peptides dotés d'activités antihypertensives et antidiabétiques. Les CEP ont été appliqués en tant que prétraitement pour élucider leur mécanisme d'action sur l' α -LA, notamment leur influence sur la conformation protéique et l'accessibilité des sites de clivage à l' α -CT. Bien que plusieurs études aient exploré l'effet des CEP sur le prétraitement des protéines alimentaires, aucune n'a spécifiquement examiné leur application sur l' α -LA en combinaison avec son hydrolyse enzymatique par l' α -CT, ni étudié leur impact conjoint sur les modifications structurales de la protéine, l'accessibilité des sites de clivage enzymatique et la production de peptides bioactifs.

Cette recherche a ainsi permis de combler cette lacune en générant des données inédites sur les effets combinés des CEP et de l'hydrolyse enzymatique de l' α -LA, mettant en lumière leur impact sur la structuration de la protéine et la production de peptides bioactifs. Elle répond ainsi aux objectifs spécifiques 1 et 4.

3.2. Résumé

L' α -lactalbumine (α -LA), une protéine clé de l'industrie agroalimentaire, constitue une source prometteuse de peptides bioactifs aux potentiels antihypertenseur et antidiabétique. Toutefois, sa structure globulaire compacte limite l'efficacité de son hydrolyse enzymatique. Cette étude met en évidence l'utilisation innovante des champs électriques pulsés (CEP)

comme prétraitement pour améliorer l'hydrolyse par rapport aux échantillons non traités ou soumis à un prétraitement thermique. Des conditions de 10 et 15 kV/cm (75 impulsions) ont permis de doubler le degré d'hydrolyse (DH), tandis que 20 kV/cm (37 impulsions) a entraîné une augmentation de 1,8 fois par rapport à l' α -LA native.

L'analyse structurale a révélé que les CEP induisent un dépliement partiel de la protéine, augmentant ainsi l'accessibilité aux sites de clivage enzymatique. De plus, ce prétraitement a favorisé la génération de peptides bioactifs, notamment AHKAL et LAHK, dont les activités antihypertensive et antidiabétique n'avaient jusqu'ici pas été rapportées. Ces peptides présentaient une abondance deux fois supérieure à celle observée dans l' α -LA native, dépassant également les rendements obtenus avec les prétraitements thermiques. Par ailleurs, les CEP ont démontré leur éco-efficience, produisant des effets comparables à un traitement thermique à 75 °C, mais sans provoquer de dénaturation excessive.

Cette étude établit ainsi les CEP comme une technologie innovante et durable, capable de révéler le potentiel fonctionnel de l' α -LA, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la valorisation des protéines dans l'industrie agroalimentaire.

3.3.Publication

Pulsed Electric Field pretreatment of α -lactalbumin: Impact on the Production of Peptides with Antihypertensive and Antidiabetic Potential

Hélorie Clouzot^{a,b,c,e}, Jacinthe Thibodeau^{c,d,e}, Laurent Bazinet^{c,d,e}, Rénato Froidevaux^{a,c}, Sergey Mikhaylin^{b,c,e}

^a UMR Transfrontalière 1158 BioEcoAgro, Lille University, INRAe, Liège University, UPJV, JUNIA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV—Institut Charles Viollette, 59000 Lille, France.

^b EcoFoodLab, Food Science Department, Laval University, Quebec City, QC, Canada

^c International Associated Laboratory in Bioproduction of Natural Antimicrobials (LIAAN), Laval University
— Lille University

^d Laboratoire de Transformation Alimentaire et Procédés Électromembranaires (LTAPEM, Laboratory of Food Processing and Electro-Membrane Processes), Food Science Department, Laval University, Quebec City, QC, Canada

^e Dairy Science and Technology Research Centre STELA, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec City, QC, Canada

Highlights:

- * PEF influences the structure of α -lactalbumin.
- * PEF with high electric field strength and pulse number doubled the DH.
- * PEF can improve generation of new peptides with potential bioactivities.

3.4. Abstract

α -lactalbumin (α -lac), a key protein in the agro-food industry, is a promising source of bioactive peptides with antihypertensive and antidiabetic potential. However, its compact globular structure limits enzymatic hydrolysis efficiency. This study demonstrates the innovative use of pulsed electric fields (PEF) as a pretreatment to enhance hydrolysis compared to untreated and thermally pretreated samples. PEF conditions of 10 and 15 kV/cm (75 pulses) doubled the degree of hydrolysis (DH), while 20 kV/cm (37 pulses) achieved a 1.8-fold increase relative to native α -lac. Structural analyses revealed that PEF induced partial protein unfolding, increasing the accessibility of cleavage sites. Furthermore, PEF pretreatment facilitated the generation of bioactive peptides such as AHKAL and LAHK, which have not been previously reported for their antihypertensive and antidiabetic activities. These peptides showed an average abundance 2 times higher than in native α -lac and exceeded yields from thermal pretreatments. PEF also proved to be eco-efficient, with conditions comparable to thermal treatment at 75 °C and without excessive denaturation. This study establishes PEF as an innovative and sustainable technology capable of unlocking the functional potential of α -lac, paving the way for new opportunities in protein valorization within the agro-food industry.

Keywords: α -lactalbumin, pulsed electric fields, enzymatic hydrolysis, bioactive peptides.

3.5. Introduction

In a constantly evolving world, meeting the increasing demand for protein ingredients for a global population estimated to reach nearly 11 billion by the end of the 21st century proves

to be a crucial challenge (Bhutto et al., 2024). To meet the growing demand for protein-rich food products, the dairy industry has intensified the processing of milk into various derivatives such as cheese and Greek yogurt, thereby generating a valuable by-product: whey. Despite a global production of over 190 million tons per year, only 50% of whey is currently valorized, mainly in the form of animal feed, fertilizer, whey protein powder, concentrate and/or isolate, lactose, metabolites (such as alcohols, lactic acid, sugars, and minerals), biogas, or enzymes, leaving a considerable untapped potential (Panghal et al., 2018; Chourasia et al., 2022; Mabrouki et al., 2022; Soumati et al., 2023; Bhutto et al., 2024). The dairy industry, in full expansion and firmly committed to sustainable practices, is moving towards optimizing the utilization of this still undervalued whey, thus transforming it in high added-value products (Soumati et al., 2023; Bhutto et al., 2024).

A promising approach to valorize whey relies on its potential to produce bioactive peptides, defined as protein segments with a beneficial impact on human health (Singh & Gaur, 2024). Indeed, α -lactalbumin (α -lac), the second most abundant protein in whey, has numerous applications justifying its use in the food and pharmaceutical industries. In addition to being used in infant formulas, nutritional supplements, and sports nutrition products, α -lac also improves the texture and functional properties of food products (Bhutto et al., 2024). This protein has also been valorized through enzymatic hydrolysis (Carullo et al., 2020; Ismail et al., 2020), releasing bioactive peptides with well-documented properties, such as antihypertensive, antioxidant, antidiabetic, anticancer, opioid, mineral-chelating, antimicrobial effects (Olvera-Rosales et al., 2023; Singh & Gaur, 2024). However, conventional enzymatic hydrolysis is challenged by the complexity of α -lac's compact structure, which reduces the accessibility to cleavage sites by proteases, thus compromising the efficiency of bioactive peptide release. To overcome this challenge, traditional methods such as thermal treatments are generally used to unfold the protein and facilitate its hydrolysis (Bertrand-Harb et al., 2002). However, while effective, these methods are energy-intensive and less environmentally sustainable, prompting the exploration of alternative solutions. Among these new approaches, non-thermal technologies such as high pressure, pulsed light, ultrasound and ultraviolet rays have emerged as promising options (Delsart et al., 2016; Ismail et al., 2020). These technologies modify the protein structure without heat, thereby increasing its sensitivity to hydrolysis while reducing environmental impact (Rocha et al.,

2018). Notable advances in the improvement of enzymatic hydrolysis of food proteins were demonstrated with Pulsed Electric Fields (PEF) (Mikhaylin et al., 2017; Liu et al., 2018; Chian et al., 2019; Agoua et al., 2020). A recent study showed that PEF releases bioactive peptides from β -lactoglobulin 17% more efficiently than conventional methods, boosting yield and enhancing enzymatic hydrolysis by chymotrypsin (Agoua et al., 2022). PEF enhanced peptide release by modifying the protein structure under the effect of the applied potential difference, through the generation of reactive species (e.g. H^{\bullet} , HO^{\bullet} , O^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $ONOO^-$, NO_2 , et NO^{\bullet}) and protein polarization (Mazurkiewicz et al., 2015; J. Wang et al., 2016; Giteru et al., 2018). Agoua et al. (2020) have shown that these phenomena favor partial unfolding of proteins, thereby increasing the availability of cleavage sites for proteases. However, no studies have yet considered the impact of PEF pretreatment on the enzymatic hydrolysis of α -lac. To address this gap, this study aims to: (1) investigate the structural modifications induced by PEF on α -lac, focusing on secondary and tertiary changes that enhance enzymatic accessibility, (2) analyze the peptide profiles resulting from the enzymatic hydrolysis of PEF-pretreated α -lac to identify bioactive peptides with potential antihypertensive and antidiabetic activities and (3) compare the efficiency of PEF pretreatment with conventional thermal methods in terms of enzymatic hydrolysis yield and eco-efficiency. This comprehensive approach seeks to elucidate the mechanisms underlying the effects of PEF on α -lac and its potential to sustainably enhance the release of bioactive peptides.

3.6. Materials and Methods

3.6.1. Materials

α -Lac (92% purity) was obtained from Agropur Inc. US (Eden Prairie, MN). The protein was hydrolyzed by bovine α -chymotrypsin type II (≥ 40 units/mg of protein), supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Other materials were acquired from Fisher Scientific (Nepean, Ontario, Canada).

3.6.2. Configuration of PEF

The PEF system was obtained from Diversified Technologies Inc. (Bedford, MA, USA). It consisted of a PEF treatment chamber and a modulation cabinet containing a high-voltage generator and a modulator. External components and subunits of the PEF chamber are presented in Figure 3.18. The PEF treatment chamber used was a co-linear type made up of three stainless steel electrodes (one high-voltage electrode and two low-voltage grounded electrodes) and two ceramic insulators. The electrodes had a diameter of 4 mm and were set at 5 mm apart. The protein solution, held in a cylindrical chamber, was fed from bottom to top into the PEF treatment chamber using a Masterflex I/P peristaltic pump (model 77602-30, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA), to prevent air entrapment and solid blockage upon solution arrival. The solution passed through the electrodes to be treated by high-voltage electrical field pulses.

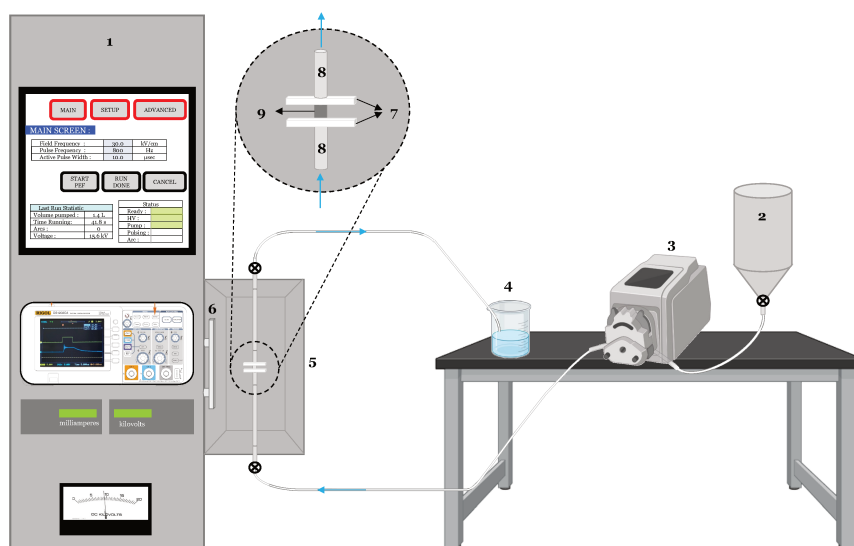


Figure 3.18. Diagram of the high-voltage electrical system equipped with a PEF for pretreating α -lac solutions (1% w/v): (1) Modulation cabinet with controls containing a high-voltage generator and a modulator, (2) cylindrical reservoir for feeding the α -lac solution, (3) peristaltic pump, (4) α -lac solution (1% w/v), (5) treatment chamber, (6) safety ground, (7) ceramic insulating plates, (8) ground electrodes, (9) high-voltage electrodes, (\rightarrow) flow of the α -lac solution.

3.6.3. α -lac pretreatment protocol by PEF

The α -lac PEF pretreatment involved applying successive pulses at different electric field strengths and frequencies on 1 L of protein solution (1% w/v) prior to enzymatic hydrolysis. The parameters tested are outlined in Table 3.1. The frequency and duration of the pulses were respectively set at 1000 Hz and 10 μ s. The flow rate of the protein solution was 100 mL/min and 200 mL/min when the number of pulses was 75 and 37, respectively. The PEF treatment conditions for α -lactalbumin were established based on the findings of (Robles-López et al., 2012), who examined the effects of pulsed electric fields on the structure of α -lac. This study demonstrated that increasing both the field strength and the number of pulses (such as 10 kV with 2 pulses or 9 kV with 10 pulses) effectively exposes the protein's hydrophobic regions without complete denaturation. Additional pre-tests were then performed to refine these parameters, aiming to partially unfold α -lactalbumin while avoiding electrical arcing. This method aims to increase the accessibility of cleavage sites, potentially enhancing enzymatic hydrolysis in later steps by making these regions more available for interaction. It is important to note that at an electric field strength of 20 kV/cm, only 37 pulses were tested due to the presence of electric arcs for 75 pulses, likely caused by dielectric breakdown and the presence of gas bubbles or solid particles disrupting the medium (Giteru et al., 2018).

Table 3.1. Conditions of pretreatment of α -lac by PEF

Treatments	1	2	3	4	5
Field strength (kV/cm)	10	15	10	15	20
Number of pulses	75	75	37	37	37

The conductivity, pH, and temperature were measured at the beginning and end of the PEF pretreatment. In parallel, conventional thermal pretreatments were performed as positive controls. For these controls, a 1% (w/v) α -lac solution in distilled water was heated to 75, 85, and 90°C for 5 min in a water bath, followed by rapid cooling to 37°C in an ice bath. An untreated 1% (w/v) α -lac solution in distilled water was used as a negative control (native α -lac). For each experimental condition (native, thermally pretreated, and PEF-pretreated

solutions), a 5 mL sample was collected for future analyses. Then, a volume of 100 mL of each pretreated solution was adjusted to a pH of 7.8 using NaOH (0.1 M) before proceeding with enzymatic hydrolysis.

3.6.4. Enzymatic hydrolysis of α -lac

Enzymatic hydrolysis was performed following the protocol by Mikhaylin et al. (2017). α -lac (1% w/v, pH 7.8, the optimal pH for chymotrypsin) solution, whether native, thermally pretreated or PEF-pretreated as described in the pretreatment section, was placed in a water bath at 37°C. An initial 5 mL sample (T_0) was collected, and 100 mL of the solution was used for enzymatic hydrolysis. Chymotrypsin was added to the reaction medium at a ratio of 1:100 (w/w) relative to α -lac, initiating the reaction. The temperature and pH were kept constant at 37°C and pH 7.8 using 0.1 M NaOH. Reaction medium samples were taken at 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, and 180-min intervals. At each time point, the hydrolysis was stopped by enzyme inactivation through heating the samples to 90°C for 10 min.

3.6.5. Determination of Degree of Hydrolysis (DH)

The DH of α -lac (native, heat-pretreated and PEF-pretreated) was determined using the o-phthaldialdehyde (OPA) method (Church et al., 1983; Turgeon et al., 1991). The real degree of hydrolysis was calculated by subtracting the concentration of free α -amino groups in intact α -lac from the theoretical degree of hydrolysis. Degrees of hydrolysis (DH) were averaged over three repetitions. Following Mikhaylin et al. (2017), the OPA reagent was prepared using 100 mM sodium tetraborate, 20% SDS, 40 mg OPA dissolved in methanol, and β -mercaptoethanol. L-Leucine standards (0.75–3 mM) were prepared in 1% SDS. For sample analysis, 150 μ L of sample or blank was mixed with 3 mL of OPA reagent, incubated for 2 min, and absorbance was measured at 340 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2700, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). DH was calculated according to Equations 3.1 and 3.2.

$$\frac{\text{mEq}}{\text{g}} = \left[\frac{\text{mEq.L}^{-1} \times \text{hydrolysis volume}}{1000} / \frac{\text{protein powder mass} \times \text{protein purity}}{100} \right] \times \text{dilution factor} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$\text{Degree of hydrolysis (DH)} = [(\text{mEq.g}^{-1}) / \text{average number of peptide bonds in the protein}] \times 100 \quad (\text{Eq. 3.2})$$

where the hydrolysis volume was expressed in mL, the protein powder mass in g, protein purity in %, the degree of hydrolysis in %, and the average number of peptide bonds in the protein represented 8.8 mEq.g⁻¹ of protein (Adler-Nissen, 1986).

3.6.6. Determination of Eco-efficiency

Eco-efficiency was assessed following the protocol established by Agoua et al. (2020), with a few adjustments. In brief, it was calculated for PEF and heat pretreatments by considering the increase in product value, represented here by the improvement in the DH, compared to the native protein, as well as an indicator of environmental impact, namely the energy consumption required to achieve this DH improvement. Eco-efficiency is thus expressed by the following equation (3.3):

$$EE = DH \text{ improvement} / \text{Energy consumption} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

where DH improvement represents the percentage increase in hydrolysis compared to the native protein. Energy consumption (EC) is the specific energy in MJ/kg used for pretreatments (PEF or heat).

3.6.6.1. Energy consumption for the thermal pretreatment

Thermal pretreatment was carried out at a laboratory scale using a water bath. In order to be closer to an industrial scale, the EC generated by thermal pretreatment was estimated using published data for industrial milk pasteurization plants, using a plate pasteurization system (equation 3.4) (Ozyurt et al., 2004).

$$EC = Q + W_{el} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

where Q is the total energy input required to pasteurize 1 kg of 1 % (w/w) α -lac solution (MJ/kg) and W_{el} is the total energy input of the electric motors used to pasteurize 1 kg of milk (Ozyurt et al., 2004; Aguirre-Villegas et al., 2012). Q was estimated using the following equation 3.5:

$$Q = mC_p\Delta T \quad (\text{Eq. 3.5})$$

where m represents the mass of the heated product (kg), C_p the heat capacity of the α -lac solution estimated from Bazinet & Castaigne, (2019) (MJ/kg/°C), and ΔT the difference in temperature variation (37 to 75, 85 or 90 °C).

3.6.6.2. Energy consumption for the PEF pretreatment

EC was evaluated using the calculation method proposed by Jin (2017) with some adjustments (Equation 3.6):

$$EC = W_{spec} + W_{pp} \quad (\text{Eq. 3.6})$$

W_{pp} corresponds to the energy supplied by the peristaltic pump to treat 1 kg of α -lac solution (MJ/kg), while W_{spec} represents the estimated total energy required to pretreat this same amount of α -lac solution using the PEF system (MJ/kg). Each of these terms was calculated as follows (Equations 3.7 and 3.8).

$$W_{spec} = \left(UIt_c * \frac{1}{M} \right) n_i \quad (\text{Eq. 3.7})$$

where U represents the applied voltage (kV), I the current intensity (A), M the mass in the treatment chamber (kg), t_c the effective pulse width (s) and n_i the number of pulses.

$$W_{pp} = (\rho QgH)t \quad (\text{Eq. 3.8})$$

where ρ represented the density of the α -lac solution (kg/m³), Q the volume flow rate (m³/s), g the acceleration of gravity (9.81 m/s²), H the height of liquid rise (1 m) and t the operating time (s).

3.6.7. Circular Dichroism (CD) spectroscopy

The structural changes of α -lac were obtained using a spectropolarimeter (Jasco J-815-150S, Jasco Corp., Tokyo, Japan) over a range of 190 to 260 nm following the protocol described by Agoua et al. (2020). In a 0.1 mm quartz DC cuvette, 45 μ L of α -lactalbumin solution (1 % w/v), either native, heat-pretreated, or PEF-pretreated, were added. The scan speed, data integration time (DIT), bandwidth, and sensitivity values were set at 100 nm/min, 1.0 s, 1.0 nm, and standard, respectively. Each final spectrum represented the average of 10 scans. The proportions of the three different secondary structures (α -helices, β -sheets, random coils) were calculated using CD Pro software, CONTIN procedure (Jasco Corporation Version 2.05.02). CD data were expressed in terms of molar ellipticity $[\theta]$, which was determined with CD Pro software based on measurement parameters (path length and molar concentration per residue). The molar concentration per residue of α -lac samples was calculated using equation 3.9:

$$\text{Molar concentration per residue} = \frac{1000 \times N \times [\alpha\text{-lac}]}{M_{\alpha\text{-lac}}} \quad (\text{Eq. 3.9})$$

Where N represented the number of α -lac residues, $[\alpha\text{-lac}]$ the protein concentration in g/mL, and M the molar mass of the protein in g/mol.

3.6.8. Determination of accessible sulfhydryl groups

Accessible sulfhydryl groups were determined following Beveridge et al., (1974). Tris-Glycine buffer (120.1 g urea, 2.6 g tris(hydroxymethyl)aminomethane, 1.7 g glycine, 2.9 g ethylenediaminetetraacetic acid in 500 mL distilled water, pH 8) and Ellman's reagent (4 mg dithiobis(2-nitrobenzoic acid) in 1 mL ethanol, solubilized overnight) were prepared. Protein solutions (native, heat-, and PEF-pretreated) were made with 75 mg α -lac in 10 mL Tris-Glycine buffer. In a 15 mL Falcon tube, 1 mL α -lac solution, 4 mL Tris-Glycine buffer, and 50 μ L Ellman's reagent were vortexed and incubated for 5 min at room temperature. Absorbance at 412 nm was measured using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2700, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Accessible sulfhydryl content was calculated using Equation 3.10:

$$\text{Accessible sulfhydryl groups} = \frac{73.53 \times A_{412} \times \text{Dilution}}{\text{Concentration}} \text{ of } \alpha - \text{lac} \quad (\text{Eq. 3.10})$$

Where accessible sulfhydryl groups were expressed in $\mu\text{mol/g}$. A represented absorbance was measured at 412 nm, and protein concentration was indicated in mg/mL .

3.6.9. Surface hydrophobicity

Intrinsic fluorescence spectra were generated following Boukil et al. (2022). α -lac solutions (native, heat-, and PEF-pretreated; 1% w/v) were prepared in 2 mM phosphate buffer (pH 7) and agitated overnight at 5°C. ANS (8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid) standards were prepared (8 mM stock, 0.1 M phosphate buffer, pH 7) and α -lac concentrations (0.01–0.05%) were adjusted to 3 mL with 2 mM phosphate buffer. A blank (0% protein) served as a control. For each sample, 200 μL α -lac solution was mixed with 15 μL ANS (8 mM), vortexed, and incubated for 5 min in the dark at room temperature. Fluorescence was measured (excitation: 380 nm, emission: 480 nm) using a BioTek Synergy H1 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Samples (200 μL) were dispensed into opaque black 96-well plates (3 wells/dilution). Controls included a blank (200 μL phosphate buffer) and positive control (200 μL ANS solution). Relative fluorescence units (RFU) were calculated using Equation 3.11:

$$\text{RFU} = \text{Measured RFU} - \text{Sample blank RFU} - \text{ANS blank RFU} \quad (\text{Eq. 3.11})$$

Data were then obtained by plotting the fluorescence intensity against the protein concentration. Surface hydrophobicity H_0 corresponded to the slope of the linear regression analysis.

3.6.10. UPLC-MS/MS analyses

Final hydrolysates (180 min) were analyzed using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) technology coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS), based on Cournoyer et al. (2024) method with some modifications. Analyses were performed on an Agilent 1290 Infinity II UPLC system (binary pump G7120A, multisampler G7167B, VWD G7114B at 214 nm) coupled to an IM-Q-TOF 6560 mass spectrometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Hydrolysate samples (1% protein w/v) were filtered (0.45 μ m PVDF) and injected (1 μ L) into a Poroshell 120 EC-C18 column (2.1 \times 100 mm, 2.7 μ m, 45 °C, Agilent). The flow rate was 400 μ L/min (max pressure 600 bar). A solvent gradient (A: LC-MS grade water + 0.1% formic acid, B: LC-MS grade acetonitrile + 0.1% formic acid) was applied: 1–45% B over 30 min, 45–95% B over 15 min, held for 5 min, and re-equilibrated within 5 min. MS was operated in positive ionization mode (2 GHz extended dynamic range, 100–3,200 m/z). Nitrogen was used as drying gas (13 L/min, 250 °C) and nebulizing gas (30 psi). Capillary, nozzle, and fragmentor voltages were set to 3,500 V, 300 V, and 400 V, respectively. Calibration was performed using an ESI-L tuning mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Data acquisition/analysis (MassHunter B.09.00 and B.07.00 SP2 with BioConfirm module) identified peptides based on sequence, molecular weight (Da), and position within bovine α -lac (UniProtKB – P00711).

3.6.11. Screening of antihypertensive and antidiabetic potential of peptide hydrolysates of α -lac

The potential of peptides to exhibit antihypertensive and antidiabetic activities was assessed using bioinformatics databases and subsequent structural and physico-chemical analysis.

3.6.11.1. Database screening

For antihypertensive peptides, the AHTPDB bioinformatics database (Kumar et al., 2015) (<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/>) was used to identify candidates based on their ability

to inhibit angiotensin-converting enzyme (ACE). For antidiabetic peptides, the BioDADPep database was employed to evaluate their potential for inhibiting enzymes such as DPP-IV, alpha-glucosidase, and alpha-amylase (Roy & Teron, 2019) (<https://omicsbase.com/BioDADPep/biodadpep-search/>).

3.6.11.2. Structural and physico-chemical analysis

To assess peptides not yet documented in the literature, an in-depth analysis of their structural and physico-chemical properties was conducted:

- **Antihypertensive Peptides:** Peptides with fewer than 20 amino acids and a molecular weight below 3 kDa were prioritized for their ability to inhibit ACE through interactions like hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and van der Waals forces with ACE's active sites near the zinc ion (Gallego et al., 2018a; Ichim et al., 2024). The presence of hydrophobic residues such as proline at the C and N termini, along with charged amino acids like glutamic acid and lysine, were crucial for optimizing these interactions (Cheung et al., 1980; Abdelhedi et al., 2017; Chi et al., 2024).
- **Antidiabetic Peptides:** Ideal peptides had 2-8 amino acids, 200 Da-1 kDa, with hydrophobic residues (leucine, isoleucine, valine) at the N-terminus (Mu et al., 2023). Proline in the second N-terminal position further enhanced DPP-IV inhibition by competitively binding to the enzyme's active sites (Lacroix & Li-Chan, 2014a). Hydrophobic residues (alanine, leucine, proline) and a net charge (-2.9 to 1.1 at pH 7) further strengthened interactions (Zhang et al., 2016; Mu et al., 2023).

3.6.12. Statistical analyses

3.6.12.1. Statistical analyses

Results were analyzed using GraphPad Prism version 9.5.1 (528) for macOS (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com), using a one-way linear

ANOVA model and Tukey's test. This test was applied to compare all pairs of means between the different treatment groups to determine which treatment differed significantly from another at $P < 0.05$.

3.6.12.2. UPLC-MS/MS data treatment

A total of 104 peptides were identified. The ion abundances of the peptides were then subjected to statistical analysis using the Mass Profiler Professional software, version 15.1 (Agilent Technologies). Following the procedure developed by Cournoyer et al. (2024), peptides were filtered based on their frequency of occurrence (100% threshold). A non-parametric Kruskal-Wallis test was applied to each peptide to compare the average ion abundances between the different experimental conditions (Vargha & Delaney, 1998). As described by Cournoyer et al. (2024), this test is particularly suitable when the data do not strictly adhere to the assumptions of normality or homogeneity of variances. The Kruskal-Wallis test has the advantage of being applicable regardless of the data distribution (Ostertagová et al., 2014). To minimize the risk of type I error, the false discovery rate (FDR) method, also known as the Benjamini-Hochberg method (Benjamini & Hochberg, 1995), was applied to identify peptides that significantly differed between conditions (Cournoyer et al., 2024). Adjusted p-values were obtained using a permutation-based version of this method, with 10 000 permutations. Finally, a hierarchical clustering heatmap were generated for the remaining 35 peptides to identify potential peptide groups and characterize the overall behavior of the different experimental conditions. For this analysis, peptide values were transformed to \log^2 to approximate a normal distribution of factor scores (Cournoyer et al., 2024).

3.7. Results and Discussion

3.7.1. Impact of PEF pretreatment on the DH of α -lac

Figure 3.19 depicts the DH of native and pretreated α -lac over time.

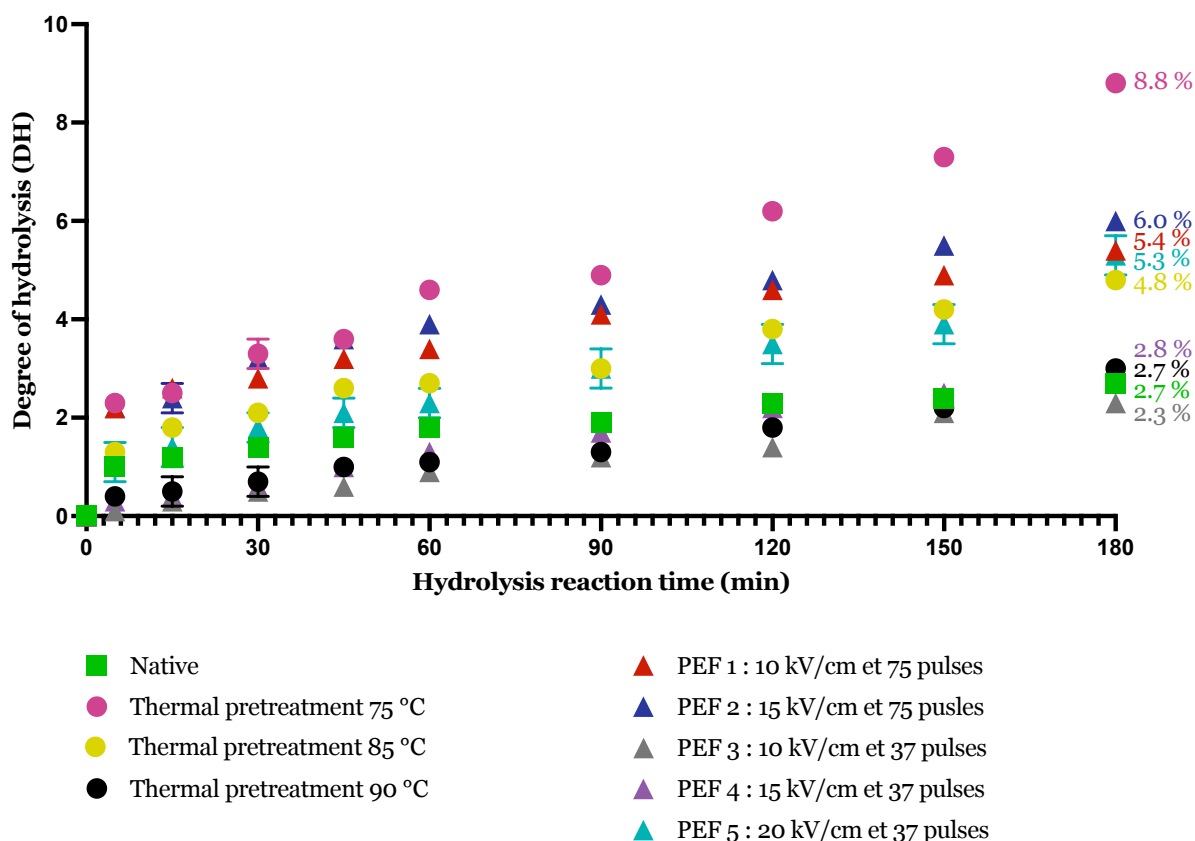


Figure 3.19. Chymotryptic DH of native α -lac, heat-pretreated, and PEF-pretreated, as a function of reaction time

After 5 min, the general trend of DH becomes more pronounced under PEF and heating conditions compared to native α -lac, progressively demonstrating more efficient kinetics over time, except for PEF 3 and heating at 90°C. The DH of native α -lac protein reaches $2.7 \pm 0.1\%$ after 180 min of treatment. It appears relatively low compared to other previous studies, which reported DH values of 6.5% (Vreeke et al., 2023) and 9.3% (Deng et al., 2018) after a 180-min hydrolysis duration for the same Enzyme:Substrate ratio. These variations can be explained by several factors, including the source of α -lac from different suppliers

and different origins (cow, ewe), its initial state (native or not), its apo- or holo-form (with or without the presence of Ca^{2+}), or even the method used to determine DH (OPA, TNBS, or the pH-stat technique). In the studies by Deng et al. (2018) and Vreeke et al. (2023), the α -lac was in its apo-form, meaning the calcium ions had been removed using EDTA. Additionally, the DH was measured using the pH-stat method, based on quantifying the volume of NaOH added to maintain a constant pH. It is essential to note that the α -lac used in the present work has been isolated under strict conditions that preserve its integrity, specifically without exposure to heat and with rigorous pH control. As a result, α -lac is present in its native form and still contains calcium (195 mg/100g α -lac powder) which helps maintain its native state and optimal stability. This makes hydrolysis more difficult. Variations in the electric field strength and pulse number significantly influenced the DH of α -lac. With a field strength of 10 kV/cm and 75 pulses (PEF 1), the DH was increased by 1.5 times compared to native α -lac. When the field strength was raised to 15 kV/cm with the same number of pulses (PEF 2), the DH reached a value 2.2 times higher than that of native α -lac, suggesting a cumulative effect between increased field strength and high pulse count. Additionally, with a higher field strength of 20 kV/cm and a reduced number of pulses at 37 (PEF 5), the DH remained 1.8 times higher than the native sample, indicating that the high field strength partially compensated for the shorter exposure time. These observations can be explained by the behavior of proteins in an aqueous solution, where certain charged amino acids (Asp, Glu, Lys, Arg, and His) carry net charges that respond to the applied electric field. Under the influence of the external field, these amino acids may have reoriented or moved away from each other, leading to a partial unfolding of the protein that facilitated cleavage site accessibility for chymotrypsin, thereby increasing the DH (Han et al., 2018; Pan et al., 2022). In contrast, when the number of pulses was reduced to 37 and the field strength was lowered to 10 or 15 kV/cm (PEF 3 and PEF 4), the DH remained statistically equivalent to that of native α -lac, indicating that the shorter exposure time and reduced field strength limited protein unfolding. When comparing these results to thermal treatments, the effect of temperature also proved significant. Pretreatments at 75 °C and 85 °C increased the DH of native α -lac by 3.2 times and 1.7 times, respectively, aligning with studies showing that moderate temperatures promote partial protein unfolding, thereby exposing more cleavage sites for chymotrypsin without causing excessive aggregation (Bertrand-Harb et al.,

2002; Nicoleta et al., 2010). The treatment at 75 °C was particularly notable, doubling the DH after 3 h of hydrolysis, likely due to the dissociation of the quaternary structure and partial denaturation (Mirmoghtadaie et al., 2016). Other studies have also shown that thermal pretreatments enhance enzymatic hydrolysis in other proteins, such as β -lactoglobulin, legume proteins, and mackerel proteins (Bertrand-Harb et al., 2002; Torres et al., 2016; Mikhaylin et al., 2017; Agoua et al., 2020; Korczek et al., 2020). Conversely, at a higher temperature, such as 90 °C, it is likely that protein aggregation was facilitated through disulfide, hydrophobic, and electrostatic interactions, thereby limiting accessibility to specific cleavage sites for chymotrypsin and potentially reducing the DH (McGuffey et al., 2005). In conclusion, although both PEF and thermal pretreatments effectively increased the DH of α -lac, PEF provided unique flexibility by allowing precise adjustment of field strength and pulse number to maximize partial protein unfolding. This unfolding, resulting from a complex process of intra- and intermolecular interactions, exposed more cleavage sites accessible to chymotrypsin, thus enhancing the DH. Studies on other proteins, such as β -lactoglobulin (Izquierdo et al., 2005; Mikhaylin et al., 2017; Agoua et al., 2020), beef muscle proteins (Chian et al., 2019), and egg white (Liu et al., 2018) have also demonstrated the beneficial effect of PEF on hydrolysis, highlighting the importance of these parameters for optimizing enzymatic efficiency. The continuation of this study will further explore the dynamics of this complex unfolding and its impact on cleavage site accessibility to better understand the mechanisms enhancing enzymatic hydrolysis.

3.7.2. Impact of PEF pretreatment on eco-efficiency (EE)

The comparative EE effect of thermal (positive control) and PEF pretreatments on α -lac solution was highlighted by analyzing the relationship between energy consumption and DH improvement: the highest the score, the most efficient the condition (Figure 3.20).

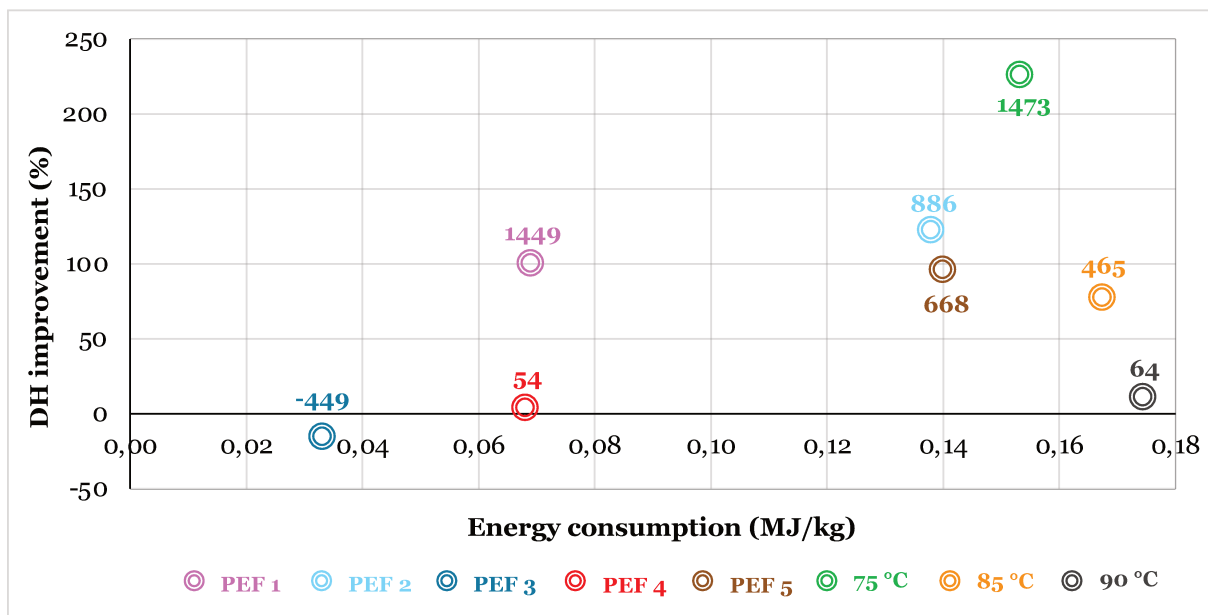


Figure 3.20. Comparative effect of thermal pretreatment (positive control) and PEF on the eco-efficiency of α -lac solution

Analysis of the EE scores showed that the most eco-efficient conditions were achieved with PEF 1 (10 kV/cm, 75 pulses) and the thermal pretreatment at 75 °C. PEF 1 had an EE that was only 1.6% lower than that of the thermal pretreatment at 75 °C, suggesting that it represented an equally effective alternative for maximizing the DH in an eco-efficient manner. The impact of the number of pulses was particularly important in PEF conditions. By maintaining a constant electric field strength, an increase in the number of pulses favored a proportional relationship between the improvement in the DH and energy consumption. For example, comparisons between PEF 1 (10 kV/cm, 75 pulses) and PEF 3 (10 kV/cm, 37 pulses) showed that increasing the number of pulses resulted in an improvement in EE. A similar trend was observed between PEF 2 (15 kV/cm, 75 pulses) and PEF 4 (15 kV/cm, 37 pulses). Regarding the impact of electric field strength, the results indicated that an increase in strength at a constant number of pulses did not necessarily compensate for the reduction in the number of pulses. For example, the comparison between PEF 1 (10 kV/cm, 75 pulses) and PEF 2 (15 kV/cm, 75 pulses) revealed that the increase in electric field strength led to an EE approximately 39% lower than that of PEF 1, suggesting that the electric field strength alone was insufficient to improve energy efficiency under high pulse count conditions.

In contrast, under low pulse count conditions (37), such as in PEF 3 (10 kV/cm), PEF 4 (15 kV/cm), and PEF 5 (20 kV/cm), the increase in electric field strength resulted in a progressive improvement in EE. However, this improvement remained lower than that observed with PEF 1. For example, PEF 5 was 54% less eco-efficient than PEF 1, while PEF 3 showed a reduction of 131% compared to this reference condition. These results suggest that increasing the electric field strength may partially compensate for the reduction in the number of pulses, but it does not achieve the efficiency observed with PEF 1. Regarding thermal pretreatments, they show a strong dependence on temperature. The treatment at 75 °C is the most eco-efficient, while the treatments at 85 °C and 90 °C exhibit reductions in EE of 68% and 96%, respectively, compared to 75 °C. Thus, optimizing EE in PEF treatments heavily depends on the number of applied pulses while considering the electric field strength. This analysis emphasizes the importance of balancing these two parameters to maximize energy efficiency and improve DH. For thermal pretreatments, a moderate temperature of 75 °C optimizes the balance between energy consumption and improvement in DH.

3.7.3. Effect of PEF on the secondary structure of α -lac

The evaluation of changes in the secondary structure of α -lac is observed using far-UV CD. The composition of secondary structure in native α -lac as well as in various pretreated α -lac samples are listed in Table 3.2.

Table 3.2. Secondary structural components of α -lac estimated by CD.

Samples	α Helix (%)[*]	β Sheet (%)	Random coils (%)
α -lac native	23.3 \pm 0.6 ^{a**}	18.6 \pm 0.6 ^f	58.2 \pm 0.2 ^{b, c}
α -lac (75 °C)	10.2 \pm 0.6 ^e	31.8 \pm 0.6 ^c	58 \pm 0.7 ^{b, c}
α -lac (85 °C)	3.5 \pm 0.3 ^g	40.3 \pm 0.9 ^a	56.3 \pm 1.1 ^c
α -lac (90 °C)	15.8 \pm 0.6 ^d	23.8 \pm 0.7 ^d	60.4 \pm 0.1 ^a
α -lac PEF 1 (10 kV/cm, 75 pulses)	6.5 \pm 0.3 ^f	36.1 \pm 0.3 ^b	57.3 \pm 0.5 ^{b, c}
α -lac PEF 2 (15 kV/cm, 75 pulses)	3.3 \pm 0.1 ^g	39.8 \pm 0.7 ^a	56.7 \pm 0.7 ^{b, c}
α -lac PEF 3 (10 kV/cm, 37 pulses)	18.5 \pm 0.7 ^c	23.8 \pm 0.1 ^d	58.1 \pm 0.5 ^{b, c}
α -lac PEF 4 (15 kV/cm, 37 pulses)	18.9 \pm 0.7 ^{b, c}	23.8 \pm 0.7 ^d	57.3 \pm 0.2 ^{b, c}
α -lac PEF 5 (20 kV/cm, 37 pulses)	20.2 \pm 0.4 ^b	21.3 \pm 1.0 ^e	58.5 \pm 1.4 ^{a, b}

*The different components (α -helix, β -sheet and random coils) were estimated using Spectra Manager software (CD Pro analysis) and the CONTIN analysis procedure, reference SPD48.

**Treatments with different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$)

The CD analysis of native α -lac aligns with the literature (Robbins & Holmes, 1970; Robles-López et al., 2012). The secondary structure percentages show a characteristic distribution among α -helices, β -sheets, and random coils, confirming the native state of the protein. After PEF pretreatments, conditions with a reduced number of pulses (37 pulses) and an electric field strength ranging from 10 to 20 kV/cm (PEF conditions 3, 4, and 5) maintained the secondary structure of α -lac relatively stable, with similar proportions of α -helices (average of 19.2%), β -sheets (average of 23.0%), and random coils (average of 58.0%). These results suggested that with a limited number of pulses, the field strength had a limited impact on the secondary structure of α -lac. In contrast, with a higher number of pulses (75 pulses, PEF conditions 1 and 2), the electric field strength became a determining factor in modifying the structure of α -lac. An increase in electric field strength from 10 to 15 kV/cm led to an approximately 50% reduction in the proportion of α -helices and about a 10% increase in β -sheets, indicating that the combination of high electric field strength and an increased number of pulses was necessary to induce significant structural changes. A previous study on α -lac

showed that under less intense PEF treatment conditions (4.5 to 9.0 kV/cm with only 2 to 4 pulses, pH 7), no notable conformational changes in the protein were observed (Robles-López et al., 2012). The proportions of α -helices (29.65%), β -sheets (10.45%), and random coils (60.46%) remained constant, whether the protein was in its native state or subjected to these PEF treatments, confirming the absence of denaturation under these conditions. However, several studies have shown that PEF can induce non-denaturing modifications in the structure of whey proteins (Xiang et al., 2011; Zhao & Yang, 2012; Mikhaylin et al., 2017; Agoua et al., 2020b; Xu et al., 2021; Axelrod et al., 2022). Therefore, the combination of pulse number and electric field strength plays a crucial role in structural modifications of α -lac, primarily favoring the conversion of α -helices to β -sheets. Indeed, the work of Liu et al. (2011), using Fourier-transform infrared spectroscopy on soybean proteins, revealed the significant impact of PEF on secondary structure conversion. They demonstrated that PEF reduced the strength of hydrogen bonds, altered the vibrations of polar groups present in β -sheets, induced polarization of amino acid side chains, and modified the orientation of the dipole moment of α -helices or the distance between bonds, thereby contributing to the conversion of β -sheets to α -helices. Thermal pretreatments induced notable structural modifications in α -lac. At 75 °C, the protein showed a significant decrease in the proportion of α -helices, by approximately 43%, as well as a significant increase in β -sheets by around 70%, while maintaining relative stability in random coils compared to native α -lac. With the temperature raised to 85 °C, the proportion of α -helices dropped by more than 60% relative to native α -lac, while β -sheets increased by about 30%, reaching complete denaturation at this temperature. This denaturation process, which begins around 73.8 °C (Lajnaf et al., 2018), is exacerbated at higher temperatures and becomes total after 5 min of thermal treatment at 85 °C (Wehbi et al., 2005; Genene et al., 2019; Mohamed et al., 2022). This denaturation is caused by the disruption of hydrogen bonds, leading to the loss of the protein's native structure (Lam & Nickerson, 2015b). At 90 °C, an unexpected change was observed: the proportion of α -helices increased significantly, by approximately 350% compared to that measured at 85 °C, while the proportion of β -sheets decreased. This increase in α -helix content could be associated with protein aggregation, as suggested by (Mohamed et al., 2022). (McGuffey et al., 2005) also reported that beyond 90 °C, the denaturation of α -

lac becomes irreversible, reinforcing the idea that this structural reorganization could result from protein aggregation.

This comparison highlights the differences between PEF treatments and thermal pretreatments: PEF allows for more precise control of the secondary structure of α -lac by finely adjusting the electric field strength and number of pulses, while thermal treatments induce a progressive modification of α -helices, accompanied by a corresponding increase in β -sheets. This modification leads to complete denaturation around 85 °C, followed by possible protein reaggregation at 90 °C.

3.7.4. Effect of PEF on the tertiary structure of α -lac

3.7.4.1. Accessible sulfhydryl groups

Accessible sulfhydryl groups in native and pretreated α -lac are presented in Figure 3.21.

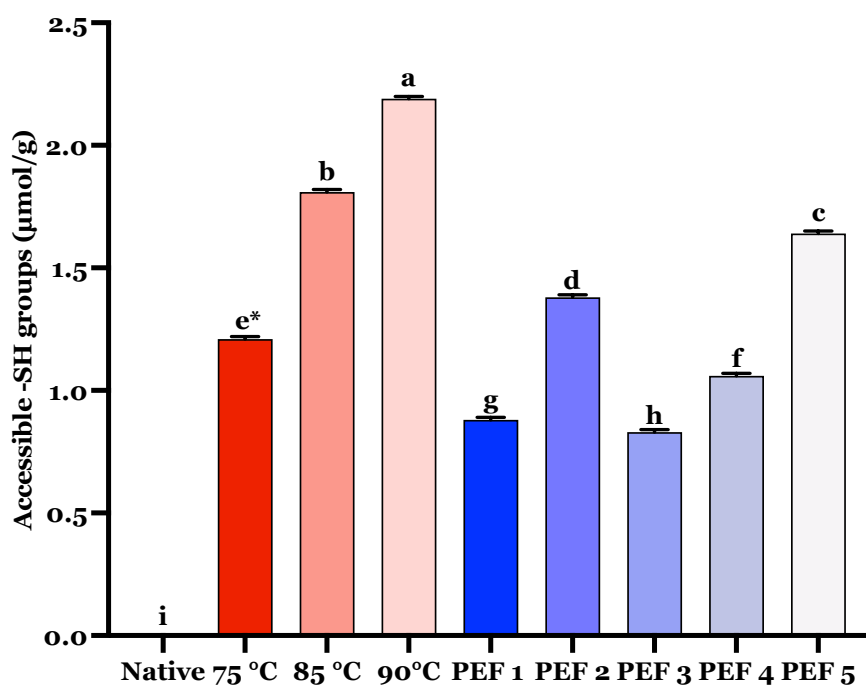


Figure 3.21. Concentrations of accessible sulfhydryl groups for native, heat-pretreated (75, 85, 90 °C) and pretreated via PEF conditions α -lac solutions (condition 1: 10 kV/cm and 75 pulses, condition 2: 15 kV/cm and 75 pulses, condition 3: 10 kV/cm and 37 pulses, condition 4: 15 kV/cm and 37 pulses, and condition 5: 20 kV/cm and 37 pulses).

*Treatments with different letters are significantly different ($P < 0.0001$).

In its native structure, α -lac does not display any free sulfhydryl groups (-SH), with a measured concentration of 0 $\mu\text{mol/g}$. This result aligns with the known structure of α -lac in the literature (Nielsen et al., 2018; Hernández-Sánchez, 2023). This is due to the involvement of these groups in four disulfide bridges ($^6\text{Cys-Cys}^{120}$, $^{60}\text{Cys-Cys}^{77}$, $^{73}\text{Cys-Cys}^{90}$, and $^{28}\text{Cys-Cys}^{111}$), which connect and stabilize its two main domains: an α -helix-rich domain and a domain composed of β -sheets, connected by a calcium-binding loop (Ca^{2+}) (Permyakov & Berliner, 2000; Jakopović et al., 2016; Nielsen et al., 2018; Hernández-Sánchez, 2023). This disulfide bond network ensures the stability of the native structure, although it can be weakened by environmental modifications, such as PEF or heat, allowing the exposure of -SH groups (Shirley, 1995; Permyakov et al., 2016). In comparison, PEF and thermal pretreatments significantly increased the concentration of accessible -SH groups, indicating a progressive destabilization of the native structure and rupture of the stabilizing disulfide bonds. Under the influence of PEF, a progressive release of -SH groups were observed, depending on the electric field strength and the number of applied pulses. At constant electric field strength, the number of pulses significantly impacted the release of -SH, with conditions at 75 pulses showing a greater release than those at 37 pulses. For example, at 10 kV/cm, the condition with 75 pulses (PEF 1) induced an increase of approximately 20% of -SH compared to the condition with 37 pulses (PEF 3). At 15 kV/cm, this increase reached about 25%. This trend indicated that the increase in the number of pulses facilitated the rupture of disulfide bonds and, consequently, the release of -SH. This trend was also observed for canola proteins (Zhang et al., 2017) and soybean proteins (Li et al., 2007). When the field strength increased for the same number of pulses, the release of -SH also significantly increased. Thus, for 37 pulses, the condition at 15 kV/cm (PEF 4) showed a concentration of -SH approximately 30% higher than that obtained at 10 kV/cm (PEF 3). Similarly, at 75 pulses, a release of -SH about 50% higher was observed at 15 kV/cm (PEF 2) compared to 10 kV/cm (PEF 1). This suggested that the strength of the electric field was crucial in exposing -SH groups, enhancing the rupture of disulfide bonds stabilizing the protein structure. This trend was also observed for canola proteins (Zhang et al., 2017) and chicken myofibrillar proteins (Dong et al., 2020). Finally, the most intense PEF condition (20 kV/cm, 37 pulses, PEF 5) resulted in the highest release of -SH groups among the PEF treatments, with an increase of about 80% compared to the less intense condition of 10 kV/cm and 37 pulses (PEF 3). Despite a relatively low

number of pulses, the high strength of the electric field played a crucial role, suggesting that it may compensate for a lower number of pulses by producing a sufficiently powerful effect to induce the rupture of disulfide bonds and expose -SH groups. In summary, the exposure of -SH groups during PEF pretreatments are strongly influenced by the electric field strength and the number of pulses, with strength playing a key role. PEF appears to promote an increase in accessible -SH groups, which can be attributed to the rupture of disulfide bridges, revealing cysteines that were previously engaged in these bonds. These bridges, which form through oxidation-reduction reactions, are sensitive to environmental conditions such as the presence of free radicals and oxidizing species, which PEF can generate in aqueous environments (Shirley, 1995). Indeed, PEF creates polar groups within α -lac, inducing the production of free radicals, including superoxide anion (O_2^-), singlet oxygen (1O_2), and peroxide radical (H_2O_2). These reactive species are likely to promote electrostatic interactions between protein molecules, because their unfolding, or induce structural modifications of α -lac. Furthermore, it is hypothesized that PEF disrupts the alignments of electric charges in α -lac, thus increasing entropy and favoring a more disordered state. This phenomenon facilitates the unfolding of the protein and the exposure of previously buried -SH groups that were stabilized by disulfide bonds (Giteru et al., 2018; Dong et al., 2020). Moreover, the results indicate a lack of direct correlation between the DH, CD analysis, and the release of -SH groups. Notably, an increase in the concentration of accessible -SH groups, associated with denaturation observed through CD (such as a decrease in α -helices and an increase in β -sheets), does not always lead to an improvement in DH (as seen in PEF conditions 3 and 4). It would therefore be interesting to explore the influence of electric charge displacements, and the dipole moments of proteins subjected to PEF pretreatments to better understand their impact on the structure of α -lac and its hydrolysis. Regarding the effect of thermal pretreatments, a significant increase in the release of -SH groups was observed as a function of temperature. At 75 °C, an increase of approximately 20% compared to the native sample was obtained, suggesting moderate denaturation. At 85 °C, the release of -SH increased by 50% compared to 75 °C, reflecting an increased rupture of disulfide bridges. At 90 °C, the release reached a maximum with an 80% increase compared to 75 °C, indicating near-complete denaturation comparable to the most intense PEF conditions. This advanced denaturation could affect essential disulfide bridges in the binding of the α and β domains, as

well as the calcium-binding loop, leading to substantial rupture of disulfides and increasing the risk of aggregation (Permyakov & Berliner, 2000; Chang & Li, 2001; Jakopović et al., 2016). These observations align with those of (Nielsen et al., 2018), who noted an increase in accessible -SH groups when α -lac is heated to 90 °C for at least 5 min, with increasing concentration during prolonged heat exposure. In addition, the high reactivity of these released -SH groups at elevated temperatures, particularly under alkaline conditions, leads to thiol-disulfide exchange and oxidation reactions. This promotes the rapid formation of intermolecular disulfide bonds, which can lead to the reaggregation of α -lac into tightly bound complexes (Bazinet et al., 1997).

3.7.4.2. Surface hydrophobicity

The surface hydrophobicity of native α -lac and those pretreated by heating or PEF are presented in Figure 3.22.

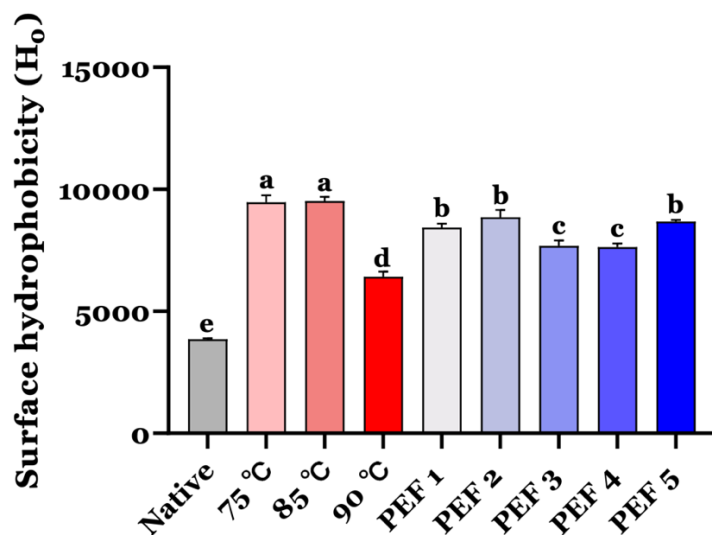


Figure 3.22. Surface hydrophobicity (H_0) of native, heat-pretreated (75, 85, 90 °C) and PEF-pretreated α -lac (condition 1: 10 kV/cm and 75 pulses, condition 2: 15 kV/cm and 75 pulses, condition 3: 10 kV/cm and 37 pulses, condition 4: 15 kV/cm and 37 pulses, and condition 5: 20 kV/cm and 37 pulses).

*Treatments with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Whatever the pretreatment condition (thermal or PEF), the H_0 was significantly higher compared to that of the native α -lac, suggesting an alteration in the tertiary structure of α -lac

and its surface configuration because of the pretreatment (Lam & Nickerson, 2015b; Romo et al., 2023).

Under the influence of PEF, the hydrophobicity of α -lac increased by at least 50% compared to that of the native protein. This increased hydrophobicity was related to the treatment conditions, highlighting the interaction between the electric field strength and the number of pulses. Specifically, the samples subjected to 75 pulses (PEF 1 and PEF 2) exhibited higher hydrophobicity than those treated with only 37 pulses (PEF 3 and PEF 4), despite the increase in electric field strength. These observations suggested that, at the same electric field strength, an increase in the number of pulses enhances hydrophobicity. However, although PEF 5 utilized only 37 pulses, it displayed hydrophobicity comparable to that of the most hydrophobic conditions, which involved 75 pulses (PEF 1 and PEF 2). This could be attributed to the application of a particularly strong electric field strength (20 kV/cm), capable of compensating for the low number of pulses and causing significant changes in the structure of α -lac. This increase in protein surface hydrophobicity during PEF pretreatment has been corroborated by other authors in soy protein isolate (Li et al., 2007), α -lac (Robles-López et al., 2012), canola proteins (Zhang et al., 2017), and chicken myofibrillar proteins (Dong et al., 2020). Consequently, the increased hydrophobicity of α -lac was correlated with the electric field strength applied and a high number of pulses. However, it is important to note that the impact of the electric field strength predominated over the number of pulses, as also observed by (Dong et al., 2020) in their study on chicken myofibrillar proteins. These results supported the conclusions regarding the DH, indicating that an increase in the strength of the PEF was associated with a rise in surface hydrophobicity as well as an increase in DH. The denaturation of α -lac induced by PEF pretreatment exposed groups that were initially buried within its three-dimensional structure, such as -SH groups released by the rupture of disulfide bonds. Meanwhile, CD analyses revealed a decrease in α -helices and an increase in β -sheets, indicating significant modifications in the secondary structure. Ultimately, these changes in the secondary and tertiary structures of α -lac enhanced the accessibility of cleavage sites for enzymes, thus facilitating enzymatic hydrolysis. Consequently, the increase in surface hydrophobicity, resulting from denaturation, promoted the accessibility of enzymatic sites, contributing to the increase in DH.

Regarding the α -lac solutions subjected to thermal pretreatment, conditions at 75 and 85 °C resulted in a threefold increase in surface hydrophobicity compared to the native protein solution. The condition at 90 °C also led to an increase in surface hydrophobicity compared to the native α -lac solution, although this increase was significantly less pronounced than those observed after pretreatments at 75 and 85 °C (a twofold increase). Indeed, the application of heat to α -lac caused a modification in the conformation of its tertiary structure, promoting the exposure of hydrophobic fragments that were previously buried within the protein: this modification is attributed to protein denaturation (Pallarès et al., 2004; Lam & Nickerson, 2015b). Other authors have also observed this phenomenon in whey proteins (Alizadeh-Pasdar & Li-Chan, 2000; Shen et al., 2017), pea proteins (Peng et al., 2016) and soy proteins (Wang et al., 2012). However, the temperature applied to the α -lac solution played a crucial role in transforming its structure. When the irreversible denaturation temperature (90 °C) was reached, it could have led to aggregation, resulting in a further reduction in hydrophobicity (Chaplin & Lyster, 1986; McGuffey et al., 2005; Lam & Nickerson, 2015b). Indeed, beyond 85 °C, reactive sulfhydryl groups may begin to assemble to form intermolecular aggregates through disulfide bonding. This process is initiated by a sulfhydryl/disulfide exchange at the level of the four disulfide bridges (Lajnaf et al., 2018). At 90 °C, the high reactivity of the liberated -SH groups, especially at pH close to 8, further accelerates thiol-disulfide exchange and oxidation reactions (Bazinet et al., 1997). This leads to rapid formation of protein aggregates via new disulfide linkages, effectively masking the hydrophobic fragments that had initially been exposed during denaturation. Consequently, despite the significant liberation of -SH groups previously, the surface hydrophobicity of α -lac remains low due to the burial of these hydrophobic regions within the reaggregated complexes. These findings highlight the dual role of temperature in both denaturing and restructuring proteins, emphasizing the delicate balance between unfolding and aggregation under high-temperature, alkaline conditions.

3.7.5. Peptide population of final hydrolysates

3.7.5.1. RP-UPLC-MS/MS characterization of final hydrolysates

The behavior of peptide populations (native, heat- and PEF-pretreated α -lac) was studied, in addition to the DH. The results, visualized as a heatmap based on hierarchical clustering (Figure 3.23), revealed distinct peptide regulations under different experimental conditions.

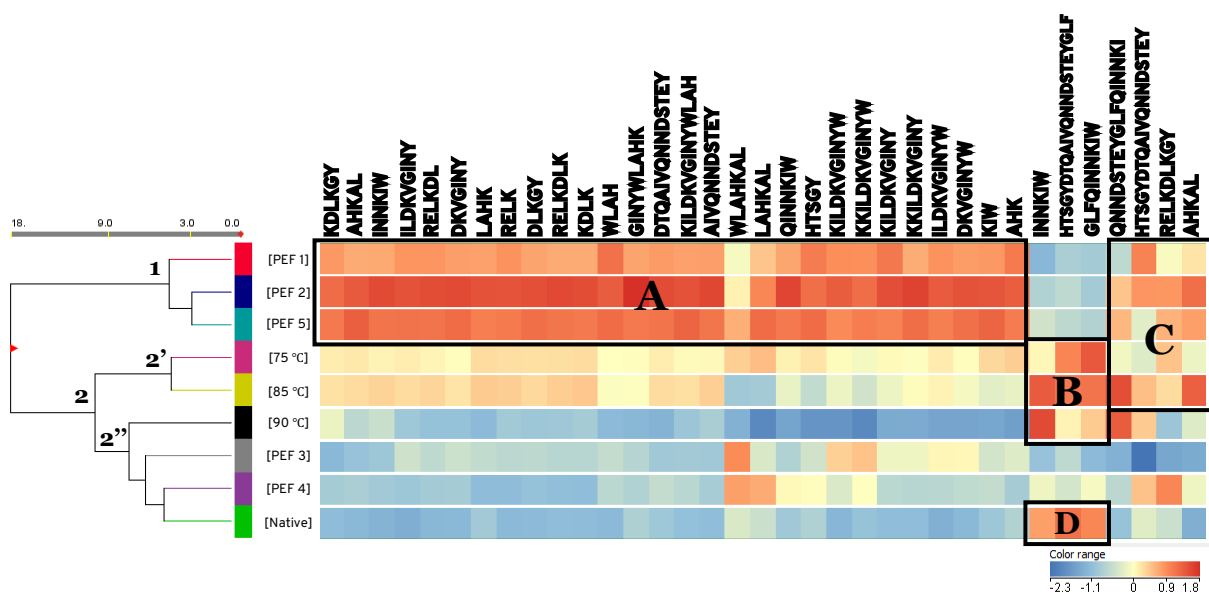


Figure 3.23. Hierarchical clustering of pretreatment conditions (native, thermal and PEF) and non-specific peptides obtained from chymotrypsin digestion, with similarities measured by Euclidean distance and displayed in a heat map. The color scale indicates the relative abundance of peptide ions: red represents up-regulation, while blue indicates down-regulation.

Two complementary peptide analysis approaches were then employed: a non-specific approach and a targeted approach focused on the specificity of α -chymotrypsin as digest reagent for matching with α -lac sequence. The first approach, covering approximately 45.53% of the total α -lac sequence (Figure 3.24, A), enabled the mapping of a broad diversity of peptides. The targeted approach, in turn, refined the analysis by identifying 8 specific peptides covering 30.89% of the total α -lac sequence (Figure 3.24 ,B). Firstly, the heat map

obtained from the non-specific approach revealed eight distinct peptide populations, identified by their Euclidean distance in the left-hand part of Figure 3.23.

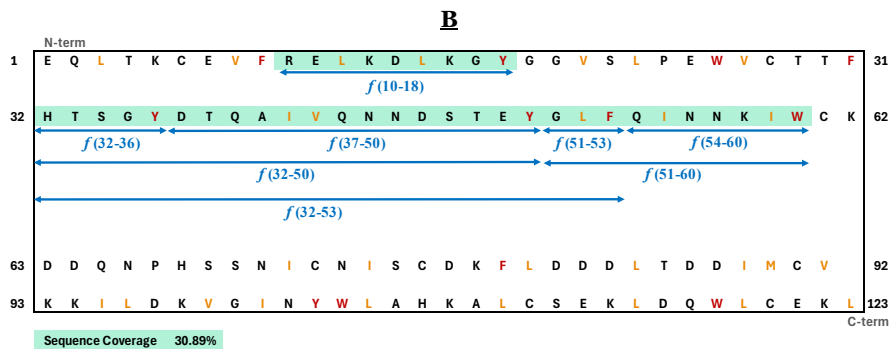
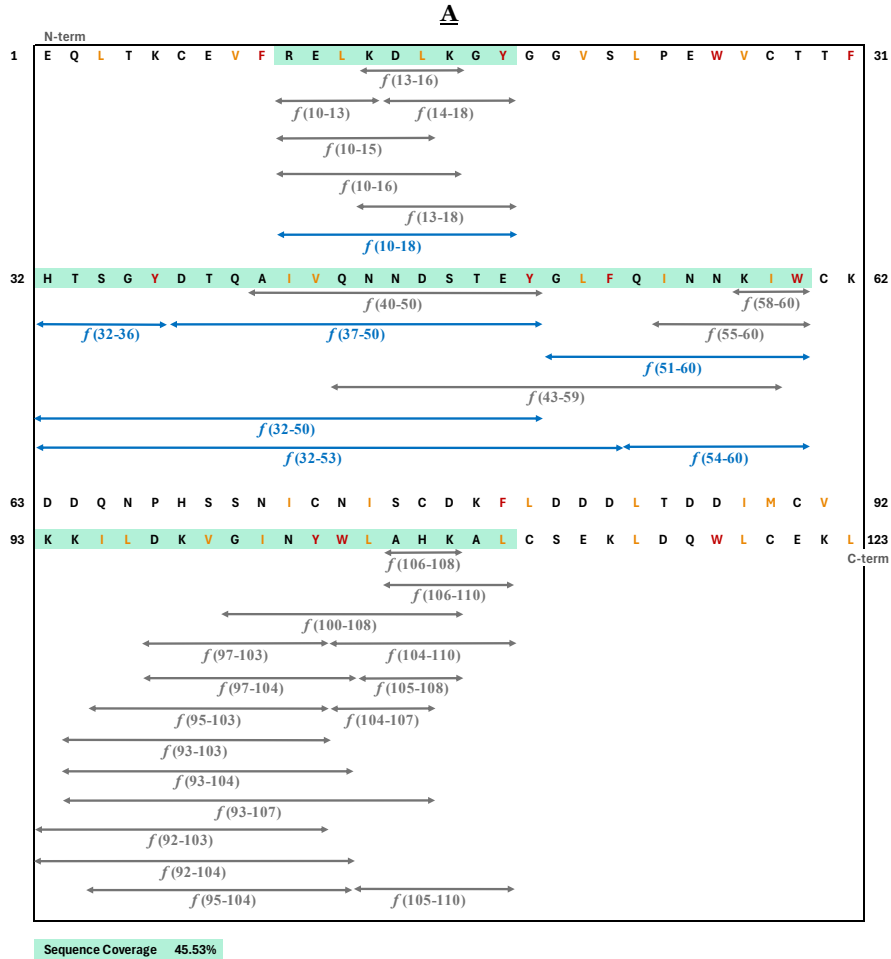


Figure 3.24. Comparison of peptide coverage and α -lac cleavage sites without (A) and with (B) specific α -chymotrypsin selectivity. The letters represent the 123 amino acids of α -lac.

The numbers on the left and right indicate the position of the amino acids in the α -lac sequence. Letters in red represent primary α -chymotrypsin cleavage targets, while letters in orange represent secondary α -chymotrypsin cleavage targets. Arrows indicate peptides, with blue arrows representing peptides identified with specific α -chymotrypsin selectivity, and grey arrows representing peptides obtained without specific α -chymotrypsin selectivity.

Green highlighting represents sequence coverage of α -lac.

The native α -lac sample, present at the bottom of the heat map, was positioned in subgroup 2", where conditions associated with low overall peptide abundance were clustered. The predominance of down-regulation (blue areas) observed for this sample suggested the low activity of α -chymotrypsin. This low enzyme activity could be attributed to the compact structure of the native α -lac and the inaccessibility of cleavage sites specific to α -chymotrypsin action, as previously confirmed by low surface hydrophobicity and the absence of accessible -SH groups. These sites only become accessible after treatments that modify the protein structure, such as heating or PEF. These results are consistent with DH data, which indicated a low DH for native samples. Under the effect of PEF pretreatments, peptide hydrolysates showed significant heterogeneous variations, with regions of up-regulation (in red) and others down-regulation (in blue), depending on the electric field strength and the number of pulses applied, possibly indicating structural modifications of α -lac, affecting the accessibility of cleavage sites by α -chymotrypsin and DH. PEF conditions 1 (10 kV/cm, 75 pulses), PEF 2 (15 kV/cm, 75 pulses), and PEF 5 (20 kV/cm, 37 pulses) clustered in Group 1, characterized by an overall higher peptide abundance (Box A) and marked up-regulation. These conditions, characterized by a high electric field strength (PEF 5) or an increased number of pulses (PEF 1 and 2), promoted better accessibility to enzymatic cleavage sites, thereby enhancing hydrolysis efficiency, which is consistent with previous analyses, particularly in terms of surface hydrophobicity, accessible -SH group concentration, circular dichroism (CD) analysis and DH. In contrast, PEF conditions 3 (10 kV/cm, 37 pulses) and PEF 4 (15 kV/cm, 37 pulses) showed mainly down-regulation for the same peptides, suggesting that more moderate PEF parameters, especially reduced number of pulses, could have a lower impact on pretreated protein structure and peptide generation. These results are in line with CD and DH analyses, which showed minimal α -lac secondary structure modification for PEF 3 and 4 and a DH close to that of the native sample. Additionally, boxes A and C showed peptides with similar up-regulation under PEF conditions 1, 2, and 5, as well as under thermal treatments at 75 °C and 85 °C, suggesting similar mechanisms involving moderate and partial denaturation of α -lac, increasing the accessibility of the cleavage site for α -chymotrypsin. These observations are in line with previous results, where these PEF and thermal conditions resulted in a 2- to 4-fold increase in the DH of the final hydrolysates compared with native α -lac. As with PEF, the peptide hydrolysates obtained

under certain thermal pretreatments showed heterogeneous variations, with regions of up-regulation (in red) and others of down-regulation (in blue). This heterogeneity probably reflects differing degrees of structural modification of α -lac, influencing the accessibility of cleavage sites depending on the applied temperature. For instance, a group of similar peptides (Box B) showed up-regulation across the three tested temperatures (75 °C, 85 °C, and 90 °C), while other peptides displayed variations, explaining why the pretreatments at 75 °C and 85 °C, which were close in Euclidean distance, formed subgroup 2', whereas the 90 °C treatment, further away, grouped in subgroup 2". The 90 °C treatment showed a predominance of down-regulated peptides compared to the 75 °C and 85 °C treatments, consistent with previously obtained results. This can be explained by the lower increase in surface hydrophobicity for the 90 °C treated sample compared to the 75 °C treated one. Additionally, the concentration of accessible -SH groups at 90 °C was twice as high as at 75 °C, increasing the risk of reaggregation. CD analyses also revealed a less marked structural modifications, with weaker alteration of α -helix and β -sheet components compared to the samples treated at 75 °C and 85 °C. Finally, the DH observed for the 90 °C treatment was similar to that of the native sample. In comparison, the DH of the samples treated at 75 °C and 85 °C was increased by 4-fold and 2-fold, respectively.

Finally, heat treatments at 75°C and 85°C (cluster 2') were close in Euclidean distance to cluster 1 (PEF 1, 2 and 5). Even though these thermal and PEF pretreatments showed similarities in peptide profiles due to partial α -lac denaturation and increasing enzymatic accessibility, they also exhibited differences. For example, peptides in Boxes B and D were down-regulated under PEF conditions, in contrast to their up-regulation under native and thermal conditions. This suggests that, although these PEF and thermal pretreatments expose α -lac cleavage sites, the nature and extent of the structural modifications they induced differed, influencing the final composition of the hydrolysates produced. Secondly, figure 7 shows the comparison of peptide coverage and α -lac cleavage sites specific or non-specific to α -chymotrypsin selectivity. Some segments, such as $f(32-50)$, $f(32-53)$, and $f(51-60)$, were hydrolyzed specifically or non-specifically by chymotrypsin, suggesting that certain regions of the α -lac were particularly exposed and frequently underwent hydrolysis. In contrast, the marked absence of fragments in the region of amino acids 61 to 92 of α -lac revealed a strong resistance to hydrolysis, likely due to structural characteristics specific to this region.

Several hypotheses may explain this resistance. First, the presence of stabilizing disulfide bonds ($^{61}\text{Cys-Cys}^{77}$ and $^{73}\text{Cys-Cys}^{91}$) could play a crucial role (Permyakov, 2020). According to the secondary structure of α -lac (Figure 3.25) (Farrell et al., 2002; T. Li et al., 2022), these bonds are in a region composed of α -helices and compact loops that may confer a rigid conformation, limiting enzyme accessibility.

Second, the domain structure of α -lac, with a deep cleft between the α and β domains held together by these same disulfide bonds, could hinder chymotrypsin access in this region. This might make this area particularly resistant to the effects of heat and PEF. Finally, the Cys^{111} and Cys^{120} residues, located in the α domain, have been characterized as highly reactive to denaturing treatments, especially to heat and oxidation (Stănciuc & Răpeanu, 2010), which may be induced by PEF. This reactivity could preferentially lead to the rupture of the $^{6}\text{Cys-Cys}^{120}$ and $^{28}\text{Cys-Cys}^{111}$ disulfide bonds, thereby modifying the secondary structure and facilitating the release of peptides in these areas, rather than affecting the stronger disulfide bonds.

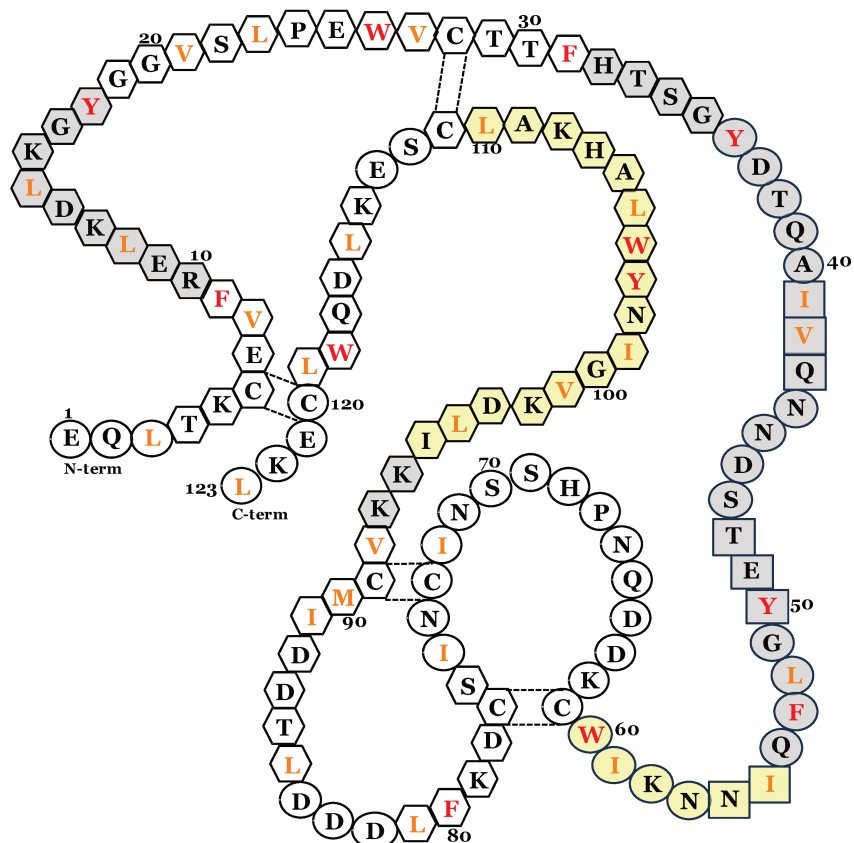


Figure 3.25. Schematic representation of α -lac's secondary structure, adapted from Farrell et al. (2002) and Li et al. (2022). Amino acids in red represent primary targets of chymotrypsin, while those in orange indicate secondary targets. Amino acids in hexagons correspond to alpha helices, those in squares to beta sheets, and those in circles to loops. Amino acids highlighted in yellow indicate bioactive or potentially bioactive peptides, while those highlighted in grey represent peptides identified without bioactivity.

3.7.5.2. Screening for antihypertensive and antidiabetic peptides

The screening of antihypertensive and antidiabetic activities is listed in Table 3.3.

Table 3.3. Comprehensive screening of referenced and potentially bioactive peptides.

Antihypertensive sequences		Antidiabetic sequences	
Peptide Sequences Referenced in the Literature	Potentially Active Peptide Sequence	Peptide Sequences Referenced in the Literature	Potentially Active Peptide Sequence
DKVGINY	AHK	ILDKVGINY	AHKAL
DKVGINYW	AHKAL	WLAHKAL	INNKIW
GINYWLAHK	LAHK		LAHK
LAHKAL	WLAH		LAHKAL
	WLAHKAL		

The analysis of antihypertensive and antidiabetic peptides revealed that the most intense PEF conditions, combining a high electric field strength and an increased number of pulses, promoted an increased abundance of these specific peptides (Figure 3.26).

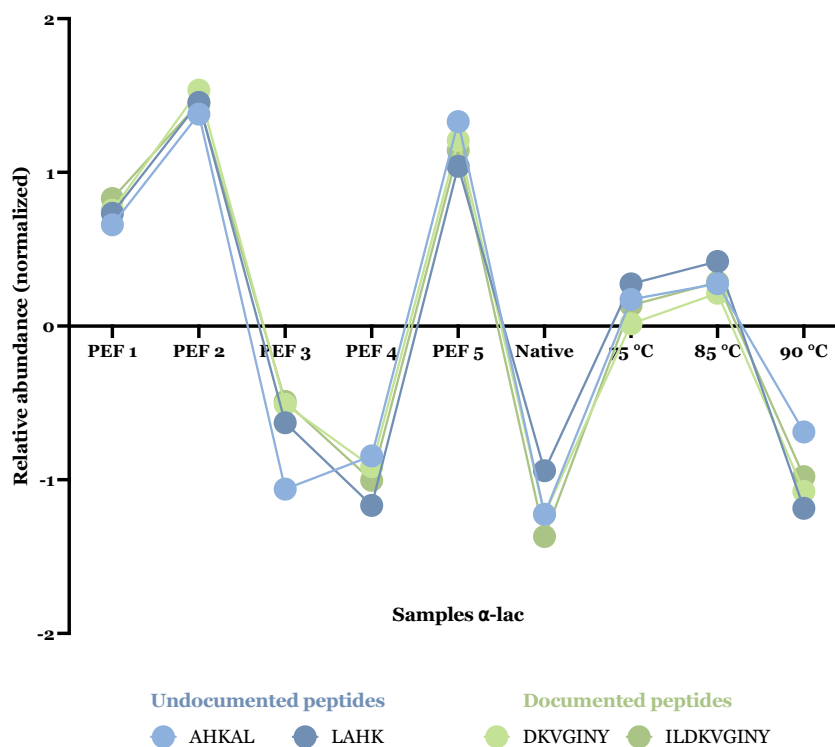


Figure 3.26. Normalized relative abundance of undocumented potential antihypertensive and antidiabetic peptides across experimental conditions, highlighting distinct variations compared to documented peptides.

Specifically, PEF conditions 1 (10 kV/cm, 75 pulses), 2 (15 kV/cm, 75 pulses), and 5 (20 kV/cm, 37 pulses) led to the generation of peptides having average abundances 169% to 232%, higher than peptides generated from the native α -lac. Conversely, less intense conditions (PEF 3: 10 kV/cm, 37 pulses and PEF 4: 15 kV/cm, 37 pulses) showed lower relative abundances than native α -lac (71% and 62%), indicating their limited effectiveness in generating these peptides. These results highlighted the beneficial effect of field strength and pulse number adjustment on bioactive peptide production. These observations were corroborated by secondary structure analysis of α -lac, revealing that these peptides were primarily located within the α -helices of the protein (Figure 8). Furthermore, these generated bioactive peptides were associated with the preferred cleavage sites of α -chymotrypsin, particularly around the amino acids leucine, tyrosine, and tryptophan. This reinforced the hypothesis that these residues played a key role in the release of peptides under intense PEF conditions, which appear to not only promote protein hydrolysis but also facilitate the release of bioactive peptides in quantities exceeding those obtained with thermal treatments. Regarding thermal treatments, a similar trend was observed. At 75 °C, an average peptide abundance of 128.2% was observed, but this dropped to 69.8% at 85 °C and further plummeted to -52.5% at 90 °C compared to the native state (Figures 6 and 9). These results indicate that, at such elevated temperatures, bioactive peptide production was significantly hindered due to excessive structural impact. In this sense, PEF treatments were considered preferable to thermal treatments for bioactive peptide production, as they enabled effective peptide release without causing excessive denaturation. Finally, two specific peptides – AHKAL and LAHK– were identified in the samples, with potential antihypertensive and antidiabetic bioactivities. These peptides are promising candidates as they are still undocumented in the literature. Figure 9 presents their relative abundances, shown as normalized values according to different experimental conditions, highlighting their marked differences with two examples of well-documented peptides (DKVGINY and ILDKVGINY) (Lacroix & Li-Chan, 2014a; Lacroix et al., 2016; N et al., 2022). One can observe that the peptides (AHKAL and LAHK) had abundances similar to the documented peptides (DKVGINY, ILDKVGINY) under all PEF conditions. Moreover, the highest relative abundances were observed for PEF 1, 2, and 5 pretreatment conditions, where they exceeded those observed under thermal conditions.

3.8. Conclusion and perspectives

This study demonstrates for the first time the effectiveness of PEF pretreatments in enhancing chymotryptic hydrolysis of α -lac. PEF pretreatments 1, 2, and 5 (10 kV/cm with 75 pulses, 15 kV/cm with 75 pulses, and 20 kV/cm with 37 pulses, respectively) doubled the DH compared to untreated α -lac, while PEF conditions 3 and 4 (10 and 15 kV/cm with 37 pulses) resulted in DH values close to that of the native protein. The electric field strength and pulse count were therefore crucial, with higher electric field strength and pulse numbers promoting increased DH due to the partial unfolding of α -lac facilitating α -chymotrypsin access to cleavage sites. These structural changes, including a decrease in α -helices, an increase in β -sheets (except for PEF 5), more accessible -SH groups, and increased surface hydrophobicity, led to greater abundance of bioactive peptides, particularly AHKAL and LAHK, with potential antihypertensive and antidiabetic activities as reported in the literature. To further enhance the PEF impact, additional research should refine PEF parameters by exploring pulse number, electric field strength, along with pulse width and shape. Thermal pretreatment at 75 °C achieved the highest DH, with a 4-fold increase compared to the native protein and a 1.5-fold increase over the best PEF conditions (1, 2 and 5). Although the 75 °C treatment achieved a high DH, its low production of bioactive peptides highlighted that this indicator alone is insufficient to evaluate overall yield. In contrast, PEF pretreatments, particularly PEF 1, combined comparable eco-efficiency with improved bioactive peptide generation through precise control of electric field strength and pulse number. Additionally, while thermal pretreatments at 75 and 85 °C induced moderate denaturation favorable for DH, the 90 °C treatment caused excessive denaturation, reducing both DH and bioactive peptide production. To strengthen the effectiveness and sustainability of this approach, further studies are needed to better understand the electrochemical modifications induced by PEF and the complex mechanisms that enhance peptide production. Finally, future research should focus on assessing the bioactivity of PEF-generated peptide hydrolysates both *in vitro* and *in vivo* to advance this technology for producing bioactive peptides in protein-rich food matrices.

Credit authorship contribution statement

Hélorie Clouzot: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Sergey Mikhaylin:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Rénato Froidevaux:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Jacinthe Thibodeau:** Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Laurent Bazinet:** Methodology, Validation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This research was funded by the University of Lille, France (European Metropolis of Lille and the Isite-ULNE within the framework of the Charles Viollette Industrial Chair) and Université Laval Québec, Canada (NSERC Discovery grant, RGPIN-2017-05970). Financial support of the Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF, Quebec, Canada) and the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT) is also acknowledged. The researchers would like to thank all participants for their time and their interest in the study.

4. Chapitre 4 - Application séquentielle de champs électriques pulsés et immobilisation covalente de chymotrypsine sur des particules d'alumine pour la production de peptides bioactifs aux propriétés antihypertensives et antidiabétiques à partir d'alpha-lactalbumine

4.1. Transition contextuelle

L'une des principales limitations de l'hydrolyse enzymatique par une enzyme libre réside dans son coût élevé, principalement dû à la consommation importante d'enzyme, dont l'usage unique empêche toute réutilisation. Cette contrainte justifie l'exploration de stratégies alternatives pour améliorer leur rentabilité et efficacité. À la lumière des résultats obtenus sur l'influence des CEP sur la structure de l' α -LA, son hydrolyse par l' α -CT libre et la production de peptides bioactifs, ainsi que des données issues de la littérature sur l'intérêt de l'immobilisation enzymatique, une approche basée sur l'immobilisation de l' α -CT a été développée. Cette stratégie vise à stabiliser l'enzyme et à permettre sa réutilisation pour des cycles successifs d'hydrolyse, réduisant ainsi la consommation enzymatique et les coûts associés. L' α -CT a été immobilisée par liaisons covalentes sur un support d'alumine et utilisée pour hydrolyser l' α -LA sous ses formes native et prétraitée (par chauffage ou CEP). L'impact de cette immobilisation sur la nature et le potentiel bioactif des hydrolysats a été comparé à celui des hydrolysats obtenus avec l' α -CT libre. De plus, la combinaison entre le prétraitement par CEP et l'utilisation d'une enzyme immobilisée a été explorée afin d'améliorer l'efficacité du processus et la production de peptides d'intérêt.

Étant donné qu'aucune étude antérieure n'a exploré l'approche combinée des CEP et de l'immobilisation enzymatique pour l'hydrolyse de l' α -LA, cette recherche a permis d'acquérir des connaissances approfondies sur les mécanismes sous-jacents à cette stratégie intégrée. Ainsi, ce chapitre répond aux objectifs spécifiques 2, 3 et 4.

4.2. Résumé

Dans le cadre de la valorisation des protéines agroalimentaires, le développement de stratégies durables pour la production de peptides bioactifs est essentiel. Cette étude évalue l'impact des champs électriques pulsés (CEP) en tant que prétraitement innovant de l' α -lactalbumine (α -LA), en comparaison avec des échantillons natifs et thermiquement traités (75 °C), avant une hydrolyse enzymatique réalisée à l'aide de l' α -chymotrypsine (α -CT) immobilisée sur des particules d'alumine via un procédé basé sur la dopamine.

L'enzyme immobilisée a montré une excellente efficacité d'immobilisation (96,6 %) et a conservé son activité enzymatique sur 10 cycles d'utilisation. Les réarrangements structuraux induits par les CEP ont permis une exposition sélective des sites de clivage, tandis que le traitement thermique, utilisé comme contrôle positif, a facilité l'accessibilité enzymatique par dénaturation des protéines. L'hydrolyse réalisée avec l' α -CT immobilisée a conduit à une population peptidique plus ciblée, avec une proportion accrue de peptides bioactifs potentiels, notamment aux effets antihypertenseur et antidiabétique.

Ces résultats mettent en évidence le rôle complémentaire des CEP et de l'immobilisation enzymatique dans la modulation de la production de peptides bioactifs, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour des applications durables et innovantes dans le traitement des protéines alimentaires.

4.3. Publication

Sequential application of pulsed electric fields and covalent immobilization of chymotrypsin on alumina particles for the production of bioactive peptides with antihypertensive and antidiabetic properties from alpha-lactalbumin

Hélorie Clouzot^{1,2,3}, Jacinthe Thibodeau^{2,3,4}, Laurent Bazinet^{2,3,4}, Renato Froidevaux^{1,3}, Sergey Mikhaylin^{2,3}

¹ UMR Transfrontalière 1158 BioEcoAgro, Lille University, INRAe, Liège University, UPJV, JUNIA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV—Institut Charles Viollette, 59000 Lille, France.

² EcoFoodLab, Food Science Department, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec, QC, Canada

³ International Associated Laboratory in Bioproduction of Natural Antimicrobials (LIAAN), Laval University, Lille University

⁴ Laboratoire de Transformation Alimentaire et Procédés Électromembranaires (LTAPEM, Laboratory of Food Processing and Electro-Membrane Processes), Food Science Department, Laval University, Quebec, QC, Canada

4.4. Abstract

In the context of valorizing agro-food proteins, developing sustainable strategies for bioactive peptide production is essential. This study investigates the impact of pulsed electric fields (PEF) as an innovative pretreatment of α -lactalbumin (α -LA), in comparison with native and thermally treated samples (75 °C), prior to enzymatic hydrolysis using α -chymotrypsin (α -CT) immobilized on alumina particles via a dopamine-based process.

The immobilized enzyme exhibited excellent immobilization efficiency (96.6%) and retained its enzymatic activity over 10 usage cycles. PEF-induced structural rearrangements in α -LA selectively exposed cleavage sites, while thermal treatment, used as a positive control, facilitated enzyme accessibility through protein denaturation. The hydrolysis with immobilized α -CT generated a more targeted peptide population, with an increased proportion of potentially bioactive peptides, notably antihypertensive and antidiabetic ones. These findings underscore the complementary roles of PEF and enzymatic immobilization in modulating bioactive peptide production, offering promising prospects for sustainable and innovative applications in food protein processing.

Keywords: chymotrypsin, immobilization, enzymatic hydrolysis, pulsed electric fields, bioactive peptides

4.5. Introduction

Bioactive peptides are attracting increasing interest due to their multiple health benefits. Derived from food proteins, these peptides have various applications in the food and pharmaceutical industries because of their ability to modulate diverse pathophysiological processes (Patil, 2024). The global market for bioactive proteins and peptides has experienced significant growth in recent years, with projections reaching \$88.3 billion by 2027 (Market Research Report, 2020). However, their production through enzymatic hydrolysis faces challenges such as enzyme specificity, stability, and low yields (Santos et al., 2024). These limitations are particularly critical for complex proteins like alpha-

lactalbumin (α -LA), a globular whey protein well-known for releasing bioactive peptides with antihypertensive and antidiabetic properties (Lacroix & Li-Chan, 2014; Nongonierma et al., 2016; Gao et al., 2020; Xie et al., 2022; Alba et al., 2022). To address these challenges, enzymatic immobilization offers a promising solution. This technique enhances enzyme stability, specificity, and recyclability while reducing costs (Wu et al., 2015; Mazzocato & Jacquier, 2024). In particular, covalent immobilization, which ensures the long-term attachment of the enzyme to a solid support, is especially suitable for hydrolyzing large substrates such as food proteins (Wahab et al., 2020). Using a spacer arm, such as glutaraldehyde (GA) or dopamine (DOP), minimizes diffusion and steric constraints, facilitating access of enzyme active sites to their substrates (Siddiqui & Husain, 2019; Xie et al., 2021; Gonawan et al., 2022; Alfieri et al., 2022; Carballares et al., 2024). While GA is recognized for its effectiveness in stabilizing enzymes, its toxicity limits its application in food industries (ATSDR, 2017). DOP is a recent and biocompatible alternative better suited to meet food safety standards (Kaushik et al., 2015). In addition to its biocompatibility, DOP has been successfully used for enzyme immobilization, forming strong adhesive layers that enhance the stability and activity of enzymes such as chymotrypsin, α -amylase, alkalase and laccase (Bayramoglu et al., 2020; Cao et al., 2018; Mehrabi et al., 2024; X. Wang et al., 2024). These properties make them a promising alternative for food-related enzyme applications. Beyond the choice of cross-linking agents, the nature of the solid support plays a crucial role in enzyme performance. Various materials, including silica, magnetic nanoparticles and polymeric matrices, have been investigated for enzyme immobilization, each offering distinct advantages in terms of stability, reusability and interaction with substrates (Bayón et al., 2018; D. Wang & Jiang, 2019; Yushkova et al., 2019; Wahab et al., 2020). Among them, alumina particles stand out as an effective support due to their high specific surface area, which provides numerous anchoring sites for enzymes, improving their catalytic efficiency and longevity (Heilmann et al., 2003; Wahab et al., 2020). In addition, its chemical properties promote strong interactions with the enzyme and substrate, enhancing hydrolysis efficiency (Pourmadadi et al., 2022). These characteristics make alumina particularly well suited to enzymatic applications in food protein processing, including the production of bioactive peptides. Additionally, pulsed electric fields (PEF) have emerged as an innovative technology to enhance food protein hydrolysis. Specific PEF parameters can

alter protein structures, increasing the exposure of cleavage sites to enzymes. The extent of these structural modifications, ranging from subtle rearrangements to partial denaturation, depends on the applied PEF conditions (Giteru et al., 2018; Hu et al., 2024 ; Hélorie, article 1). The pretreatment conditions used in this study were selected based on a previous investigation (Hélorie, previous article), providing a well-established approach to enhancing enzymatic hydrolysis. Studies on α -LA and other proteins, such as β -lactoglobulin, beef muscle proteins, and ovalbumin, have shown that PEF application can improve the yield of bioactive peptides (Mikhaylin et al., 2017; Liu et al., 2018; Chian et al., 2019; Agoua et al., 2020 ; Hélorie, article 1). However, despite their potential, the combination of PEF with enzymatic immobilization in food protein hydrolysis remains unexplored, paving the way for a promising combined approach. To establish a solid foundation for this innovative strategy, this study focuses on α -LA, a well-characterized model protein, which provides a controlled system to evaluate the impact of PEF and enzymatic immobilization. The insights gained from this work could be extended to more complex protein systems, broadening the applicability of this approach in food protein hydrolysis. Building on this rationale, this study combines PEF and enzymatic immobilization for the first time to improve the production of bioactive peptides from α -LA. This protein has been widely studied for its ability to generate bioactive peptides through enzymatic hydrolysis (Carullo et al., 2020; Ismail et al., 2020). These peptides have been associated with a range of biological activities, including antihypertensive, antioxidant, antidiabetic, anticancer, opioid, mineral-chelating, and antimicrobial properties (Olvera-Rosales et al., 2023; Singh & Gaur, 2024), making α -LA a relevant protein for bioactive peptide research. Chymotrypsin, an enzyme specific to aromatic residues such as tyrosine, phenylalanine, and tryptophan, frequently associated with bioactive peptide properties (Toldrá et al., 2020), was immobilized on alumina particles. This support is distinguished by its high specific surface area and optimal interaction with the substrate, enhancing enzymatic efficiency (Kujawa, Głodek, Li, et al., 2021). Hence, this study has two main objectives. The first is to compare the stability and activity of the immobilized enzyme using two different cross-linking agents: GA and DOP. The agent demonstrating the best performance was then selected for the second objective, which involves combining PEF with enzymatic hydrolysis performed using the immobilized chymotrypsin.

4.6. Materials and Methods

4.6.1. Materials

α -LA powder (92 % protein content, was obtained from Agropur Inc. US (Eden Prairie, MN). The following products were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO): bovine α -chymotrypsin type II (C4129), aluminum oxide (alumina, 1.01077), toluene (5. 89578), chlorotrimethylsilane (386529), 3-Aminopropyltriethoxysilane (440140), dopamine hydrochloride (H8502), glutaraldehyde (340855), Bradford's reagent (B6916), azocasein (A2765), trichloroacetic acid (1.00807). Water was purified using the Milli-Q system (Millipore, Burlington, NJ, USA).

4.6.2. Processing of α -LA: Pretreatment and hydrolysis with immobilized α -CT

The study protocol follows a structured sequence of steps (Figure 4.27).

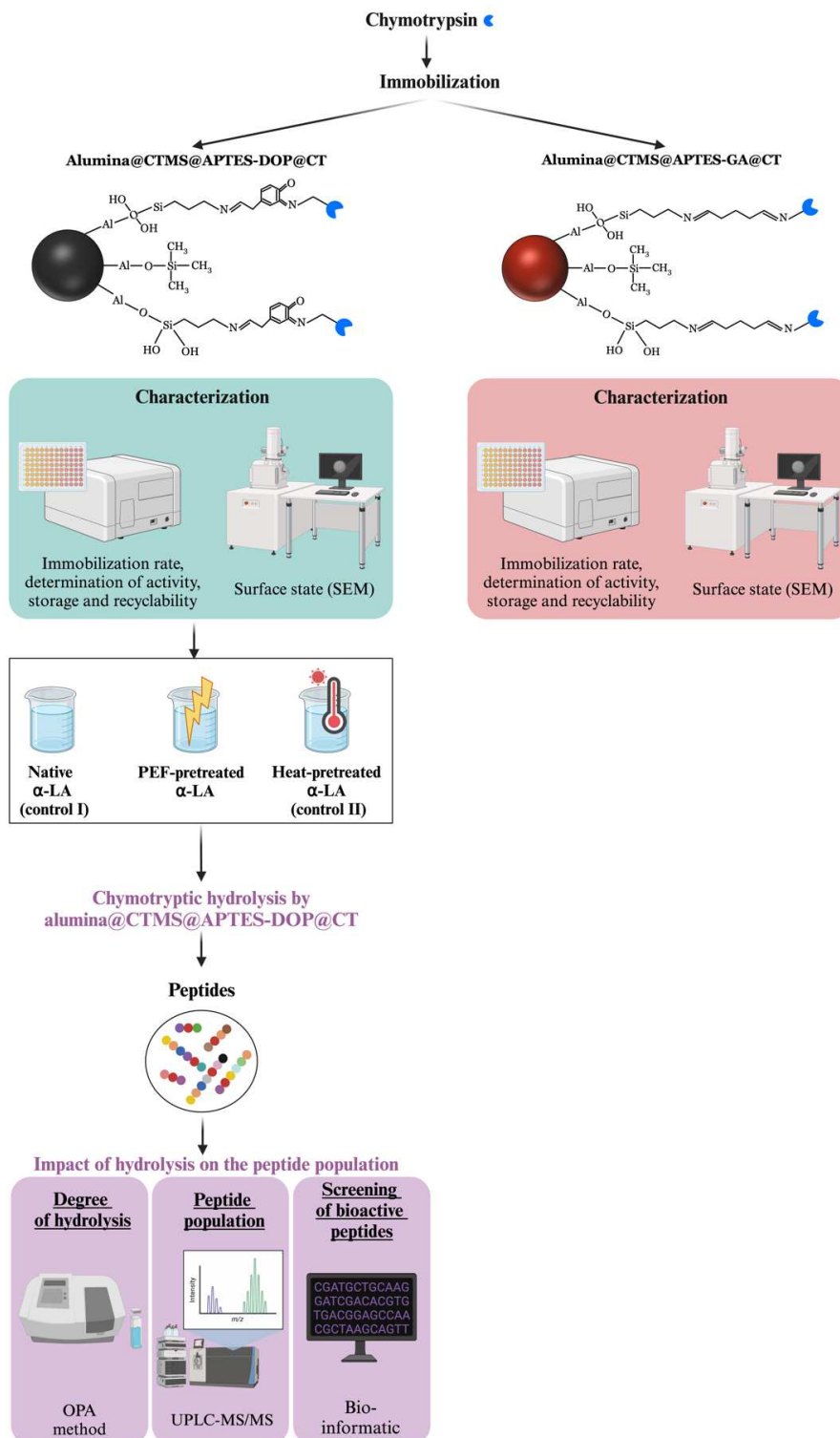


Figure 4.27. Process workflow for the characterization of immobilized chymotrypsin and its use in the enzymatic hydrolysis of pre-treated α -LA (native, heat- and PEF-pretreated).

4.6.2.1. α -Chymotrypsin immobilization protocol

α -Chymotrypsin (α -CT) was immobilized following the protocols established by Bayramoglu et al. (2020) et Decarpigny et al. (2022), with adjustments made to meet the specific needs of this study. Two cross-linking agents, GA and DOP, were evaluated to determine which provides the most effective immobilization.

4.6.2.1.1. Functionalization of alumina particles

The alumina was activated through surface functionalization. For this purpose, 50 mg of alumina were dispersed in 7 mL of toluene, followed by the addition of 35 mL of chlorotrimethylsilane (CTMS) and 24.4 mL of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). The mixture was refluxed at 100 °C for 24 h under agitation. After the reaction, the functionalized alumina was washed three times with toluene and one time with acetone by centrifugation (10,000 rpm, 10 min, 4 °C). The alumina@CTMS@APTES material was then dried under vacuum using a SpeedVac. This dual functionalization modified the surface of the alumina, making it suitable for subsequent immobilization of α -CT. Specifically, CTMS replaced the native hydroxyl groups with hydrophobic trimethylsilyl groups (-Si(CH₃)₃), reducing surface hydrophilicity, while APTES introduced amine groups (-NH₂) by reacting either with the remaining hydroxyl groups or with the CTMS-modified sites via siloxane (Si-O) bonds (Nayak et al., 2019; Zhang & Lai, 2022). These modifications facilitated the covalent immobilization of α -CT onto the functionalized alumina using two distinct strategies. The enzyme was immobilized on alumina functionalized either with DOP or GA, ensuring stable attachment and enhanced catalytic efficiency (Figure 4.28).

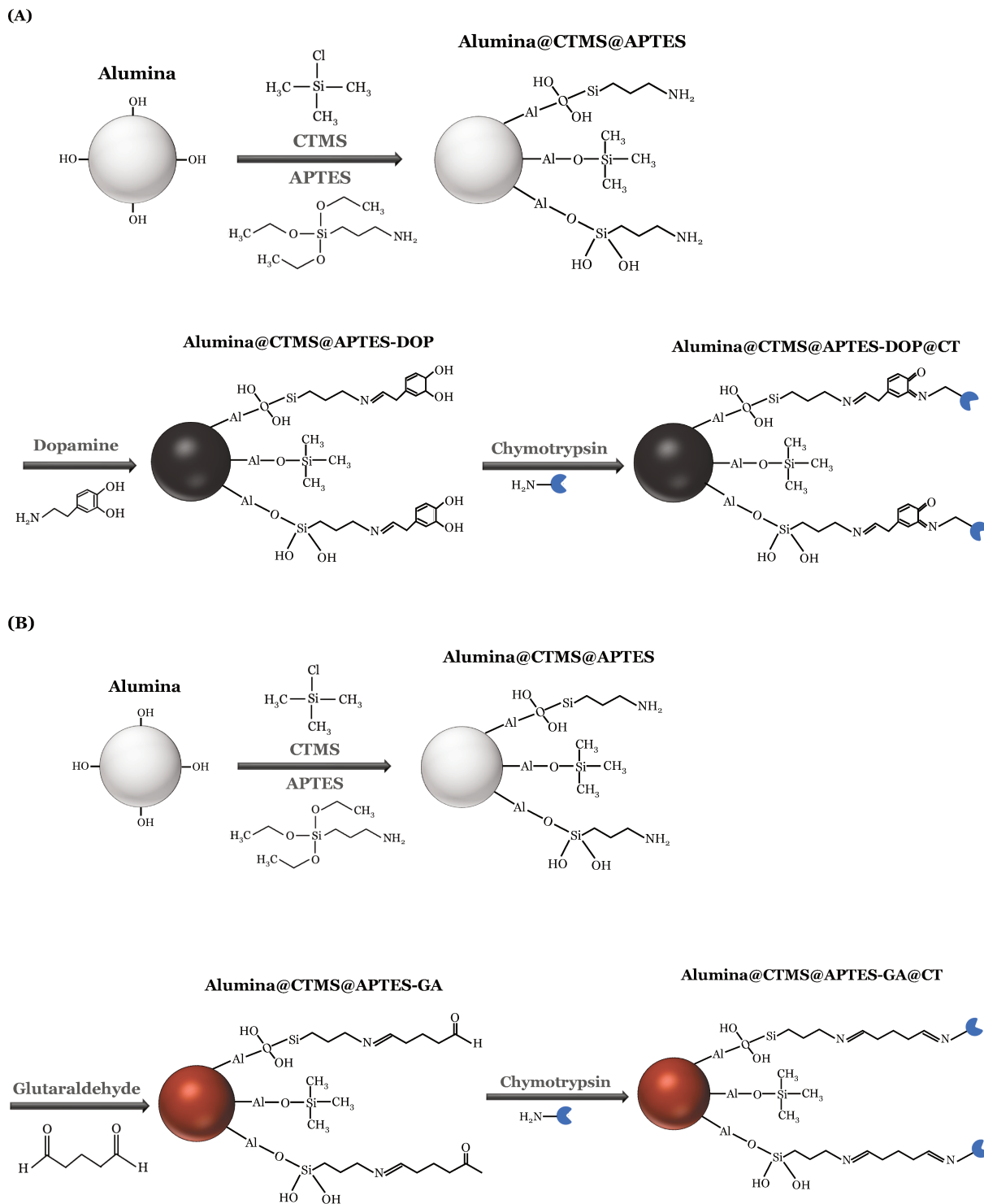


Figure 4.28. Schematic representation of the immobilized α -CT production steps, (A) using DOP and (B) using GA

4.6.2.1.2. Chemical activation of the support

Two immobilization methods were implemented to compare their effectiveness in binding, stabilizing, and maximizing the catalytic activity of α -CT.

4.6.2.1.2.1. Covalent bonding with GA

GA (77 μ L) was added to 50 mg of alumina@CTMS@APTES material, previously dispersed in 1.5 mL of phosphate buffer (pH 9, 0.1 M). At this pH, the amine groups of APTES are deprotonated, increasing their nucleophilicity and making them more reactive for forming covalent bonds with GA (Figure 2, B). The buffer concentration ensured sufficient buffering capacity to maintain a stable pH throughout the reaction, thus providing optimal conditions for chemical bonding. The mixture was stirred for 10 h at room temperature. Following the reaction, four successive washing cycles (three with water and one with ethanol) were carried out by centrifugation (10,000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C), and the material was vacuum-dried under the same conditions as carried out for functionalization.

4.6.2.1.2.2. DOP grafting

DOP (77 μ L, 8 mg/mL in absolute ethanol) was added to 50 mg of alumina@CTMS@APTES material, previously dispersed in 1.5 mL of phosphate buffer (pH 9, 0.1 M) (Figure 2, A) (Bayramoglu et al., 2020). The mixture was stirred for 25 h at 50 $^{\circ}$ C. After the reaction, four successive washing cycles (three with water and one with ethanol) were performed by centrifugation, and the material was vacuum-dried under the same conditions as previously.

4.6.2.1.3. Immobilization of α -CT

A total of 25 mg of functionalized material, either alumina@CTMS@APTES-GA or alumina@CTMS@APTES-PDA, was dispersed in 2 mL of phosphate buffer (pH 9, 0.1 M). Then, 10 mg of α -CT was added to the mixture. The suspension was stirred for 4 h in a cold bath (4°C). The solid (pellet corresponding to the immobilized chymotrypsin) as recovered by centrifugation (10,000 rpm, 10 min, 4 °C), followed by three successive washes with water and one with ethanol. After washing, the pellet corresponding to the immobilized chymotrypsin was vacuum-dried and stored at 4°C. It should be noted that each washing fraction was recovered and kept frozen to later determine the enzyme immobilization rate using the Bradford method.

4.6.2.2. α -LA pretreatment strategy and enzymatic hydrolysis protocol

4.6.2.2.1. PEF system configuration

The PEF system, supplied by Diversified Technologies Inc. (Bedford, MA, USA), was previously described and illustrated by Hélorie (previous article). Briefly, it consists of a treatment chamber and a modulation cabinet. The system specifications include a maximum electric field strength of 30 kV/cm and a maximal pulse generator frequency of 1,400 Hz, with conductivity and temperature limits of 7.5 mS/cm and 30 °C, respectively. Square pulses ranging from 1 to 12 μ s can delivered through three stainless steel electrodes (one high-voltage and two grounded low-voltage) within the chamber, which also contains two ceramic insulators. The solution was introduced into the chamber via a peristaltic pump, with adjustable flow rates from 0.5 to 8 L/min for high-voltage pulse application.

4.6.2.2.2. Selection of pretreatment conditions for α -LA: native state, thermal and PEF

A 1% w/v solution of α -LA was prepared in ultrapure water adjusted to pH 7.8 (optimal pH of the enzyme). An untreated sample served as a negative control, preserving the native structure of the protein (1% w/v, pH 7.8). In parallel, a thermal pretreatment was applied as a positive control. This pretreatment involved raising the temperature to 75°C for 5 min in a water bath, followed by rapid cooling to 37°C before the enzymatic hydrolysis step. This temperature was selected based on a previous study, as it promotes moderate denaturation of α -LA, facilitating access to enzymatic hydrolysis sites while limiting major structural modifications associated with higher temperatures (Hélorie, article 1). The PEF pretreatment protocol was defined according to the same prior study (Hélorie, article 1). Two experimental conditions were identified as particularly effective: an electric field strength of 15 kV/cm with 75 pulses and a second configuration at 20 kV/cm with 37 pulses. These parameters were selected for their ability to induce a partial alteration of α -LA structure, thereby improving the accessibility of cleavage sites for α -CT and overall hydrolysis performance. Also, these pretreatments were chosen for their ability to enhance the release of bioactive peptides, serving as the basis for comparison between hydrolysates obtained with free and immobilized α -CT.

While the samples obtained with immobilized α -CT (alumina@CTMS@APTES-DOP@CT) exhibited a DH similar to those produced with free α -CT, the impact of immobilization on the production and diversity of bioactive peptide hydrolysates remains to be explored, which is the objective of this comparative study.

4.6.2.2.3. Chymotryptic hydrolysis of α -LA by immobilized α -CT

Enzymatic hydrolysis using the immobilized enzyme was conducted following a protocol adapted from Hélorie (article1). Briefly, α -lac (1% w/v, pH 7.8)—either native, thermally pretreated, or pretreated with PEF—was incubated in a water bath at 37 °C. Hydrolysis was initiated by adding immobilized α -CT (alumina@CTMS@APTES-PDA@CT) at 1% w/w.

The temperature (37 °C) and pH (7.8, adjusted with 0.1 M NaOH) were maintained constant throughout the reaction. Samples were collected and the hydrolysis process was stopped at each time point by heating the solution to 90 °C for 10 min to inactivate the enzyme. The DH was determined based on a previous study conducted by Hélorie (article 1), which identified the conditions for maximizing DH during the hydrolysis of α -LAC with free α -CT. To account for the generally slower kinetics of immobilized enzymes, the hydrolysis time was adjusted and extended as needed to reach the same target DH. This approach ensured a consistent evaluation of the effects of immobilization on peptide production, eliminating any variability attributable to differences in DH.

4.6.3. Characterization of alumina-supported immobilized enzyme and the resulting hydrolysates from pretreated and untreated α -LA

4.6.3.1. Characterization of alumina-supported immobilized enzyme

4.6.3.1.1. Immobilization efficiency

The amount of enzyme immobilized on the alumina particles was determined by measuring the residual protein concentration in the washing fractions using the Bradford method, adapted from Decarpigny et al. (2022). Samples were added at 100 μ L per well, along with 100 μ L of Bradford reagent, and the plate was shaken for 30 seconds. After a 10-min incubation at room temperature, the absorbance was read at 595 nm. A calibration curve was established by measuring the absorbance at 595 nm corresponding to the anionic blue form of Coomassie Brilliant Blue G-250 bound to bovine serum albumin (BSA), with concentrations ranging from 0 to 50 μ g/mL. Standards were prepared and analyzed in the same manner as the samples. The enzyme immobilization rate was then calculated in the following equation 4.12:

$$\text{Immobilization rate (\%)} = \frac{m - (C_1 \times V_1)}{m} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.12})$$

Where m is the mass of enzyme (μg), C_1 the concentration found on the calibration line and V_1 the total volume of wash water (mL).

4.6.3.1.2. Surface state of alumina particles

The surface state of the alumina particles was characterized by scanning electron microscopy (SEM) using an ULTRA 55 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). This equipment was equipped with a thermal field emission source and three detectors: an Energy-Selective Backscattered (ESB) detector with a filtering grid, a high-efficiency in-lens Secondary Electron (SE) detector, and an Everhart-Thornley secondary electron detector. It also included an energy-dispersive X-ray analysis device (EDX analysis) (EDS Xflash 4010 system, Bruker, United States). The samples were prepared by dispersing the particles in ethanol before depositing them on a silicon substrate. Images were then acquired and analyzed using the manufacturer's software (Zeiss, Oberkochen, Germany).

4.6.3.1.3. Determination of free and immobilized α -CT activities

α -CT activity was measured using a modified version of Souza et al. (2015) method, with azocasein (AZO, 2%, w/v) as the substrate. A solution of AZO (0.5 mL) was prepared in glass tubes and heated to 40°C for 5 min. Free α -CT was diluted in a phosphate buffer (pH 7, 100 mM) to a concentration of 0.25 mg/mL. After preheating at 40 °C for 5 min, 0.5 mL of enzyme solution was added to 0.5 mL of AZO solution, briefly vortexed for 30 s, and incubated at 40 °C for 10 min to allow substrate digestion. The reaction was stopped by adding 3 mL of trichloroacetic acid (TCA, 5%, w/v), followed by centrifugation (10,000 rpm, 4 °C) for 8 min to remove undigested proteins. A blank control was prepared by adding TCA before the α -CT. For α -CT immobilized on alumina particles (modified by GA or DOP), an identical protocol was followed, adjusting the enzyme concentration to 0.5 mg/mL to achieve optimal absorbance. α -CT activity was determined by measuring absorbance at 440 nm, and results were expressed in specific activity (U/mg protein), enabling direct comparison

between free and immobilized enzyme forms. Specific activity was calculated using the equation 4.13:

$$\text{Specific activity (U/mg)} = \frac{\text{Total enzyme activity (UA/min)}}{\text{Total protein quantity (mg)}} \quad (\text{Eq. 4.13})$$

Where one unit of activity (1 UA) corresponds to the amount of enzyme required to produce a 0.01 increase in absorbance at 440 nm within 10 min under standard assay conditions.

4.6.3.1.4. Immobilized α -CT storage stability study

The storage stability of the immobilized α -CT (GA and DOP) was evaluated by storing them in water at 4 °C for 5 weeks. The residual activity, expressed as a percentage, was measured weekly according to the α -CT activity protocol. This percentage was calculated using the equation 4.14:

$$\text{Residual activity (\%)} = \frac{\alpha\text{-CT immobilized activity (weekly measurement)(U/mg)}}{\text{CT immobilized activity (initial)(U/mg)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.14})$$

For comparison, the storage stability of the free α -CT was also studied under the same conditions, with its residual activity monitored until complete loss of activity.

4.6.3.1.5. Recyclability study of immobilized α -CT

The recyclability of immobilized α -CT was evaluated using only the form with the best performance in terms of enzymatic activity and storage stability (GA ou DOP). The immobilized α -CT was tested for repeated reuse over 10 cycles within the same day. After each enzymatic activity measurement, a wash was performed in phosphate buffer (pH 7, 100 mM) to remove substrate residues and colored precipitates. The immobilized α -CT particles were placed on an orbital shaker for 5 min to facilitate the detachment of precipitates without damaging the enzyme. Vacuum filtration was then performed using a Büchner funnel equipped with a glass frit filter of porosity grade 3. Two successive wash cycles were conducted with phosphate buffer, followed by two washes with ultrapure water to eliminate

all residual impurities. The immobilized α -CT was then reused for the enzymatic activity assay, and results were expressed as residual activity (%).

4.6.4. Characterization of α -LA Hydrolysis Catalyzed by Immobilized α -CT

4.6.4.1. DH measurement

The DH was measured using the *o*-phthaldialdehyde (OPA) method, following an adaptation of the protocol by Agoua et al. (2020). A calibration curve was prepared with an L-leucine solution (0 to 3 mM). The OPA reagent solution was composed of 25 mL of sodium tetraborate (100 mM), 2.5 mL of sodium dodecyl sulfate (SDS) at 20%, 40 mg of OPA dissolved in 1 mL of methanol, and 100 μ L of β -mercaptoethanol, then adjusted to 50 mL with distilled water. Measurements were taken at 340 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2700, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) by mixing 150 μ L of the sample (native, heat-pretreated, or PEF-pretreated α -lac) or 1% SDS (blank) with 3 mL of OPA reagent. The same protocol was applied to prepare the L-leucine standards. The DH, calculated by subtracting the concentration of free α -amino groups in native α -LA from that in the hydrolyzed samples, represented the average of three repetitions (Adler-Nissen, 1986).

4.6.4.2. Peptide population analysis by UPLC-MS/MS

4.6.4.2.1. Peptide sequences and relative abundances

The final peptide hydrolysates using immobilized α -CT (alumina@CTMS@APTES-PDA@CT), pretreated (heating and PEF) or native one, were analyzed by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) according to the method described by (Hélorie, previous article). Briefly, the analyses were performed on a UPLC 1290 Infinity II system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), using a Poroshell 120 EC-C18 column (2.1 \times 100 mm, 2.7 μ m, Agilent) and detection in positive

ionization mode on an IM-Q-TOF spectrometer (model 6560, Agilent, Santa Clara, CA, USA). The gradient and data acquisition parameters, as well as the calibration conditions, followed the specifications of Cournoyer et al. (2024). Peptide identification was based on the sequence of bovine α -LA (UniProtKB – P00711) via the Spectrum Mill MS Proteomics Workbench software (version B.06.00).

4.6.4.2.2. Screening of antihypertensive and antidiabetic potential of α -LA peptides

The bioactive potential of the final peptide hydrolysates produced using immobilized α -CT (alumina@CTMS@APTES-PDA@CT), from native or pretreated α -LA (via heating or PEF), was assessed through bioinformatics analysis and structural evaluation. Antihypertensive peptides were identified using the AHTPDB database based on their capacity to inhibit angiotensin-converting enzyme (ACE), while antidiabetic peptides were screened through the BioDADPep database for their inhibitory effects on dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). The structural and physicochemical characteristics of peptides were also evaluated to determine their bioactive potential. Antihypertensive peptides were identified as short sequences, comprising fewer than 20 amino acids with molecular weights below 3 kDa (Gallego et al., 2018a; Ichim et al., 2024). Key features included hydrophobic residues, such as proline, and charged amino acids, like glutamic acid, which facilitate interactions with the active sites of angiotensin-converting enzyme (Cheung et al., 1980; Abdelhedi et al., 2017; Chi et al., 2024). For antidiabetic peptides, optimal sequences ranged from 2 to 8 amino acids with molecular weights between 200 Da and 1 kDa (Mu et al., 2023). Hydrophobic residues at the N-terminus, such as leucine, isoleucine, and valine, played a crucial role, while the presence of proline in specific positions enhanced binding to dipeptidyl peptidase-IV (Lacroix & Li-Chan, 2014b). Furthermore, the peptides' net charge and hydrophobicity were essential in reinforcing their inhibitory properties (Zhang et al., 2016; Mu et al., 2023).

4.6.5. Statistical analysis

4.6.5.1. Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism version 9.5.1 (528) for macOS (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA, www.graphpad.com). A one-way linear ANOVA model was applied, followed by Tukey's test to compare all pairs of means between the treatment groups and identify significant differences at $P < 0.05$.

4.6.5.2. UPLC-MS/MS data treatment

The peptide ion abundances were statistically analyzed using Mass Profiler Professional software (version 15.1, Agilent Technologies). Only peptides with a 100% occurrence frequency were considered. A non-parametric Kruskal-Wallis test, suitable for data that do not meet the assumptions of normality or homogeneity of variances (Vargha & Delaney, 1998; Cournoyer et al., 2024), was applied to compare mean abundances across conditions. To minimize type I errors, p-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg method (FDR), with 10,000 permutations (Benjamini & Hochberg, 1995). A heatmap with hierarchical clustering were used to visualize peptide groupings and overall trends across experimental conditions, with values \log_2 -transformed to improve data normalization.

4.7. Results and Discussion

4.7.1. Characterization of modified alumina particles

The immobilized materials are visually confirmed through SEM images (Figure 4.29, B and C). The results revealed high immobilization rates for both strategies: $96.6 \pm 0.2\%$ for alumina@CTMS@APTES-DOP@CT and $95.3 \pm 0.1\%$ for alumina@CTMS@APTES-GA@CT. The superior immobilization rate for the DOP-based material highlights the efficiency of dopamine as a spacer arm, attributed to its unique chemical structure.

DOP, deposited under slightly alkaline conditions (pH 9), underwent spontaneous oxidative polymerization to form polydopamine (PDA), a black coating known for its strong adhesive properties (Figure 4.28, A) (Lee et al., 2007). This PDA layer contained quinone and imine functional groups that interacted with the amine groups of lysine amino acid or the thiol groups (-SH) of cysteine amino acid in α -CT, forming Schiff bases (-C=N) or covalent bonds (Bayramoglu et al., 2020). These interactions likely contributed to the higher immobilization rate by reducing steric hindrance and strengthening enzyme attachment to the support. In comparison, GA enabled immobilization via its aldehyde groups (-CHO), which reacted with the primary amines of lysines in α -CT to form Schiff bases (reddish color, Figure 4.28, B) (Olde Damink et al., 1995). However, the partial polymerization of GA during the process resulted in less homogeneous coverage, as confirmed by SEM images (Figure 4.29, E and F).

Morphological analysis revealed that unmodified alumina particles, with an average size of 9 μm , exhibited smooth and homogeneous surface, typical of unmodified materials (Figure 4.29, A and D). After immobilization, the particle size significantly increased (tenfold), reaching 101.8 μm for DOP-treated particles and 98.2 μm for GA-treated particles. This increase, along with the increased surface roughness, indicates efficient enzyme deposition for both strategies. However, DOP-treated particles showed more homogeneous and regular coverage (Figure 4.29, E) compared to the less uniform deposits observed on GA-immobilized particles, which displayed partially exposed areas (Figure 4.29, F). These differences support the hypothesis that DOP polymerization and its strong adhesion promote more consistent interactions between α -CT and alumina, thereby improving immobilization efficiency.

Previous studies reported variable immobilization rates depending on the methods used: 94% via covalent cross-linking with GA (Ghafourifar et al., 2013) and 95–96% through adsorption onto alumina (Pugnière et al., 1988; Coletti-Previero & Previero, 1989). While some research has explored the use of DOP on hybrid biocompatible supports (Bayramoglu et al., 2020), specific immobilization rates for α -CT were not provided.

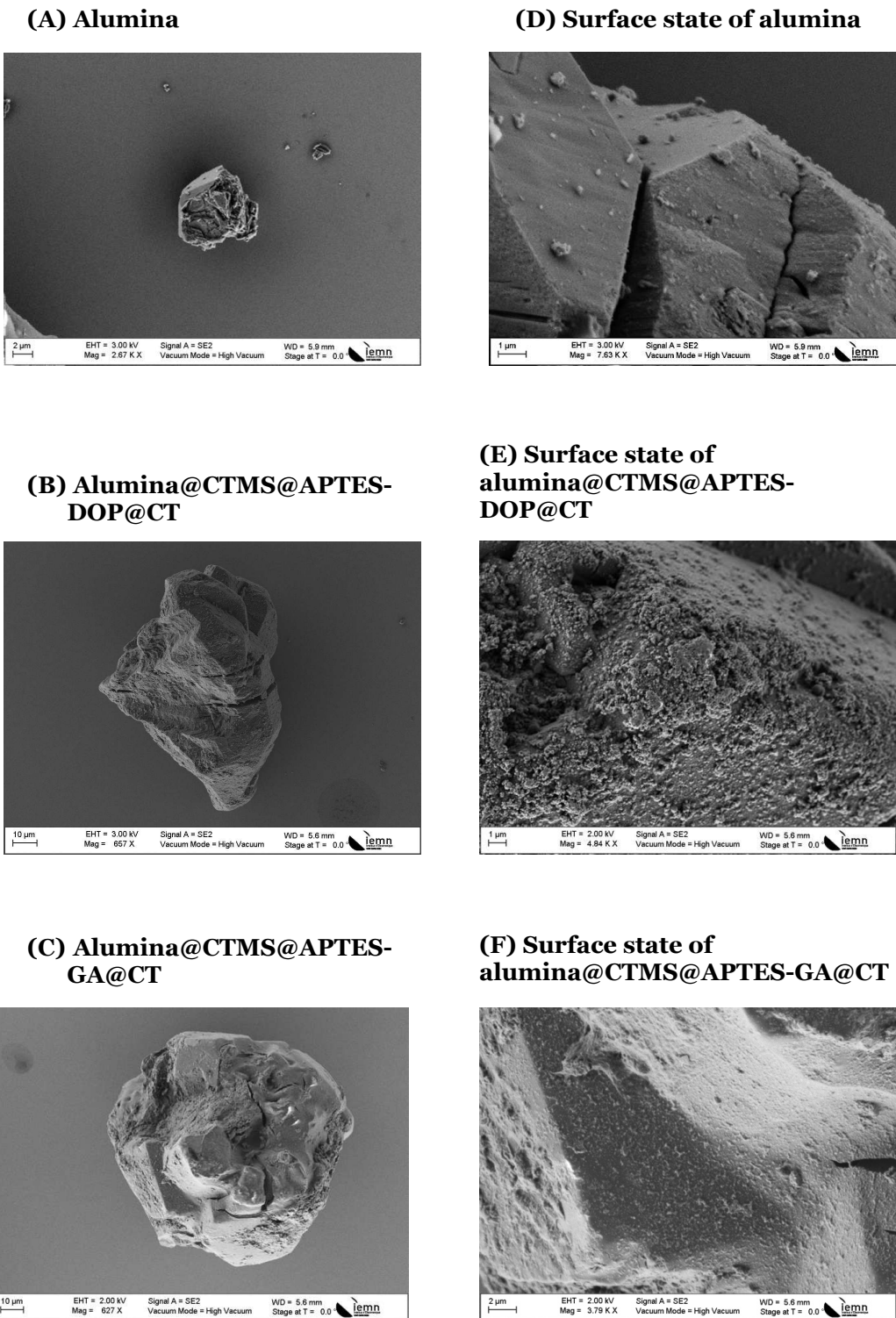


Figure 4.29. SEM images of particles: (A) alumina, (B) alumina@CTMS@APTES-DOP@CT, (C) alumina@CTMS@APTES-GA@CT, and zoomed views of their respective surfaces to observe surface morphology (D, E, and F).

4.7.2. Enzymatic Activity and Storage Stability of Immobilized α -CT

The activity of α -CT, in both its native and immobilized forms (alumina@CTMS@APTES-DOP@CT and alumina@CTMS@APTES-GA@CT), was evaluated by its capacity to digest the AZO substrate, a modified casein labeled with an azo chromophore measurable by absorption at 440 nm (Figure 4.30). Although free α -CT initially exhibited maximum enzymatic activity (100%), its stability was limited: it lost 53% of its activity after 3 days and became completely inactive after 5 days. According to the well-established Lumry-Eyring model, enzymatic inactivation can occur in two distinct stages. The first involves a reversible unfolding of the enzyme's native structure, caused by the disruption of interactions that have stabilized its three-dimensional conformation. This phase can be followed by irreversible processes such as molecular aggregation or covalent modifications, leading to a transition into thermodynamically stable but catalytically inactive states (Iyer & Ananthanarayan, 2008). For free α -CT stored in pure water lacking stabilizing ions, these mechanisms can explain the progressive loss of activity. Indeed, the unfolding could expose hydrophobic residues, disrupting the alignment of residues critical for its catalytic function. When denaturing conditions have persisted, this initial unfolding has become irreversible, resulting in molecular aggregation or irreversible chemical modifications such as the oxidation of sensitive residues like cysteine and methionine. In the absence of stabilizers to protect its native structure, the α -CT could also become prone to autolysis, a self-degradation process (Iyer & Ananthanarayan, 2008). These cumulative phenomena, governed by first-order kinetics, have led to the complete inactivation of the enzyme within a few days (Iyer & Ananthanarayan, 2008). Immobilization significantly extended its activity, although the results varied depending on the method used. Immobilization with GA (alumina@CTMS@APTES-GA@CT) retained 40% of the initial activity, but this progressively decreased to 37% after one week, 29% after 3 weeks, 11% after 4 weeks, and only 2% after 5 weeks. In comparison, immobilization with DOP (alumina@CTMS@APTES-DOP@CT) provided better retention of initial activity (44%) and extended stability, with activity remaining unchanged for 2 weeks before decreasing to 34% after 3 weeks, 16% after 4 weeks, and 8% after 5 weeks. These results highlighted the efficiency of DOP-based immobilization compared to GA-based immobilization. The DOP

method ensured increased enzymatic stability, a slower rate of decline, and a residual activity after 5 weeks that was 4 times higher than that achieved with GA. Thus, DOP created a biocompatible environment that maximized the preservation of the native three-dimensional structure of α -CT, which is crucial for sustaining its catalytic activity, although some reduction was still observed (Song et al., 2018). Unlike GA, which formed rigid bonds and caused nonspecific modifications of functional groups, DOP acted as a flexible linker, reducing steric constraints while facilitating substrate access to the enzyme's active sites (Bayramoglu et al., 2020). Additionally, the protective layer generated by DOP enhanced enzyme stability by shielding it from pH variations and ionic forces, contributing to better long-term activity retention (Song et al., 2018). Previous studies have corroborated the impact of material choice and immobilization methods on enzymatic stability: for instance, immobilization on amine-functionalized nanofibers with glutaraldehyde retained 55.6% of native activity, while magnetic silica supports grafted with DOP maintained up to 86.6% (Wong et al., 2017; Bayramoglu et al., 2020). Although the performance achieved in this study was lower, it confirmed the potential of DOP-grafted materials to enhance the durability of immobilized enzymes for long-lasting applications.

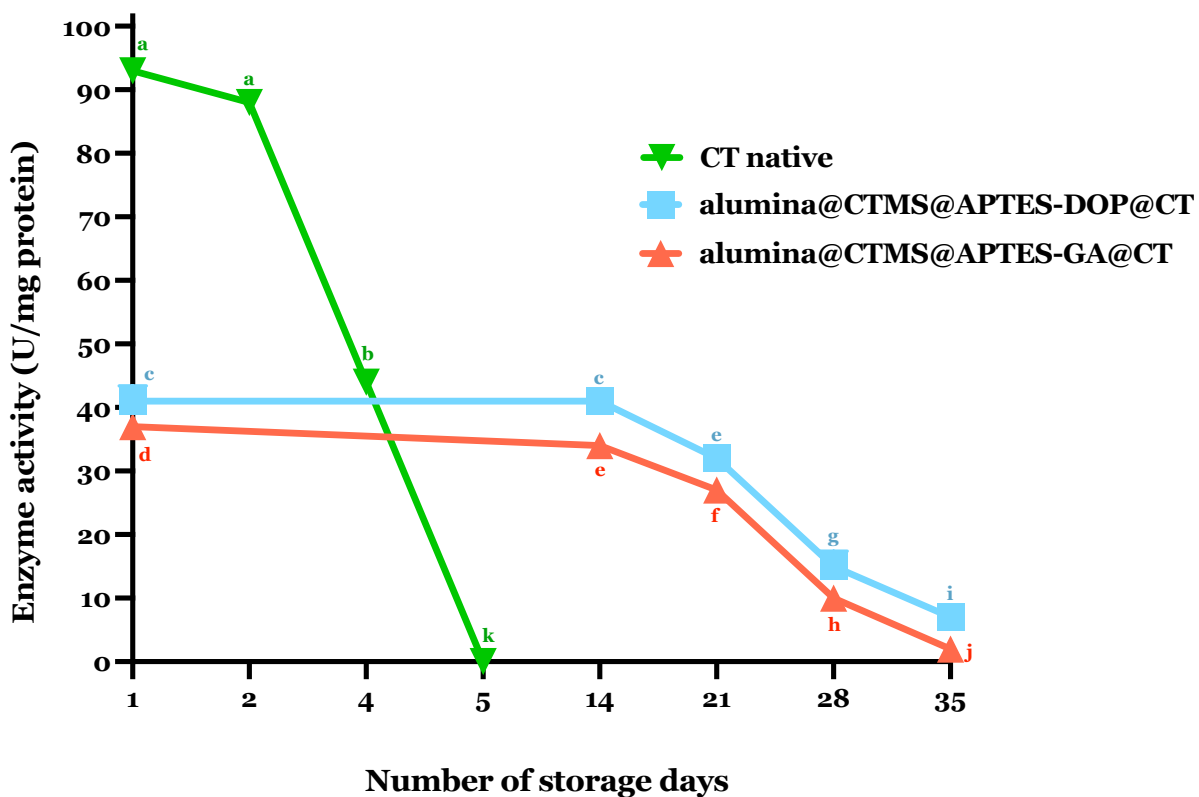


Figure 4.30. Evolution of enzymatic activity (native, alumina@CTMS@APTES-DOP@CT, and alumina@CTMS@APTES-GA@CT) during storage at 4 °C over time (days). Differences between points are statistically significant ($p < 0.05$).

4.7.3. Recyclability study of immobilized α -CT

The recyclability of α -CT immobilized on the alumina@CTMS@APTES@DOP support was evaluated over ten successive cycles of use. The immobilized α -CT maintained high enzymatic activity during the first four cycles, with residual activities of $94 \pm 1.2\%$, $88 \pm 1.4\%$, and $71 \pm 0.3\%$ after the second, third, and fourth cycles, respectively (Figure 4.31). Even after five cycles of use, more than 50% of the initial activity was retained, and a stabilized activity at 29% was observed after ten cycles. This stability can be attributed to the unique ability of PDA to form a universal adhesive matrix on the alumina support. Indeed, during the process, a uniform layer is created, which helps to stabilize the enzyme's three-dimensional structure while ensuring homogeneous immobilization (Bayramoglu et al., 2020). Through its versatile interactions—such as hydrogen bonding, hydrophobic

interactions, and π - π interactions—PDA served as an effective protective barrier against various mechanical and environmental stresses, including temperature variations, shear forces, pH fluctuations, and exposure to intermediate or secondary products (Lee et al., 2007). Additionally, the self-proteolysis of α -CT is reduced by limiting the access of catalytic sites to their own substrates, thereby preserving the integrity of the immobilized enzyme (Bayramoglu et al., 2020). Compared to systems reported in the literature, these results demonstrated good activity retention, particularly during the first cycles. For instance, residual activity of 88% after three cycles and 71% after four cycles exceeded the 66.4% and 68.6% obtained with comparable systems, such as mesoporous silica particles (MSN) bound to PDA and iron particles functionalized with PDA-coated MSN (Rukhma et al., 2024). However, after 10 cycles, the method use here exhibited lower performance, with residual activity of 29%, compared to more sophisticated systems, such as immobilization on polydopamine-functionalized magnetic particles, which retained 57% activity after 30 cycles (Bayramoglu et al., 2020). These results highlighted the initial robustness of the method used here and its relevance for applications requiring limited but intensive usage cycles. Moreover, the simplicity of preparation and the industrial adaptability of this process provided significant practical advantages over more complex systems.

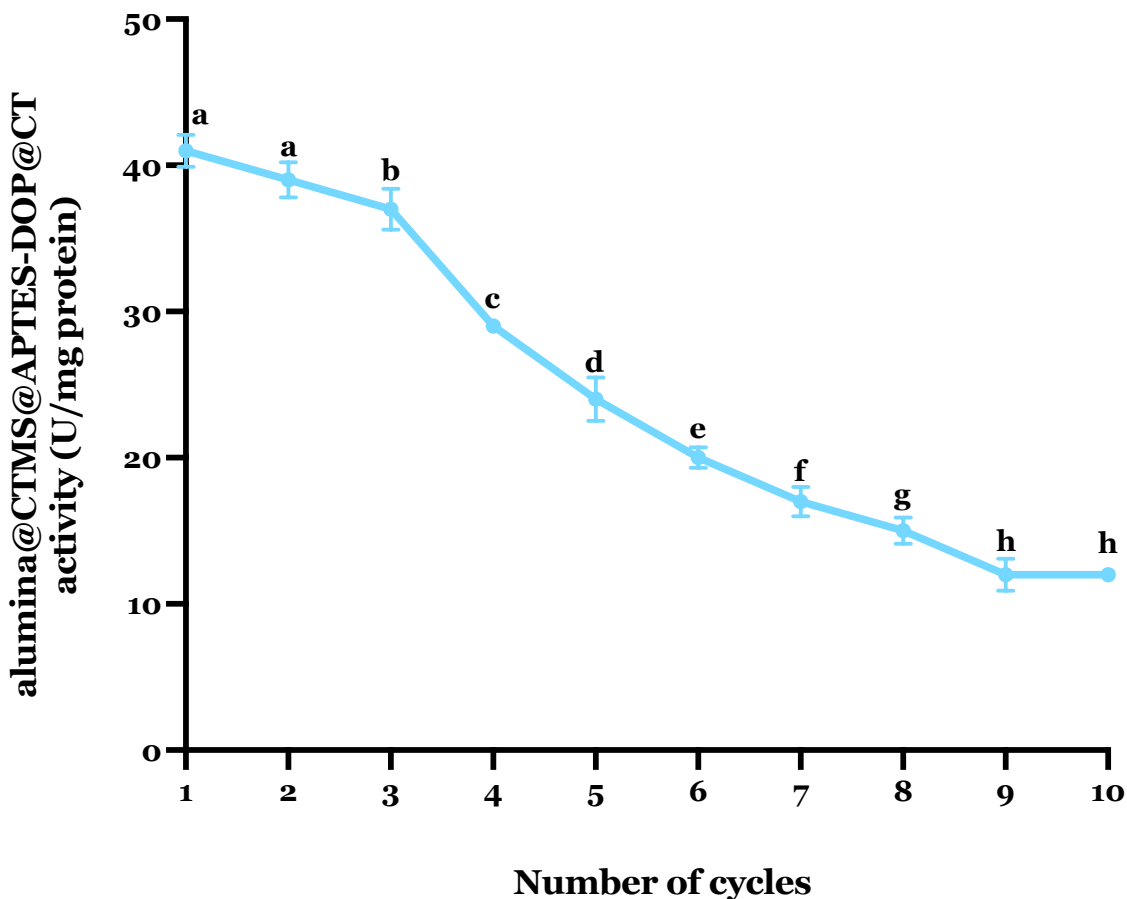


Figure 4.31. Evolution of the enzymatic activity of alumina@CTMS@APTES-DOP@CT over repeated usage cycles.

4.7.4. Comprehensive Characterization and Functional Analysis of Peptides

4.7.4.1. Peptide Population Represented as a Heat Map

A peptide analysis methodology based on peptide matching with the α -LA sequence has been implemented to characterize the hydrolysates. This approach has revealed a sequence coverage of 63.4% for hydrolysis performed with immobilized α -CT, representing a 39% increase compared to free α -CT, which has achieved a maximum sequence coverage of 45.5% (H elorie, article 1) (Figure 4.32). However, this increase has been accompanied by a

51% decrease in the total number of peptides generated, with 17 peptides obtained for immobilized α -CT compared to 35 for free α -CT (Hélorie, article 1).

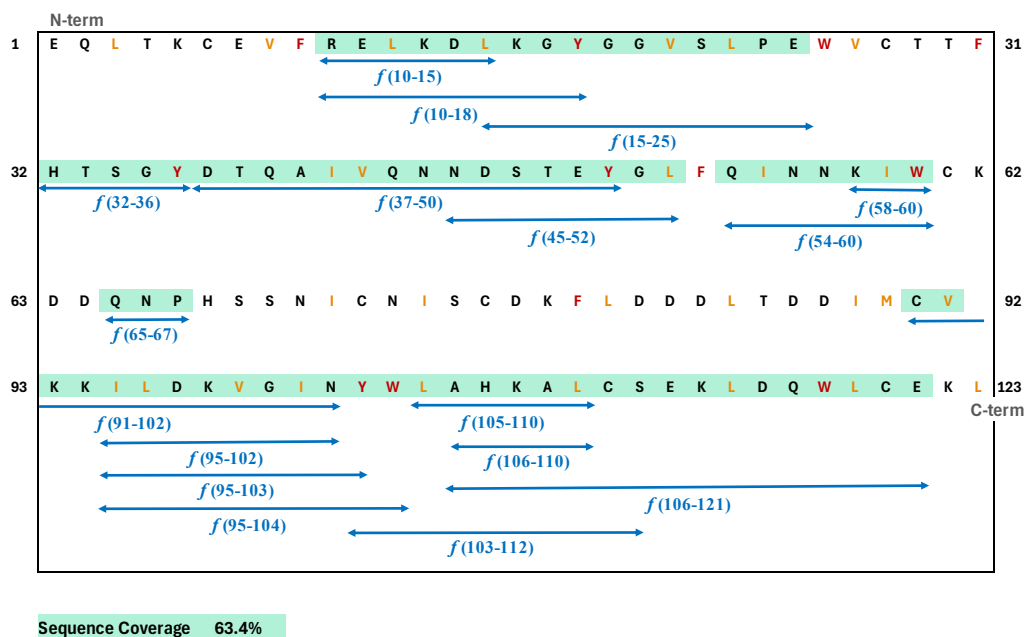


Figure 4.32. Mapping of cleavage sites and Peptide Coverage of α -LA. The letters represent the 123 amino acids of α -LA, with the numbers on the left and right indicating their position in the sequence. Red letters denote the primary cleavage sites of α -CT, while orange letters indicate the secondary cleavage sites. Arrows illustrate the peptides generated by hydrolysis. The green highlight represents the peptide coverage within the α -LA sequence.

The analysis of these peptides highlighted major differences between the obtained hydrolysates. Indeed, 22 peptides were exclusive to free α -CT, compared to 7 for immobilized α -CT. This difference suggested that the free form of the enzyme hydrolyzed a broader spectrum of sites, probably due to its increased mobility and the absence of steric constraints. The peptides specific to free α -CT mainly included short fragments (AHK, KDLK, LAHK, RELK) and sequences enriched in aromatic and hydrophobic amino acids, which are preferred by α -CT (Hélorie, article 1). In contrast, the peptides specific to immobilized α -CT were longer (AHKALCSEKLDQWLCE and CVKKILDKVGIN) and contained more polar or charged amino acids (e.g., AHKALCSEKLDQWLCE), suggesting a targeted hydrolysis of more accessible regions due to the structural constraints of

immobilization. Meanwhile, 10 common peptides were detected in the hydrolysates of both enzymatic conditions: AHKAL, DTQAIVQNNDSTEY, HTSGY, ILDKVGINY, ILDKVGINYW, KIW, LAHKAL, QINNKIW, RELKDL, and RELKDLKGY (Hélorie, article 1). These peptides originated from conserved and accessible cleavage sites, regardless of the enzyme's state. Their presence reflected the intrinsic preferences of α -CT for aromatic (tyrosine, tryptophan, phenylalanine) and hydrophobic residues (leucine, isoleucine, valine, methionine), which are generally exposed in the native or partially denatured structure of the protein (Toldrá et al., 2020).

The covalent immobilization of α -CT on alumina induced a redistribution of the preferential cleavage sites, influencing the hydrolysis profile of α -LA. The steric hindrance and conformational constraint imposed by immobilization probably restricted the accessibility of certain cleavage sites, thus reducing the peptide diversity obtained (Wahab et al., 2020). However, this limitation did not uniformly affect the entire protein. Indeed, some regions were less hydrolyzed, while others exhibited an increased cleavage frequency, indicating a modification in the distribution of enzymatic cleavages. Immobilized α -CT thus preferentially targeted regions 10-25, 32-60, and 92-121 (Figure 4.32), with a high occurrence of cleavages in α -helix-rich domains $f(19-25)$ and near disulfide bridges $f(65-121)$ (Figure 4.33). This preferential selectivity may have resulted from mechanical effects induced by immobilization, which altered the structure of α -LA and its enzymatic accessibility. Electrostatic interactions, local mechanical constraints, and a concentration effect may have temporarily modified the conformation of α -LA, thereby exposing cleavage sites that are normally protected (Mateo et al., 2007). In contrast, free α -CT generated a greater variety of peptides, particularly short fragments resulting from multiple cleavages at more accessible sites. A high redundancy was observed among these peptides (AHK, LAHK, WLAH, WLAHKAL), indicating a more exhaustive and progressive hydrolysis, probably facilitated by the greater flexibility of the free enzyme. This ability to hydrolyze a broader range of sites could explain the higher number of peptides obtained with free α -CT, at the expense of a more extensive sequence coverage. Thus, immobilization did not simply result in a restriction of hydrolysis but rather led to a redefinition of enzymatic specificity, favoring certain cleavages at the expense of others.

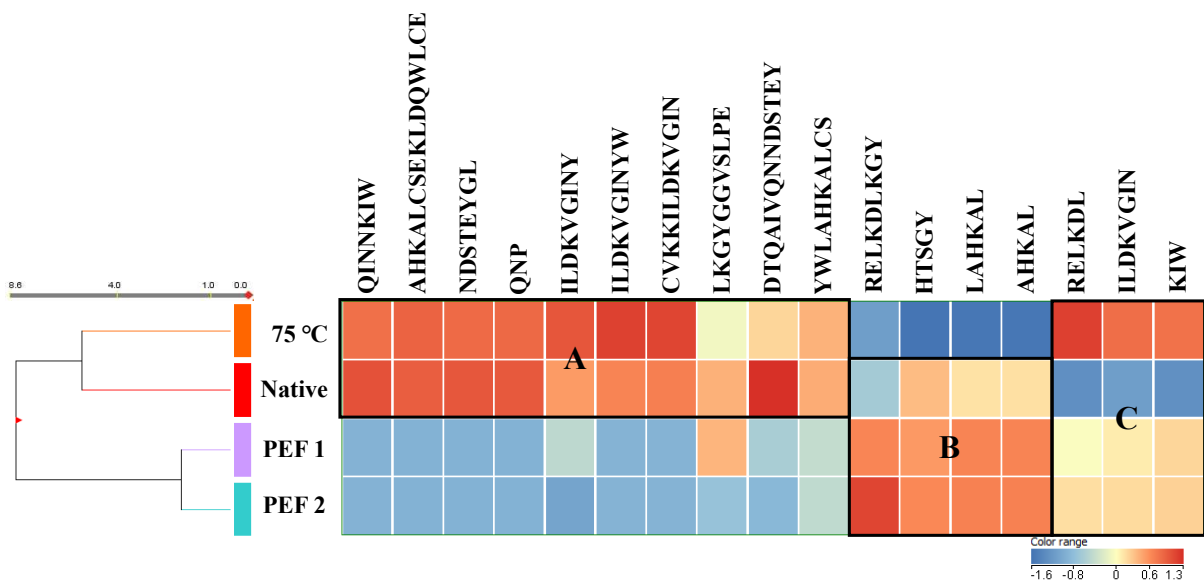


Figure 4.34. Hierarchical clustering of pretreatment conditions (native, thermal and PEF) and non-specific peptides obtained from chymotrypsin digestion, with similarities measured by Euclidean distance and displayed in a heat map. The color scale indicates the relative abundance of peptide ions: red represents up-regulation, while blue indicates down-regulation.

The hydrolysates of native α -LA and α -LA pretreated at 75 °C were grouped into the same cluster, distinct from the samples subjected to PEF. Euclidean distance analysis revealed greater similarity among hydrolysates obtained under PEF pretreatments, while those from native and thermal pretreatments showed more differentiated peptide profiles. These observations reflect significant variations in peptide generation and abundance based on pretreatments, suggesting specific structural effects on α -LA that modulate cleavage site accessibility and influence DH. PEF conditions 1 (15 kV/cm, 75 pulses) and 2 (20 kV/cm, 37 pulses) stood out due to a marked abundance of peptides grouped in Box B, on average 0.7 times higher than in native conditions and 2.3 times higher than in the 75 °C pretreatment. Conversely, peptides in Box A were highly abundant under the 75 °C pretreatment, with an average abundance 0.08-fold higher than that of native conditions and 1.5-fold higher than that of PEF pretreatments. Finally, the peptides in box C exhibited a 2.2-fold increase in abundance under thermal conditions and a 1.4-fold increase following PEF treatment, compared to their native state.

These results highlight marked differences between pretreatments, with PEF favoring the exposure of specific cleavage sites and increased production of certain peptides, while thermal pretreatment favored distinct peptides. The structural effects induced by these pretreatments directly influence the composition and distribution of peptide hydrolysates, highlighting the importance of choosing conditions to modulate the bioactive properties of peptides generated by immobilized α -CT (Hélorie, article 1).

4.7.4.2. Screening of Antihypertensive and antidiabetic potential of α -LA peptides

An *in silico* screening of antihypertensive and antidiabetic activities of peptides generated by immobilized α -CT is presented in Figure 4.35. The results for peptides derived from free α -CT, obtained from a previous study (Hélorie, article 1), are also included for comparison.

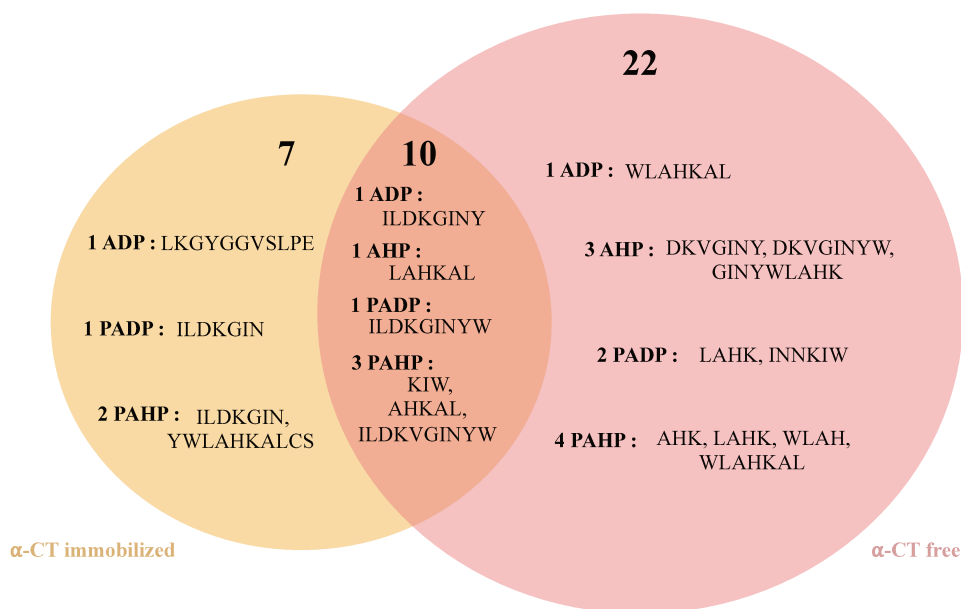


Figure 4.35. Venn diagram illustrating bioactive and potentially bioactive peptides (antihypertensive and antidiabetic) resulting from the hydrolysis of α -LA pretreated by CEP using free and immobilized α -CT. Legend: AHP: antihypertensive peptides reported in the literature. ADP: antidiabetic peptides reported in the literature. PAPH: potentially antihypertensive peptides not reported in the literature. PADH: potentially antidiabetic peptides not reported in the literature.

Immobilized α -CT produced 7 specific peptides, among which 2 exhibited antihypertensive potential and 1 displayed antidiabetic potential. Additionally, one peptide was identified as a known antidiabetic peptide. The peptides common to both enzymatic systems, using free and immobilized α -CT (10 in total), included 1 known antihypertensive peptide and 1 known antidiabetic peptide, suggesting conserved bioactivities regardless of the enzyme's state. Free α -CT, on the other hand, generated 22 specific peptides, among which 3 were recognized as antihypertensive, 1 as antidiabetic, 4 exhibited antihypertensive potential, and 2 displayed antidiabetic potential. These results highlighted an increased diversity of peptides produced by the free α -CT, with a balanced distribution between antihypertensive and antidiabetic activities.

The results revealed significant variations in the abundance of bioactive peptides depending on the experimental conditions. One peptide, LAHKAL, previously reported in the literature for its antihypertensive activity, showed an average increase in abundance of more than 340% under PEF pretreatment compared to native conditions and more than 144% compared to heat treatment at 75 °C. This suggests that PEF combined with hydrolysis by α -CT promoted the exposure or release of specific sites conducive to its generation. Conversely, a peptide known for its antidiabetic activity (ILDKVGINY) was, on average, 170% more abundant in the native condition and 228% more abundant in the 75 °C condition than under PEF conditions. This may indicate that PEF induces structural modifications that reduce the accessibility or stability of the sites necessary for its release. Moreover, a peptide previously unreported in the literature, AHKAL, exhibited an average increase of 200% in relative abundance under PEF conditions compared to both native and heat-treated conditions, highlighting its bioactive potential and the unique effect of PEF on the generation of new bioactive peptides. On the other hand, the two potentially bioactive peptides generated by hydrolysis using α -CT and not previously reported in the literature exhibited distinct relative abundances depending on the applied pretreatment. For instance, the peptide ILDKGIN, identified as a potential candidate with antihypertensive and antidiabetic properties, displayed a 113% average increase in relative abundance under PEF treatment and a 448% increase under thermal conditions compared to the native state. Additionally, the peptide YWLAHKALCS, also considered for its antihypertensive activity, showed an average abundance 200% higher in the native and heat-treated conditions compared to PEF

conditions. Unlike heat treatment, some PEF conditions can induce rapid and reversible changes in protein structure, which may explain why some peptides remain inaccessible or protected under these conditions, reducing their production compared to thermal pretreatment.

These observations highlight the crucial role of pretreatments in modulating the composition and distribution of bioactive peptides generated by enzymatic hydrolysis using immobilized α -CT, with each method offering specific advantages.

4.8. Conclusion and perspectives

While studies on PEF generally focus either on improving substrate sensitivity to hydrolysis or on optimizing enzymatic performance, this research is the first to explore a sequential approach combining PEF pretreatment of α -LA followed by hydrolysis with immobilized α -CT. Two immobilization methods were tested, using either GA or DOP as a cross-linking agent. α -CT was successfully immobilized on alumina particles via covalent bonding using DOP, achieving an immobilization efficiency of 96.6%. The immobilized α -CT exhibited promising recyclability, retaining more than 50% of its residual activity after five cycles and 29% after ten cycles. The DOP-based approach stood out for its superior performance, not only in terms of immobilization efficiency but also in achieving a homogeneous and stable enzymatic coverage. Unlike GA, known for its toxicity (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007), DOP has the advantage of being non-toxic and biocompatible, making it particularly suitable for enzymatic immobilization applications aimed at food protein digestion and the exploitation of bioactive peptides in the food industry.

This study highlights the impact of α -CT immobilization on α -LA hydrolysis, revealing a modification in enzymatic selectivity, characterized by a modulation of the cleavage of specific peptide bonds and an increase in peptide sequence coverage. The peptide profiling analysis showed that immobilization promotes the generation of longer and more specific peptides, whereas the free enzyme produces a greater diversity of short peptides. These observations highlight the influence of steric constraints and enzyme-substrate interactions

on cleavage selectivity, which can be exploited to tailor peptide production with different properties, including bioactive properties.

The advantage of combining enzymatic immobilization with PEF pretreatments lies in their ability to modulate bioactive peptide production while maximizing process sustainability. Previous studies have shown that PEF induce structural rearrangements, facilitating the selective exposure of certain cleavage sites (Hélorie, article 1). When combined with α -CT immobilization, this phenomenon could explain the emergence of peptides with novel potential bioactivities, including ILDKGIN and YWLAHKALCS, which exhibit antihypertensive and antidiabetic properties. This highlights the potential of this approach to generate peptides with bioactivities that have not been previously reported.

To enhance the efficiency of this approach, it will be essential to further optimize the immobilization conditions of α -CT and the PEF parameters to fully exploit their synergy. The integration of continuous-flow reactors, particularly fixed-bed reactors, would help intensify enzymatic hydrolysis and ensure more specific and reproducible hydrolysate production. This pioneering study, conducted on α -LA, a well-characterized model protein, provides an analytical framework that can be extended to more complex protein systems. It thus opens new perspectives for maximizing bioactive peptide production, meeting the growing demands of the nutraceutical and pharmaceutical industries. Finally, further studies will be necessary to characterize the bioactivities of PEF-derived hydrolysates, both *in vitro* and *in vivo*, to validate their functional potential.

Credit authorship contribution statement

Hélorie Clouzot: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Sergey Mikhaylin:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Rénato Froidevaux:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Jacinte Thibodeau:** Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Laurent Bazinet:** Methodology, Validation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This research was funded by the University of Lille, France (European Metropolis of Lille and the Isite-ULNE within the framework of the Charles Viollette Industrial Chair) and Université Laval Québec, Canada (NSERC Discovery grant, RGPIN-2017-05970). Financial support of the Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF, Quebec, Canada) and the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT) is also acknowledged. The researchers would like to thank all participants for their time and their interest in the study. They also express their gratitude to Yannick Coffinier (Université de Lille) for his valuable assistance in conducting scanning electron microscopy (SEM) analyses.

5. Chapitre 5 - Amélioration de l'hydrolyse des protéines commerciales de pois grâce à la combinaison de champs électriques pulsés et d'immobilisation covalente de α -chymotrypsine sur des particules d'alumine

5.1. Transition contextuelle

Les travaux de recherche menés dans les chapitres 3 et 4 ont mis en évidence le potentiel de l'approche combinée des CEP et de l'hydrolyse enzymatique par une enzyme immobilisée pour la production de peptides bioactifs, répondant ainsi aux exigences croissantes des industries agroalimentaires en matière de procédés durables.

Dans ces études, l' α -LA a été utilisée comme modèle expérimental, validant ainsi la pertinence de cette stratégie. Contrairement aux procédés conventionnels d'hydrolyse enzymatique, qui sont contraints par des limites en termes de rendement et de spécificité des peptides obtenus, cette approche innovante tire parti des effets combinés des CEP et de l'immobilisation enzymatique pour améliorer la sélectivité du clivage et la bioaccessibilité des peptides générés. Afin d'adapter cette approche aux contraintes et aux besoins du secteur industriel, son application a été étendue à un mélange complexe de protéines agroalimentaires : les PP. L'application de cette stratégie à un substrat plus complexe ouvre des perspectives prometteuses pour la valorisation des protéines végétales et le développement d'ingrédients fonctionnels à haute valeur ajoutée.

Ainsi, ces travaux de recherche s'inscrivent dans le cadre des objectifs spécifiques 3 et 4.

5.2. Résumé

Les protéines de pois (PP) constituent une source prometteuse de peptides bioactifs, bien que leur hydrolyse enzymatique soit souvent limitée par leur structure compacte. Cette étude évalue l'impact des champs électriques pulsés (CEP) sur l'hydrolyse des PP par la

chymotrypsine immobilisée. Les résultats montrent que les CEP augmentent l'accessibilité des sites de clivage enzymatique, améliorant ainsi l'efficacité de l'hydrolyse et favorisant la production de peptides bioactifs, en particulier ceux présentant un potentiel antihypertenseur et antidiabétique. Par ailleurs, l'immobilisation de la chymotrypsine sur des nanoparticules d'alumine par liaison covalente a permis d'accroître l'efficacité et la sélectivité de l'hydrolyse, comparativement à l'enzyme libre. L'application des CEP a conduit à une amélioration de 60 % de l'hydrolyse enzymatique par rapport aux PP non traitées, un effet attribué à un dépliement partiel des protéines sous l'effet du champ électrique, comme confirmé par l'analyse de leur structure secondaire et tertiaire. Ces améliorations surpassent également celles obtenues avec des échantillons prétraités thermiquement. Cette synergie entre les CEP et l'enzyme immobilisée ouvre des perspectives prometteuses pour l'optimisation des procédés de valorisation des protéines végétales, avec des applications potentielles à grande échelle dans le développement d'ingrédients fonctionnels pour l'industrie agroalimentaire.

5.3.Publication

Enhancement of commercial pea proteins hydrolysis through the combination of pulsed electric fields and covalent immobilization of α -chymotrypsin on alumina particles

Hélorie Clouzot^{1,2,3}, Mélanie Faucher², Jacinthe Thibodeau^{2,3,4}, Laurent Bazinet^{2,3,4}, Renato Froidevaux^{1,3}, Sergey Mikhaylin^{2,3}

¹ UMR Transfrontalière 1158 BioEcoAgro, Lille University, INRAe, Liège University, UPJV, JUNIA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV—Institut Charles Viollette, 59000 Lille, France.

² EcoFoodLab, Food Science Department, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Quebec, QC, Canada

³ International Associated Laboratory in Bioproduction of Natural Antimicrobials (LIAAN), Laval University – Lille University

⁴ Laboratoire de Transformation Alimentaire et Procédés Électromembranaires (LTAPEM, Laboratory of Food Processing and Electro-Membrane Processes), Food Science Department, Laval University, Quebec, QC, Canada

5.4. Abstract

Pea proteins (PP) are a promising source of bioactive peptides, although their enzymatic hydrolysis is often hindered by their compact structure. This study explores the impact of pulsed electric fields (PEF) on the hydrolysis of PP by immobilized chymotrypsin. The results reveal that PEF increases the accessibility of enzymatic cleavage sites, thereby improving hydrolysis efficiency and promoting the production of bioactive peptides, particularly with antihypertensive and antidiabetic potential. Moreover, immobilized chymotrypsin on alumina nanoparticles via covalent bonding has shown an enhancing of the efficiency and selectivity of the hydrolysis compared to the free enzyme. The application of PEF led to a 60% improvement in enzymatic hydrolysis compared to untreated PP, explained by a partial unfolding of the proteins under the effect of PEF, as confirmed by secondary and tertiary structure analyses. These improvements also surpass those obtained with thermally pretreated samples. This synergy between PEF and immobilized enzyme holds great promise for optimizing plant protein valorization processes, with potential applications in the large-scale development of functional ingredients for the food industry.

Keywords: pea proteins, pulsed electric fields, enzymatic hydrolysis, enzyme immobilization, bioactive peptides.

5.5. Introduction

The growing demand for plant-based foods, driven by environmental concerns and the adoption of vegetarian and vegan diets, reflects a shift in consumer preferences toward more sustainable products (Chao & Aluko, 2018). Among the alternatives explored by the food industry to reduce the use of animal proteins, pea (*Pisum sativum*) holds a prominent position. This legume, widely cultivated around the world, stands out for its abundant availability, low environmental impact, and competitive production cost (Wang et al., 2022). These qualities make it a key player in the transition toward more sustainable food systems. Moreover, peas are particularly interesting due to their high protein content, ranging from 20 to 25% (w/w),

with a composition predominantly made up of globulins and albumins (Lu et al., 2020b). The bioactive peptides derived from these proteins exhibit a wide range of beneficial properties, including antioxidant, antidiabetic, antimicrobial, anti-inflammatory, anticancer, anti-obesity, anti-hyperlipidemic, antifatigue and antihypertensive properties (Kiersnowska & Jakubczyk, 2022; D.-T. Wu et al., 2023). The most commonly used method for obtaining these peptides is enzymatic hydrolysis (Cruz-Casas et al., 2021). However, the enzymatic hydrolysis of PP faces two main limitations : firstly, the compact structure of the proteins, which restricts enzyme access to cleavage sites, decreasing the efficiency of bioactive peptides production; secondly, the use of free enzymes presents drawbacks such as high costs, limited yields, low productivity, as well as the production of secondary metabolites due to enzyme autolysis (Cruz-Casas et al., 2021). Pre-treatment of proteins and immobilization of enzyme seem to be promising alternatives to overcome these limitations (Rocha et al., 2018). Regarding protein pretreatment, although methods like thermal treatments have been utilized, they have drawbacks, such as the loss of bioactive properties and a significant environmental impact (Rocha et al., 2018). This has led to the exploration of more sustainable alternatives. Pulsed electric fields (PEF) have recently emerged as a promising non-thermal method to improve protein accessibility to enzymes (Mikhaylin et al., 2017; Agoua et al., 2020a). PEF has already demonstrated its effectiveness on specific proteins, such as α -lactalbumin and β -lactoglobulin, by inducing modifications in their secondary and tertiary structures (Helorie article 1; Agoua et al., 2020). These modifications promote partial protein unfolding, making the enzymatic cleavage sites more accessible. This approach could significantly enhance the enzymatic hydrolysis efficiency of industrial mixtures like PP, while increasing the production of bioactive peptides in industrial processes, surpassing conventional methods in terms of efficiency and environmental sustainability. Furthermore, a recent study showed that PEF allows the production of peptides with multiple biological activities in a more eco-efficient manner than conventional methods (Agoua et al., 2022). Secondly, enzyme immobilization involves binding an enzyme to a solid support, offering several advantages over free enzymes. Enzyme immobilization contributes to the sustainability of the process by improving enzyme stability, extending enzyme life and enabling it to be reused over several reaction cycles (Wahab et al., 2020). Among the supports used, alumina particles are particularly effective. Their large specific

surface area and ability to form covalent bonds with enzymes promote stable immobilization while maintaining enzymatic activity (Heilmann et al., 2003). Moreover, the addition of spacer molecules on alumina supports greatly optimizes enzyme loading capacity, achieving an immobilization efficiency of up to 90% (Kujawa, Głodek, Koter, et al., 2021). Achieving such immobilization efficiency paves the way for better enzyme utilization in industrial processes, thus increasing the overall yield of enzymatic reactions.

Hence, this study aims at evaluating the impact of PEF on improving the chymotryptic hydrolysis of PP and the production of bioactive peptides. It also aims to compare the efficiency of this hydrolysis with free and immobilized enzyme, examining differences in the yield and selectivity of the bioactive peptides produced.

5.6. Materials and Methods

5.6.1. Materials

The PP concentrate powder (Nutralys[®] S85F, purity of 67 %) was obtained from Roquette Frères (Lille, France). The enzyme (bovine α -chymotrypsin type II, ≥ 40 units/mg of protein) and products used for enzyme immobilization were purchased at Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Other materials were obtained from Fischer Scientific (Nepean, Ontario, Canada).

5.6.2. Pulsed Electric Field (PEF) system

The PEF system from Diversified Technologies Inc. (Bedford, MA, USA) was described by Hélorie (previous article). Briefly, this system consists of a treatment chamber and a modulation cabinet. The chamber contains three stainless steel electrodes (one high-voltage and two grounded low-voltage) and two ceramic insulators that could deliver square pulses ranging from 1 to 12 μ s. The experimental solution can be introduced via a peristaltic pump (Masterflex, Vernon Hills, IL, USA) at flow rates varying between 50 mL/min and 8 l/min for high-voltage pulse treatment. The pulse generator can deliver a maximum field strength

of 30 kV/cm and a frequency of 1400 Hz. The maximum conductivity and temperature can reach 7.5 mS/cm and 30°C, respectively.

5.6.3. Pea protein pretreatment protocol and hydrolysis by free and immobilized chymotrypsin

5.6.3.1. PP Pretreatment protocol

The Figure 5.36 shows the study protocol.

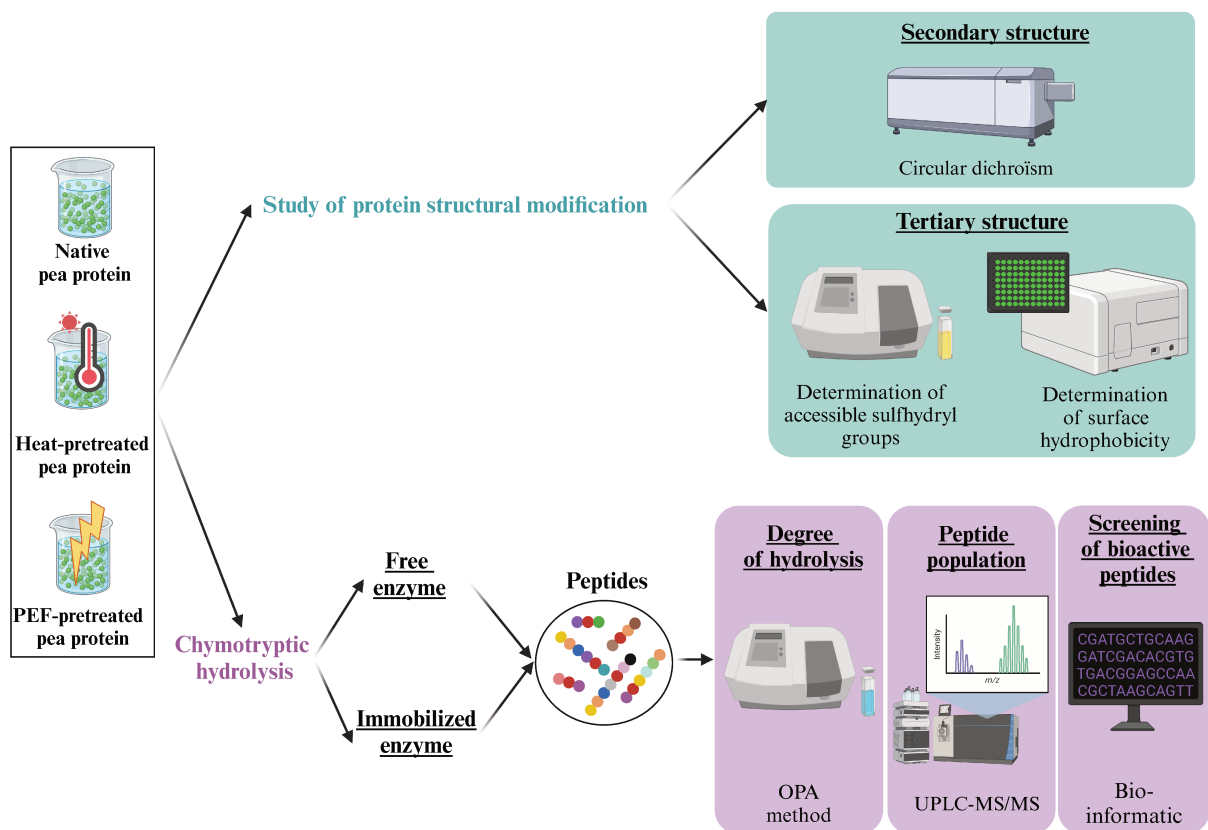


Figure 5.36. Experimental workflow of PP pretreatment and enzymatic hydrolysis.

The PP solution was prepared at 1% w/v in aqueous buffer (pH 7.4, conductivity 555 μ S/cm). A negative control consisted of an untreated PP solution, maintaining its native conformation. Negative control was an aqueous solution of untreated PP (1% w/v, pH 7.4, conductivity 555

$\mu\text{S}/\text{cm}$). For comparative purposes, a thermal pretreatment (positive control) was applied. This conventional pretreatment, serving as a positive control, was performed on aqueous PP solutions (1% w/v, pH 7.4, conductivity 555 $\mu\text{S}/\text{cm}$), heated to 75°C for 15 min in a water bath, and then rapidly cooled to 37°C prior to enzymatic hydrolysis. The temperature of 75°C was chosen on the basis of a previous study, as it allowed partial denaturation of α -LA, facilitating enzymatic hydrolysis without causing excessive structural alterations that could result from more intense heating. In addition, 76°C corresponds to the denaturation temperature of PP, making 75°C an optimal reference condition for comparative analysis (Hélorie, article 1 ; Hall & Moraru, 2021).

The electrical pretreatment of PP solution was conducted by applying electrical pulses at various field strengths and pulse numbers (Table 5.4). A protein solution solution (1L, 1% w/v) was processed at flow rates of 100 or 200 mL/min, depending on the number of pulses (19 or 38, respectively) and pulse duration (10 or 5 μs , respectively). These parameters were selected due to the observed correlation between increasing field strength, the number of pulses, and enhanced proteolysis, as reported by Hélorie (article 1). The important consideration was to select the PEF parameters that prevent electrical arcs, as they can compromise process efficiency and damage equipment (Giteru et al., 2018).

Table 5.4. PEF-pretreatment conditions of PP.

Treatments	1	2	3	4	5	6
Electric field strength (kV/cm)	20	15	10	20	15	10
Number of pulses	19	19	19	38	38	38

Conductivity, pH, and temperature were measured before and after treatment, with no significant variation following the PEF application.

For each experimental condition (native, thermally and PEF-pretreated solutions), a 5 mL aliquot was collected for subsequent analyses. The remaining 100 mL of each pretreated

solution was then adjusted to pH 7.8 using 0.1 M NaOH before initiating enzymatic hydrolysis.

5.6.3.2. PP hydrolysis by free chymotrypsin

Enzymatic hydrolysis of both pretreated and non-pretreated PP samples (1% w/v) was carried out with free bovine chymotrypsin (1% of dry mass, i.e. 10 mg) at 37°C for 4 h (Hélorie, article 1). Due to its specificity for aromatic residues, chymotrypsin is widely used for the production of bioactive peptides with diverse functional properties, making it an appropriate choice for this study (Toldrá et al., 2020). The pH was adjusted to 7.8 and maintained by adding NaOH or HCl (0.1 M). Samples of 5 mL were taken at regular intervals (0 to 240 min) to measure the degree of hydrolysis (DH). Hydrolysis was stopped by heating the solution to 90°C for 10 min to inactivate the chymotrypsin (Serralheiro & Cabral, 1999). The experiments were performed in triplicate.

5.6.3.3. PP hydrolysis by immobilized chymotrypsin

5.6.3.3.1. Immobilization of chymotrypsin by covalent bonding to alumina particles

Chymotrypsin was immobilized on alumina particles via covalent bonding using dopamine, as described by (Hélorie, article 2). Briefly, 50 mg of alumina were dispersed in 7 mL of toluene, with 35 μ L of chlorotrimethylsilane (CTMS) and 24.4 μ L of 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), then heated at 100 °C for 24 h under agitation. After four washes (toluene and acetone) and vacuum drying, 50 mg of the alumina@CTMS@APTES material were mixed in 1.5 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 9), and 77 μ L of dopamine hydrochloride (DOP; 10 mg in 1.5 mL of ethanol absolute) were added at 50°C for 24 h. After washing and drying, 40 mg of the activated alumina@CTMS@APTES@DOP support was mixed with 10 mg of chymotrypsin and stirred at 4 °C for 4 h. The final alumina@CTMS@APTES@DOP@chymotrypsin material

was recovered by centrifugation (10 000 rpm, 10 min, 4 °C), washed (toluene, ethanol and water), vacuum dried, and stored at 4 °C.

5.6.3.3.2. PP hydrolysis by alumina@CTMS@APTES@DOP@chymotrypsin

To compare the efficiency of hydrolysis by free and immobilized chymotrypsin, hydrolysis experiments were conducted with the immobilized enzyme (alumina@CTMS@APTES@DOP@chymotrypsin) on three types of samples: native PP (negative control), preheated at 75 °C (positive control), and pretreated by PEF. Hydrolysis conditions were adjusted to maintain a comparable DH between the free and immobilized enzymes. For example, during the hydrolysis of native PP, the reaction conditions (protein solution at 1% w/v, chymotrypsin concentration at 1% of dry mass, pH 7.8, temperature of 37 °C) were kept identical for both enzyme forms. The only variable adjusted was the hydrolysis duration, which was consistently extended for the immobilized chymotrypsin to achieve the same DH as the free enzyme.

5.6.4. Structural characterization of PP by pretreatments

5.6.4.1. Effect of PEF on the secondary structure of PP by circular dichroism (CD)

The structural changes of PP were analyzed using a spectropolarimeter (Jasco J-815-150S, Jasco Corp., Tokyo, Japan) over a range of 190 to 260 nm, following Hélorie's protocol (article 1) with slight adjustments. Briefly, 75 μ L of native, thermally pretreated or PEF-pretreated PP samples (2 mg/mL), were placed in a 0.2 mm quartz CD cuvette. Each final spectrum represented the average of 10 scans. The proportions of secondary structures (α -helices, β -sheets, random coils) were calculated using CD Pro software (Jasco, Version 2.05.02) and the CONTIN analysis procedure, reference SPD48. The molar residue concentration of PP was calculated using equation (5.15):

$$\text{Molar concentration per redise} = \frac{1000 \times N \times [\alpha\text{-lac}]}{M_{\alpha\text{-lac}}} \quad (\text{Eq. 5.1.5})$$

where N represents the amino acid number of PP, [PP] represents the concentration of PP in g/mL and M represents the molar mass of PP in g/mol.

5.6.4.2. Determination of accessible sulfhydryl groups

The determination of sulfhydryl (thiol) groups of the native, heat and PEF-pretreated samples was carried out following the method described by Beveridge et al. (1974) with the adjustments previously reported by (Hélorie article 1). In brief, PP samples were prepared in a Tris-Glycine buffer and incubated with Ellman's reagent. Absorbance was measured at 412 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2700, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) to determine the thiol concentration based on the equation (5.1.6):

$$\text{Accessible sulfhydryl groups } (\mu\text{mol. g}^{-1}) = \frac{73.53 \times A_{412} \times \text{Dilution (5)}}{\text{Concentration (7.5 mg.mL}^{-1})} \quad (\text{Eq. 5.16})$$

where A represents the absorbance measured at 412 nm.

5.6.4.3. Determination of surface hydrophobicity

The intrinsic fluorescence spectra of the native, heat and PEF-pretreated samples were obtained following an adaptation of the method by Boukil et al. (2022), previously described by (Hélorie article 1). Rapidly, concentration ranges of PP solutions (0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, and 0.05%, w/v) prepared in 2 mM phosphate buffer (pH 7) were incubated with 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) used as a fluorescence probe. The fluorescence of the samples was then measured using a BioTek Synergy H1 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA), with excitation and emission wavelengths set to 380 nm and 480 nm, respectively.

The relative fluorescence units (RFU) are obtained using Equation (5.17):

$$\text{RFU} = \text{Measured RFU} - \text{Sample blank RFU} - \text{ANS blank RFU} \quad (\text{Eq. 5.17})$$

The data were then collected by plotting fluorescence intensity against protein concentration. The surface hydrophobicity (H_0) was determined from the slope of the linear regression of this analysis.

5.6.5. Determination of the degree of hydrolysis (DH)

The PEF-pretreated PP samples were analyzed to assess the DH using the o-phthalaldehyde (OPA) method. The DH values of the PEF-treated samples were compared to a negative control (native PP) and a positive control (thermally pretreated PP). According to the protocol by Mikhaylin et al. (2017), DH was measured by preparing the OPA reagent (25 mL of 100 mM sodium tetraborate, 2.5 mL of 20% SDS, 40 mg of OPA in 1 mL of methanol, and 100 μ L of β -mercaptoethanol, topped up to 50 mL with distilled water), establishing the L-leucine standard curve, and analyzing the samples. Each sample (150 μ L) was mixed with 3 mL of OPA reagent, incubated for 2 min, and the absorbance was measured at 340 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2700, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The DH is calculated according to equation (5.18 and 5.19).

$$\frac{mEq}{g} = \frac{mEq.L^{-1} \times \text{hydrolysis volume (mL)}}{1000 (mL.L^{-1})} / \frac{\text{protein powder mass (g)} \times \text{protein purity (\%)}}{100 (\%)} \times \text{dilution factor} \quad (\text{Eq. 5.18})$$

$$\text{Degree of hydrolysis (DH)(\%)} = \frac{mEq.g^{-1}}{\text{Average number of peptide bonds in the protein}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5.19})$$

5.6.6. Determination of process eco-efficiency

Eco-efficiency (EE) was evaluated by considering both the improvement in the DH and the energy consumption (EC) required to achieve it, following an adapted protocol from (Agoua et al., 2020a). It is expressed by the following equation (5.20):

$$EE = \frac{DH \text{ improvement}}{\text{Energy consumption}} \quad (\text{Eq. 5.20})$$

The DH improvement refers to the percentage increase in DH after pretreatment compared to the native state, while EC, expressed in MJ/kg, was estimated for both thermal and PEF pretreatments.

For thermal pretreatment, EC was calculated based on industrial data (Ozyurt et al., 2004), using the following equation (5.21):

$$EC = Q + W_{el} \quad (\text{Eq. 5.21})$$

where Q represents the total energy required to pasteurize 1 kg of PP solution (MJ/kg), and W_{el} is the energy consumed by electric motors. The thermal energy Q (equation 5.22) is determined by:

$$Q = mC_p\Delta T \quad (\text{Eq. 5.22})$$

where m is the mass of the product (kg), C_p the heat capacity of the solution (kJ/kg/°C), and ΔT the temperature variation.

For PEF pretreatment, EC was calculated according to the method proposed by Jin (2017), combining the energy supplied by the pump W_{pp} and the energy required for the PEF treatment W_{spec} , using the following equation 5.23:

$$W_{spec} = \left(UIt_c * \frac{1}{M} \right) n_i \quad (\text{Eq. 5.23})$$

where U is the applied voltage (kV), I the current (A), t_c the pulse duration (s), M the mass in the treatment chamber (kg), and n_i the number of pulses. The energy of the pump (equation 5.24) is given by:

$$W_{pp} = (\rho QgH)t \quad (\text{Eq. 5.24})$$

where ρ is the solution density (kg/m³), Q the flow rate (m³/s), g the gravitational acceleration, H the liquid rise height (m), and t the operation time.

5.6.7. Peptide identification by RP-UPLC-MS/MS

PP hydrolysates were analyzed using reverse-phase ultra-performance liquid chromatography (RP-UPLC) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS), based on the method described by Cournoyer et al. (2024) with modifications. Analyses were performed on a RP-UPLC 1290 Infinity II system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), consisting of a binary pump, an autosampler, an inline degasser, and a variable wavelength detector set at 214 nm, coupled with a high-definition mass spectrometer (IM-Q-TOF model 6560, Agilent, Santa Clara, CA, USA). PP samples, prepared at a protein concentration of 1% (w/v) and filtered through a 0.45 μm PVDF filter (Chromatographic Specialties Inc., Brockville, ON, Canada), were injected (2 μL) into a Poroshell 120 EC-C18 column (2.1 \times 100 mm, 2.7 μm , Agilent). The column temperature was maintained at 45 $^{\circ}\text{C}$, with a flow rate of 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ and a maximum pressure of 600 bars. A gradient of solvent A (LC-MS grade water with 0.1% formic acid) and solvent B (LC-MS grade acetonitrile with 0.1% formic acid) was applied, starting at 0% B and increasing to 45% over 30 min, followed by a rise to 95% over 15 min, and returning to initial conditions within 5 min. MS detection was performed in positive ionization mode with a dynamic range of 2 GHz, a 100–3200 m/z scan range, and nitrogen used as the drying gas at a flow rate of 13 L/min at 250 $^{\circ}\text{C}$. The applied voltages were 3500 V for the capillary, 300 V for the nozzle, and 400 V for the fragmentor. The system was calibrated using a low-concentration ESI-L tuning mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Data acquisition and analysis were performed using Agilent MassHunter software (version B.09.00 for LC/MS data acquisition and version B.07.00 Service Pack 2 for qualitative analysis, including the BioConfirm module). For peptide identification, the *Pisum sativum* database (NCBI taxonomy ID: 3888) was used within the Spectrum Mill MS Proteomics Workbench software (version B.06.00). Peptides were identified based on their sequence, molecular weight (Da), and position within the PP polypeptide chain. Only peptides detected in at least two of the three replicates were included in the final analysis.

5.6.8. Screening of antihypertensive and antidiabetic activities of peptide hydrolysates of pea proteins

5.6.8.1. Antihypertensive activity

The potential antihypertensive activity of peptides was analyzed using the AHTPDB bioinformatics database (Kumar et al., 2015). Subsequently, an in-depth analysis of their structural and physicochemical properties was conducted to evaluate the potential of peptides not yet reported in the literature. This evaluation primarily relies on the peptides' ability to interact with angiotensin-converting enzyme (ACE), considering factors such as peptide length, molecular weight, and the specific positioning of amino acids. Peptides composed of fewer than 20 amino acids and with a molecular weight below 3 kDa inhibit ACE through hydrogen bonds, hydrophobic interactions, and Van Der Waals forces with enzyme residues associated with the zinc ion (Gallego et al., 2018b; Ichim et al., 2024). The presence of hydrophobic residues, such as proline, at the C and N termini enhances their efficacy and stability, while charged amino acids like glutamic acid and lysine are crucial for optimizing these interactions (Cheung et al., 1980; Chi et al., 2024). These combined criteria were pivotal in predicting the antihypertensive potential of peptides not yet documented in the literature.

5.6.8.2. Antidiabetic activity

The potential antidiabetic activity of peptide sequences was analyzed using BioDADPep (<https://omicsbase.com/BioDADPep/biodadpep-search/>), a bioinformatics database dedicated to antidiabetic peptides (Roy & Teron, 2019). Subsequently, as for the antihypertensive potential, the antidiabetic potential of peptides not yet reported in the literature was evaluated with an in-depth analysis of their structural and physicochemical characteristics. Here also, factors such as peptide length, molecular weight, and the position of certain amino acids were considered to determine the antidiabetic activity. Indeed, peptides composed of 2 to 8 amino acids, with a molecular weight between 200 Da and 1 kDa, are considered to offer the best performance in this domain (Mu et al., 2023). The presence of hydrophobic amino acids, such as leucine, isoleucine, and valine, at the N-

terminal position facilitates interactions with target enzymes like dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV), alpha-glucosidase, and alpha-amylase, with DPP-IV being particularly relevant. Additionally, proline in the second N-terminal position enhances DPP-IV inhibition by competitively binding to the enzyme's active sites (Lacroix & Li-Chan, 2014a). A high proportion of hydrophobic amino acids, including proline, leucine, and alanine, further strengthens these interactions (Zhang et al., 2016). Finally, the peptides' net charge, ranging from -2.9 to 1.1 at pH 7, positively influences their binding affinity, optimizing their inhibitory potential (Mu et al., 2023). To evaluate these characteristics, PepCalc tools (<https://pepcalc.com/>) were used to calculate the molecular weight and net charge of the peptides. The hydrophobicity percentage was determined using the following equation (5.25):

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = \frac{\text{Number of hydrophobic amino acids}}{\text{Total number of amino acids}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5.25})$$

The hydrophobic amino acids considered were alanine, phenylalanine, isoleucine, leucine, methionine, proline, valine, and tryptophan. By combining these criteria, it was possible to predict the antidiabetic potential of peptides not yet documented in the literature.

5.6.9. Statistical analyses

5.6.9.1. General Statistical analyses

The data were analyzed using GraphPad Prism version 10.3.1 (464) for macOS (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, USA, www.graphpad.com), applying a one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. This approach allowed the comparison of all treatment group means to identify statistically significant differences between groups, with a significance threshold set at $p < 0.05$.

5.6.9.2. UPLC-MS/MS data treatment

The ion abundances of the identified peptides were statistically analyzed using Mass Profiler Professional (version 15.1, Agilent Technologies). A 100% occurrence filter was applied to the peptides. The non-parametric Kruskal-Wallis test, particularly suited for data that do not meet normality or homogeneity of variance assumptions (Cournoyer et al., 2024), was used to compare the mean abundances between conditions (Vargha & Delaney, 1998). To minimize Type I errors, the Benjamini-Hochberg method (FDR) was applied to adjust p-values, with 10,000 permutations (Benjamini & Hochberg, 1995). Significant differences between conditions were further explored using a post-hoc Tukey HSD test (Jaccard et al., 1984). Finally, principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering heatmaps were generated on the remaining 501 (free enzyme) and 522 (immobilized enzyme) peptides to identify groups and characterize experimental variations. Data were transformed to \log^2 to normalize the scores.

5.7. Results and Discussion

5.7.1. Structural modifications of PP by pretreatments

5.7.1.1. Effect of PEF on the secondary structure of PP by circular dichroism (CD)

The change in PP secondary structure as a function of pretreatment (native, PEF and 75 °C) was observed by far-UV CD. The results are presented in Table 5.5.

Table 5.5. Secondary structural components of PP estimated by CD.

PP Samples	α Helix (%)	β Sheet (%)	β Turns (%)	Random coils (%)
Native	16.3 \pm 0.3 ^{b*}	14.0 \pm 0.3 ^d	13.9 \pm 0.3 ^d	55.7 \pm 0.7 ^a
75 °C	24.2 \pm 0.2 ^a	4.0 \pm 0.3 ^c	15.6 \pm 0.1 ^c	56.2 \pm 0.6 ^a
PEF 1 (20 kV/cm, 19 pulses)	9.0 \pm 0.9 ^c	21.9 \pm 0.3 ^{bc}	16.8 \pm 0.3 ^{bc}	52.3 \pm 0.5 ^{bc}
PEF 2 (15 kV/cm, 19 pulses)	8.3 \pm 0.8 ^c	20.6 \pm 1.1 ^c	16.2 \pm 0.1 ^{bc}	54.9 \pm 1.2 ^{ab}
PEF 3 (10 kV/cm, 19 pulses)	7.7 \pm 0.1 ^c	22.7 \pm 0.9 ^b	17.1 \pm 0.4 ^a	52.5 \pm 1.3 ^{bc}
PEF 4 (20 kV/cm, 38 pulses)	7.8 \pm 0.3 ^c	26.1 \pm 0.6 ^a	14.2 \pm 0.7 ^d	51.9 \pm 1.3 ^c
PEF 5 (15 kV/cm, 38 pulses)	8.6 \pm 0.6 ^c	20.9 \pm 0.5 ^{bc}	16.3 \pm 0.8 ^{bc}	54.2 \pm 0.8 ^{abc}
PEF 6 (10 kV/cm, 38 pulses)	8.8 \pm 1.0 ^c	20.8 \pm 0.8 ^c	16.5 \pm 0.1 ^{bc}	53.8 \pm 0.8 ^{abc}

*Treatments with different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$)

CD analysis revealed that the proteins present in PP were globally characterized by 16.3 \pm 0.3% α -helices, 14.0 \pm 0.3% β -sheets, 13.9 \pm 0.3% β -turns, and 55.7 \pm 0.7% random coils. These results fall within the ranges reported in the literature, where secondary structure analyses showed 2%-19% of α -helices, 31% -62% of β -sheets, 0% -32% of β -turns, and 12% -43% of random coils (Xiong et al., 2018; Gao et al., 2020; Sun et al., 2023). The observed deviations were attributed to differences in sample composition (concentrates or isolates), the pea genotypes studied, the processing methods applied (Lu et al., 2020b), and analytical techniques such as CD, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), or experimental conditions like the buffers used. The analyses of PP composition revealed a complex mixture comprising globulins (legumin, vicilin, convicilin), provicilin, lectins, albumins, prolamins, and glutelins, as well as subtypes such as legumin- α , legumin- β , vicilin- γ , and proteins like lipoxygenase (Fleury et al., 2022; Sun et al., 2023). These proteins were identified in both native and aggregated forms (Sun et al., 2023), contributing to the diversity of the observed secondary structures. Pre-treatment using PEF induced notable changes in the secondary

structure of PP. The percentage of α -helices was reduced by approximately half, while the proportion of β -sheets increased by about 1.5 times. In contrast, the proportions of β -turns and random coils remained relatively stable. These observations suggested that the PP underwent denaturation under the influence of PEF, with effects largely insensitive to variations in PEF operating parameters (electric field strength and number of pulses). A study conducted on PP by Guo et al. (2024) under PEF conditions of 5 to 15 kV/cm, 600 Hz, 6 μ s, and a residence time of 1 to 5 min revealed similar trends: a marked reduction in α -helices and a moderate increase in β -sheets, while random coils and β -turns remained minimally affected. Results from this study using FTIR demonstrated that PEF disrupted hydrogen bonds, which are essential for stabilizing secondary structures. According to Guo et al. (2024), the α -helices, being more sensitive to perturbations, were reduced, while β -sheets, stabilized by interchain hydrogen bonds, were favored. Random coils exhibited slight variations, reflecting a partial reorganization of disordered regions. These effects were attributed to the electric charges induced by PEF, which affected the inter- and intrachain interactions of the proteins. Furthermore, several previous studies confirmed that PEF led to structural changes in PP (Chen et al., 2023), as well as in other protein sources, including soy (Liu et al., 2011), sunflower (Subaşı et al., 2021), and canola (Zhang et al., 2017). Heating at 75 °C significantly altered the secondary structure of PP compared to their native state. The proportion of α -helices increased by a factor of 1.5, indicating a reorganization of secondary structures under heat, with stabilization of intrachain hydrogen bonds characteristic of these structures (Nakagawa & Ubbink, 2024). Simultaneously, β -sheets were reduced by a factor of 3.5, reflecting a significant disruption of interchain hydrogen bonds, which are particularly sensitive to thermal denaturation (Chao & Aluko, 2018). β -turns showed a moderate increase by a factor of 1.2, indicating local adaptations of the structure to compensate the loss of β -sheets and the increase in α -helices. These loops, stabilized by intrachain hydrogen bonds, played a key role in reorganizing destabilized segments (Nakagawa & Ubbink, 2024). Finally, random coils exhibited minimal variation, suggesting that these disordered regions remained largely intact under the effect of heat. These results confirmed that heating at 75 °C, close to the denaturation temperature of PP (76 °C), caused denaturation characterized by a reorganization of β -sheets into more flexible structures, such as α -helices and β -turns, accompanied by the exposure of hydrophobic regions (Hall & Moraru, 2021). These regions

promoted hydrophobic and electrostatic interactions, likely leading to extensive protein aggregation at temperatures ranging from 80 to 100 °C (Chao & Aluko, 2018). The comparison of PEF and thermal treatment at 75°C for PP and α -lactalbumin and 85°C for β -lactoglobulin revealed protein-dependent variations in structural modifications. While PP (75°C) and β -lactoglobulin (85°C) exhibited similar trends, with PEF and thermal treatment inducing distinct effects on secondary structure, α -lactalbumin (75°C) responded differently, showing comparable structural modifications under both treatments (Agoua et al., 2020 ; Hélorie, article 1). This contrast suggests that for PP and β -lactoglobulin, PEF and heat induce different conformational changes, whereas for α -LA, both treatments have a similar impact on secondary structure composition. These findings underscore the importance of protein-specific structural properties in determining the response to PEF and thermal processing, highlighting that the susceptibility to conformational changes is highly dependent on molecular characteristics.

5.7.1.2. Effect of PEF on accessible sulfhydryl groups of PP

Accessible sulfhydryl groups (-SH) of PP (native, heating and PEF) are shown in Figure 5.37.

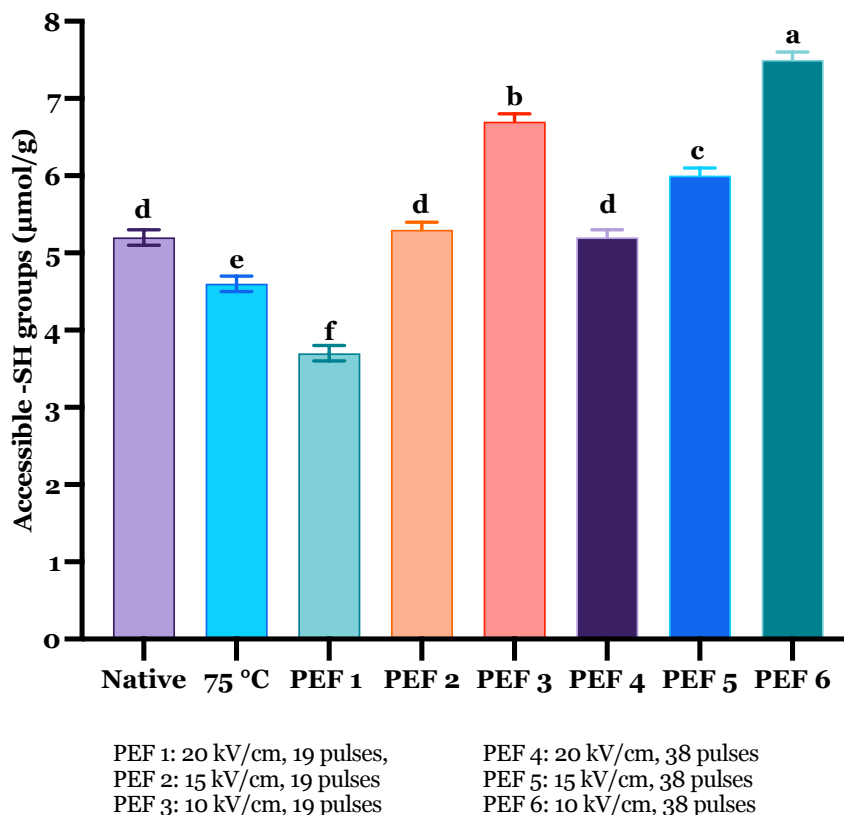


Figure 5.37. Accessible -SH groups of PP native, thermal and PEF pretreatments.

The analysis of accessible -SH groups in native PP was consistent with the literature, with a measured concentration of $5.2 \pm 0.1 \mu\text{mol/g}$ of protein. Indeed, for the same commercial PP, Shen et al. (2022) reported a value of $4.1 \pm 0.0 \mu\text{mol/g}$ of protein. Under the influence of PEF, the results indicated that the parameters (field strength, number of pulses, and pulse width) significantly influenced the exposure of accessible -SH groups. The exposure of accessible -SH groups decreased with increasing field strength. At 20 kV/cm, 19 pulses (PEF 1), a reduction of approximately 30% in accessible -SH group exposure was observed compared to the native PP, suggesting that high field strengths promote structural stabilization or protein aggregation. In contrast, at 10 kV/cm, 19 pulses (PEF 3), the exposure of accessible -SH groups increased by 30% relative to the native state, indicating that lower field strengths induce PP protein unfolding. This phenomenon appeared to be related to the breaking of disulfide bonds, facilitated by the production of free radicals and reactive species in the aqueous medium, which disrupted charge alignments and increased molecular entropy

(Shirley, 1995; Giteru et al., 2018; Dong et al., 2020). At 20 kV/cm and 38 pulses (PEF 4), the exposure of accessible -SH groups were statistically identical to that of native PP. These results indicate that the significant impact of high field strength can be offset by increasing the number of pulses. Subsequently, increasing the number of pulses amplified the exposure of accessible -SH groups. For the same field strength, doubling the number of pulses (from 19 to 38) led to a 15% to 40% increase in accessible -SH group exposure compared to native PP, depending on experimental conditions. This effect was particularly pronounced at 10 kV/cm (PEF 6), where a high number of pulses resulted in maximum exposure of accessible -SH groups. Conversely, high-strength fields (20 kV/cm) combined with a low number of pulses (19) reduced accessible -SH group exposure by 30%, likely by promoting aggregation or structural stabilization of the PP. These observations suggested that PEF treatments favored the oxidation of -SH groups leading to a formation of disulfide bonds, probably by spatially bringing protein molecules closer under the influence of electric fields. This process led to the formation of new disulfide bonds, which, in turn, promoted the aggregation of plant proteins and the formation of larger structures. Under the influence of heat treatment at 75°C, PP show a significant decrease in accessible -SH group exposure, with a reduction of approximately 10% compared to the native PP. This result can be attributed to the oxidation and conversion of sulfhydryl groups into disulfide bonds (Peng et al., 2016). Under stressful conditions, such as heat treatment, plant proteins undergo intensified hydrophobic interactions, promoting thiol-disulfide exchanges and the formation of new disulfide bonds. These mechanisms are primarily induced by the oxidation of -SH groups, thus contributing to significant structural modifications within the proteins (Peng et al., 2016; D'Alessio et al., 2023).

These observations are consistent with the secondary structure analyses obtained by CD, which revealed different mechanisms between heat treatment and PEF. However, unlike the CD results, where only the treatments differed, the PEF parameters here showed a direct impact on the structural modifications of PP.

5.7.1.3. Effect of PEF on surface hydrophobicity of PP

The surface hydrophobicity of native PP and those pretreated by heating or PEF is shown in Figure 5.38.

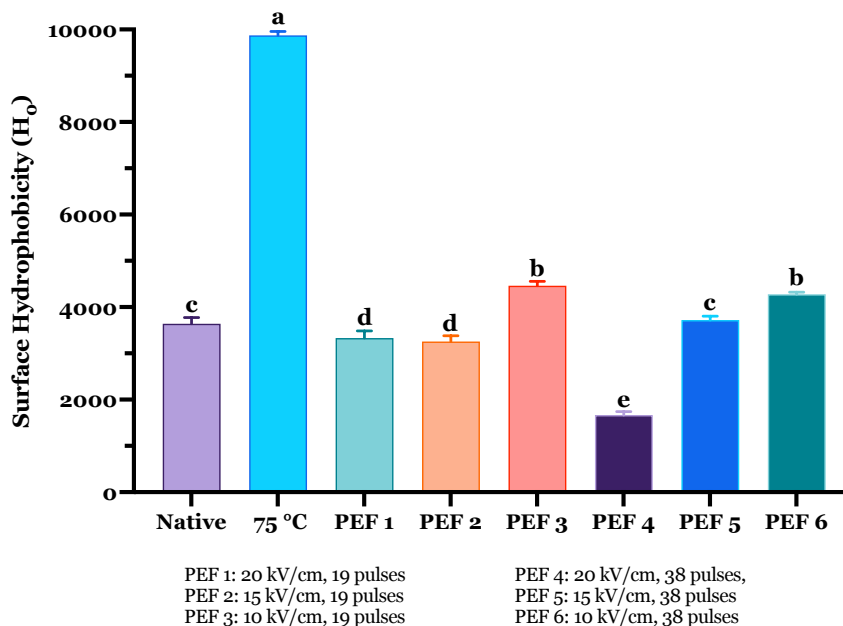


Figure 5.38. Surface hydrophobicity of native PP, and after thermal and PEF pretreatments.

The results showed that PEF treatments modified the hydrophobicity of PP compared to native samples, with variations depending on the applied parameters. Hydrophobicity is a key parameter for assessing protein conformation changes, reflecting both alterations in tertiary structure and surface configuration, directly related to their hydrophobic groups (Shen et al., 2022). At 20 kV/cm, PEF treatments 1 (19 pulses) and 4 (38 pulses) significantly decreased hydrophobicity. PEF 1 reduced hydrophobicity by 8.5% compared to native proteins, while PEF 4 led to a much greater reduction of 54.2%. These observations suggested that increasing the number of pulses amplified structural modifications, likely promoting protein aggregation. These findings aligned with Guo et al. (2024), who demonstrated that at field strengths between 5 and 15 kV/cm, PEF treatments caused significant PP structural reorganization, burying aromatic residues into internal hydrophobic regions. At 20 kV/cm,

these effects appeared amplified, resulting in a strong reduction in hydrophobicity and probable protein aggregation. At 15 kV/cm, the pretreatments produced moderate effects. Under PEF 2 (19 pulses), hydrophobicity decreased by 10.5%, while under PEF 5 (38 pulses), no significant difference was observed compared to native samples. These results suggested that, at this strength range, the number and width of pulses had only a limited impact on the hydrophobicity, as also observed by Guo et al. (2024) with electric field strength range (5-15 kV/cm), pulse durations of 6 μ s and residence times varying from 1 to 5 min. At 10 kV/cm, an opposite trend was observed. PEF treatments 3 (19 pulses) and 6 (38 pulses, 5 μ s) caused a significant increase in hydrophobicity, averaging 22.8% compared to native proteins. This increase reflected greater exposure of hydrophobic residues (e.g. Trp, Tyr, Phe) on the surface, indicating a structural perturbation distinct from that observed at higher field strengths. The fluorescence intensity, influenced by the local molecular environment of these aromatic residues, highlighted specific alterations in the PP structure (Zheng et al., 2021). These observations were consistent with other studies reporting similar effects on protein hydrophobicity, notably for soy protein isolate (Li et al., 2007), α -lactalbumin (Robles-López et al., 2012), rapeseed proteins (Zhang et al., 2017), and chicken myofibrillar proteins (Dong et al., 2020). However, these findings contrasted with Liu et al. (2014), who demonstrated that a gradual field strength increase up to 30 kV/cm in soy proteins led to increased aromatic residue exposure (tyrosine, tryptophan) and progressive protein unfolding. Beyond 30 kV/cm, protein reassembly was observed, resulting in reduced exposure of hydrophobic residues. These differences may be attributed to the intrinsic properties of the studied proteins (soy vs. pea), the nature of intramolecular interactions, or structural responses specific to the electric field strength and pulse number. Thus, these results highlighted the importance of PEF parameters in modulating the hydrophobicity of PP. At high intensity, treatments appeared to induce significant unfolding followed by protein aggregation, as confirmed by CD data and concentrations of accessible -SH groups. Conversely, at low intensity, the disruption seemed to favor the exposure of hydrophobic residues without causing notable reaggregation. Under thermal pretreatment at 75 °C, the surface hydrophobicity of PP increased by 171.2% compared to its native state, indicating significant denaturation. This thermal treatment exposed hydrophobic residues buried in the globular core (Hall & Moraru, 2021). Similar phenomena were also observed by other authors in pea proteins (Peng et al.,

2016) and soy proteins (Wang et al., 2012). CD analyses and accessible -SH group measurements suggested that this denaturation was accompanied by the oxidation of -SH groups into disulfide bonds, reinforcing thiol-disulfide interactions. These mechanisms, described by Peng et al. (2016) and D'Alessio et al. (2023), reorganized the tertiary structure of PP, increasing surface hydrophobicity and reducing structural flexibility.

5.7.2. Impact of PEF pretreatment on the DH of PP

Figure 5.39 illustrates the DH obtained after chymotryptic hydrolysis of PP subjected to pretreatments (native, heated, or PEF). The statistical data are shown in the SM.

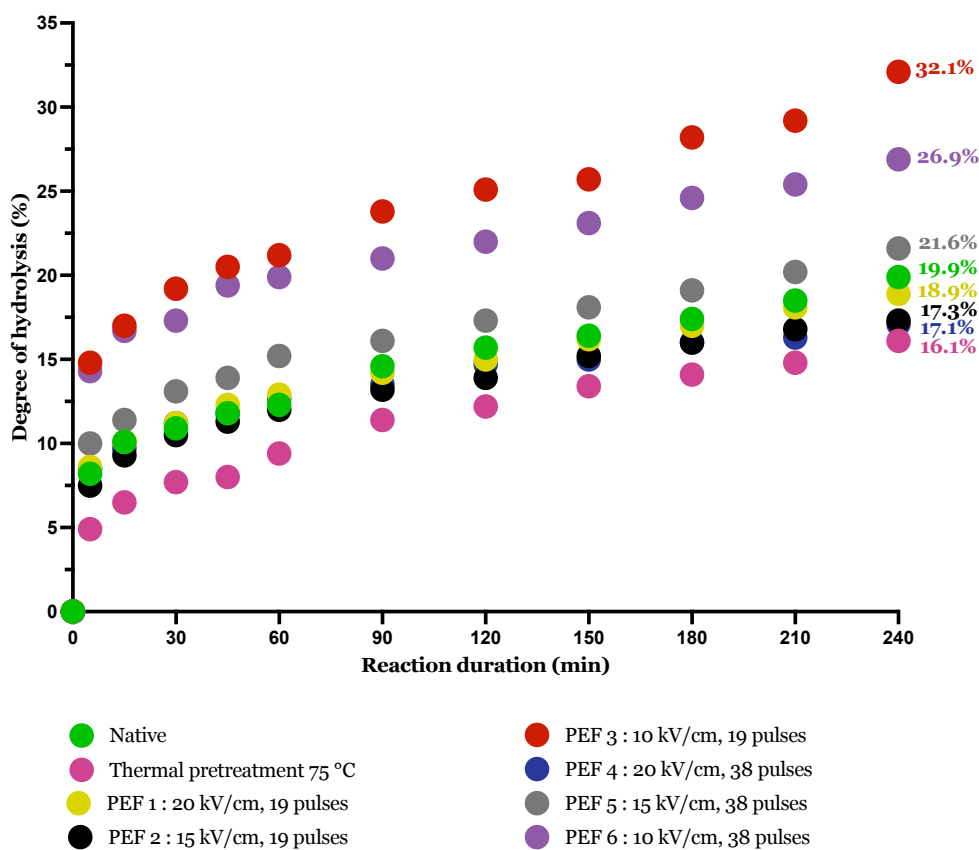


Figure 5.39. DH in function of reaction duration during chymotryptic hydrolysis of PP subjected to pretreatments (native, heated, or PEF).

A general trend was observed from the first 5 min of hydrolysis, where the DH was significantly higher for PEF conditions 3, 5, and 6 (PEF 3: 10 kV/cm, 19 pulses; PEF 5 : 15 kV/cm, 38 pulses and PEF 6 : 10 kV/cm, 38 pulses) compared to native and heated PP. These results suggested an accelerated hydrolysis under the effect of PEF. After 240 min of enzymatic hydrolysis, the native PP reached a DH of 19.9 ± 0.2 . In contrast, a previous study, which used chymotrypsin to hydrolyze PP for 120 min, reported a significantly lower DH (1.8 ± 0.7) compared to the 15.7 ± 0.2 obtained in the present study after an equivalent duration (García Arteaga et al., 2020). Several factors may explain these differences. First, the PP used in this study were supplied by a food company, whereas García Arteaga et al. (2020) prepared their isolates in the laboratory by extraction and isoelectric precipitation. The enzyme-substrate ratio and the hydrolysis temperature were also key factors, with a ratio set at 0.1% (w/w) and a temperature of 50 °C in their study, compared to 1.0% and 37 °C in this study, which increased the efficiency of hydrolysis. Moreover, the DH determination methodologies also varied: García Arteaga et al. (2020) used an approach based on the total number of peptide bonds, while the OPA method was applied in a present study. These variations, related to the origin of the PP and the experimental conditions, confirmed the impact of these parameters on the production of hydrolysates. Additionally, can observe the impact of PEF parameters on the DH of PP after 240 min of chymotryptic hydrolysis. The electric field strength emerged as a determining factor, with low fields (10 kV/cm) consistently leading to high DH values, regardless of the number of pulses. For instance, PEF condition 3 (10 kV/cm, 19 pulses) and PEF condition 6 (10 kV/cm, 38 pulses) resulted in DH values of $32.1 \pm 0.1\%$ and $26.9 \pm 0.3\%$, respectively, representing an increase of 61% and 35% compared to native PP ($19.9 \pm 0.2\%$). These results can be explained by the reorganization of charged amino acids (Asp, Glu, Lys, Arg, His) under the effect of the electric field, inducing partial unfolding of PP and improving the accessibility of cleavage sites for chymotrypsin, thereby increasing DH (Han et al., 2018; Pan et al., 2022). In contrast, higher field strengths (15 and 20 kV/cm) led to lower DH values, suggesting PP aggregation and reduced enzymatic site accessibility. The number of pulses also influenced DH, but this impact varied depending on the field strength. At 10 kV/cm, doubling the number of pulses from 19 (PEF 3) to 38 (PEF 6) resulted in a decrease in DH by approximately 16%. This could be attributed to the cumulative effect of a higher number of short pulses, which, despite

the low field strength, induced repeated structural disturbances in the PP, leading to conformational changes that reduced the accessibility of enzymatic cleavage sites. At a 15 kV/cm, increasing the number of pulses significantly improved DH, resulting in an increase of approximately 25 % from PEF 2 (19 pulses) to PEF 5 (38 pulses). However, these values remained lower than those obtained with a 10 kV/cm field strength (PEF 3 and PEF 6), suggesting that while medium conditions were enhanced by an increased number of pulses, they did not achieve the hydrolysis efficiency observed at 10 kV/cm field strengths. Finally, at a 20 kV/cm field strength, increasing the number of pulses reduced DH, with a decrease of approximately 10 % from PEF 1 (10 pulses) to PEF 4 (38 pulses). This reduction could be attributed to increased denaturation and aggregation of PP under the combined effect of high strength and many pulses, rendering cleavage sites less accessible to α -chymotrypsin. These results highlighted the importance of a balance between field strength and pulse number to modulate PP structure and enhance DH. PEF conditions 3, 5, and 6, previously characterized by an increase in accessible -SH groups and surface hydrophobicity like or higher than that of native PP, promoted better enzyme-substrate interactions, thereby improving hydrolysis. PEF induced controlled unfolding of PP through intra- and intermolecular interactions, exposing specific cleavage sites for α -chymotrypsin. Similar studies on proteins such as α -lactalbumin (Hélorie, Article 1), fava bean proteins (Ren et al., 2025), microalgae proteins (Akaberi et al., 2019), egg white (Liu et al., 2018), bovine muscle proteins (Chian et al., 2019), and β -lactoglobulin (Izquierdo et al., 2005; Mikhaylin et al., 2017; Agoua et al., 2020a) have also confirmed the positive effect of PEF on enzymatic hydrolysis. Conversely, PEF conditions 1, 2, and 4, characterized by high field strengths, led to a reduction in accessible -SH groups and surface hydrophobicity, likely limiting enzymatic accessibility through aggregation and resulting in decreased DH. Additionally, the response to PEF appears to be influenced by multiple factors, including the configuration of proteins in solution (whether as a pure single protein or a mixture of different proteins), their molecular size, and their conductivity. Moreover, in the case of protein concentrates, the presence of non-protein compounds may also contribute to structural and functional modifications, further impacting the effectiveness of PEF treatment. For instance, high field strengths sometimes promoted protein unfolding and improved enzymatic hydrolysis, as observed for α -lactalbumin and fava bean proteins (Hélorie, article 1 ; Ren et al., 2025). In contrast, in

other cases, high field strengths induced protein aggregation, as seen with PP in this study and microalgae proteins (Akaberi et al., 2019), limiting accessibility to the enzyme cleavage sites and reducing hydrolysis efficiency. Compared to native PP, heat treatment at 75 °C resulted in a significant decrease in DH (19%). This decrease could be attributed to the increased exposure of hydrophobic residues, as evidenced by the previously reported rise in surface hydrophobicity. This phenomenon promoted the formation of aggregates stabilized by hydrophobic and non-covalent interactions, thereby limiting the accessibility of enzymatic cleavage sites (Peng et al., 2016; Hall & Moraru, 2021; Li et al., 2024). Furthermore, CD analyses revealed an increase in α -helices and a decrease in β -sheets and turns, indicating a reorganization of secondary structure towards more ordered conformations. These structural and functional modifications explained the reduced accessibility of enzymatic cleavage sites, thereby limiting hydrolysis efficiency.

5.7.3. Impact of PEF pretreatment on eco-efficiency (EE)

The comparative impact of different pretreatments (thermal or PEF) on the EE of PP solutions was evaluated by analyzing the relationship between EC and the increase in the DH. A higher score indicates more effective and energy-efficient pretreatment conditions (Figure 5.40).

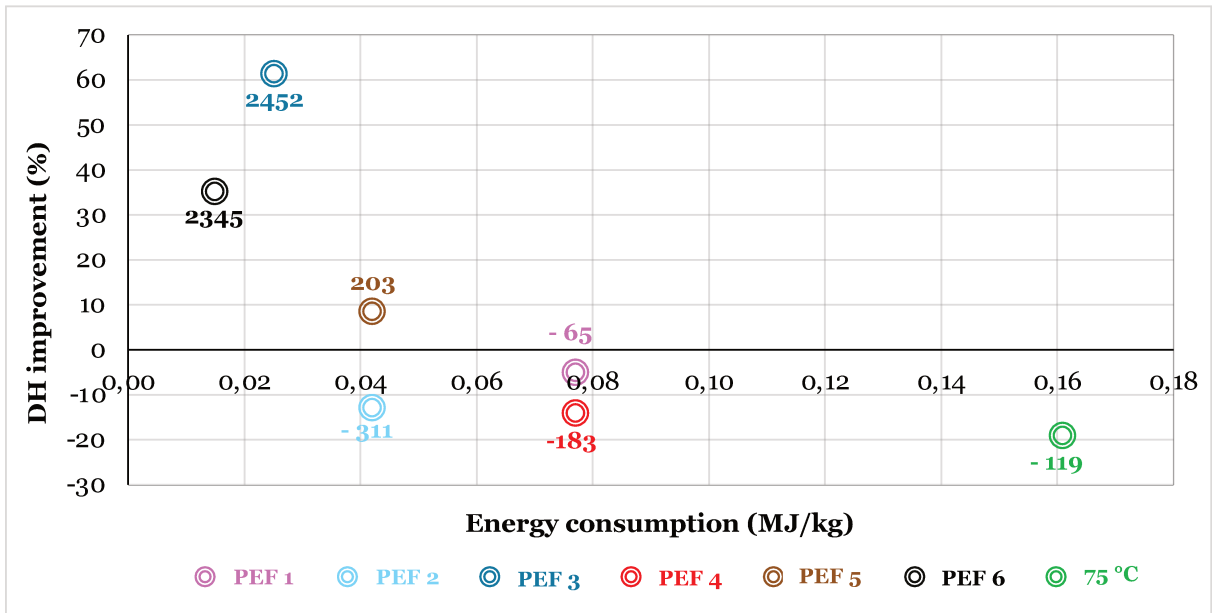


Figure 5.40. Eco-efficiency of PP: comparative analysis of PEF processing (PEF 1: 20 kV/cm, 19 pulses; PEF 2: 15 kV/cm, 19 pulses; PEF 3: 10 kV/cm, 19 pulses; PEF 4: 20 kV/cm, 38 pulses; PEF 5: 15 kV/cm, 38 pulses; PEF 6: 10 kV/cm, 38 pulses) and thermal pretreatment (75 °C).

The analysis of EE scores showed that the most eco-efficient conditions were achieved with PEF 3 (10 kV/cm, 19 pulses) and PEF 6 (10 kV/cm, 38 pulses). PEF 3 and 6 had an EE that was, on average, 2198% higher than that of thermal pretreatment at 75 °C, suggesting that they represented a more effective alternative to maximize DH in an eco-efficient manner. Furthermore, the analysis of EE scores based on the parameters of PEF revealed significant trends depending on the field strength and the number of pulses. At high field strength (20 kV/cm, PEF 1 and PEF 4 conditions), EE scores decreased by 182%, from PEF 1 (19 pulses) to PEF 4 (38 pulses), indicating a slight decrease in EE as the number of pulses increased. At a moderate field strength (15 kV/cm, PEF 2 and PEF 5 conditions), a significant improvement of 165% was observed, with the transition from PEF 2 (19 pulses) to PEF 5 (38 pulses) showing a beneficial effect of increasing the number of pulses. Conversely, for a low field strength (10 kV/cm, PEF 3 and PEF 6 conditions), a minimal decrease of 4% was observed between PEF 3 (19 pulses) and PEF 6 (38 pulses), with scores remaining generally high. These results suggested that EE was improved at a moderate field strength (15 kV/cm, PEF

5) and an increased number of pulses, while a low field strength (10 kV/cm, PEF 3 and PEF 6) delivered good performance in both configurations. These observations highlighted the importance of balancing field strength and pulse number to enhance the energy efficiency of PEF treatments.

5.7.4. PP peptide hydrolysates

5.7.4.1. Hydrolysates of PP obtained with free chymotrypsin

5.7.4.1.1. Identification PP peptide hydrolysates by RP-UPLC-MS/MS

A heatmap generated through hierarchical clustering (Figure 5.41) highlighted specific variations in the peptide regulation of PP populations under different experimental conditions. This approach enabled the examination of peptide population behavior (native PP, heat-pretreated, or PEF-pretreated) alongside the DH.

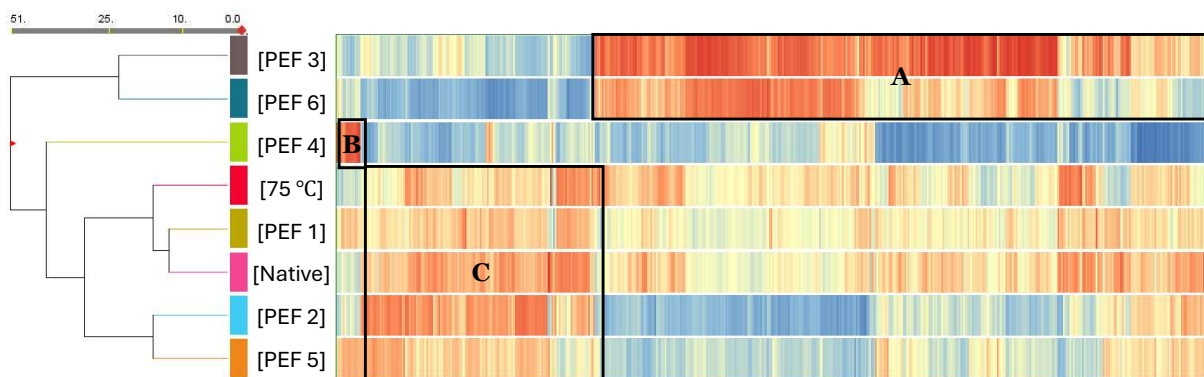


Figure 5.41. Heatmap and hierarchical clustering of specific peptides obtained through chymotrypsin digestion under different pretreatment conditions (native, thermal, and PEF). Similarities are assessed using Euclidean distance, and the color scale indicates the relative abundance of peptide ions: red for upregulation and blue for downregulation.

The heat map revealed seven clustering nodes, indicated on the left with their Euclidean distances (Figure 5.41). Shorter Euclidean distances reflected greater similarity between the

experimental conditions. Under the influence of PEF, many peptides showed upregulation, represented by red areas, highlighting the marked effect of PEF on peptide production or stability compared to the native condition. However, this upregulation varied depending on the applied PEF parameters. Three main trends were observed, justified by the Euclidean distance of the clustering nodes. The first trend concerns conditions with a field strength of 10 kV/cm, where PEF 3 and PEF 6 showed upregulation of 352 peptides, grouped in Box A. This broader regulation emphasized that low field strengths promoted a greater abundance of specific peptides. Next, conditions at 15–20 kV/cm, corresponding to PEF 1, 2, 4, and 5, also induced upregulation, but of different peptides grouped in Boxes B and C. Box B grouped 14 upregulated peptides, representing a 97% reduction compared to the 352 peptides observed in Box A. In contrast, Box C gathered 135 peptides, corresponding to a 62% decrease. These results indicate that low field strengths at 10 kV/cm promoted more abundant upregulation of a greater number of peptides. This is consistent with previous DH data, where PEF 3 and PEF 6 exhibited the highest values. Regarding the number of pulses, their impact appeared limited on the resulting peptide populations, as suggested by the close Euclidean distances between conditions with similar field strengths but different pulse numbers. For example, PEF 3 (10 kV/cm, 19 pulses) and PEF 6 (10 kV/cm, 38 pulses) exhibited similar peptide profiles grouped in Box A. Similarly, PEF 2 (15 kV/cm, 19 pulses) and PEF 5 (15 kV/cm, 38 pulses) shared similar characteristics, with peptides primarily located in Box C. However, a significant effect of pulse number was observed for high-strength field conditions tested (20 kV/cm). PEF 1 (20 kV/cm, 19 pulses) and PEF 4 (20 kV/cm, 38 pulses) revealed distinct peptide profiles, justified by a large Euclidean distance. Under PEF 1, 135 peptides were upregulated with high relative abundance. In contrast, under PEF 4, only 14 peptides were upregulated, and all other peptides exhibited low abundance or were entirely absent, as shown by the extended blue area. This suggested that increasing the number of pulses at 20 kV/cm significantly reduced the diversity and abundance of upregulated peptides. These findings align with previous DH data, where PEF 4 showed a 10% lower DH compared to PEF 1. Thus, electric field strength was a key parameter in peptide regulation of PP hydrolysates, with low field strengths (10 kV/cm) favoring more abundant and diverse upregulation (Box A), while high field strengths (20 kV/cm) combined with an increased number of pulses limited this diversity (Box B). The role of pulse number appeared secondary

at low or medium strength but became critical at high strength. These findings confirmed the complex effect of PEF parameters on peptide populations and their link to variations in the DH. In comparison, the heat pretreatment at 75 °C showed a relatively close Euclidean distance to the native condition, indicating slight differences in the regulated peptide populations. The observed peptides are primarily identical to those in the native condition but exhibit reduced abundance, suggesting that heating limited their release or stabilization. This result highlights that, although heat pretreatment does not alter peptide diversity, it reduces the relative abundance of peptides, which could limit their functionality in specific applications. These observations are consistent with the results obtained for the DH, which revealed a significant (21%) decrease under the 75 °C condition compared to the native condition. Interestingly, 256 peptides were shared across all conditions, regardless of the treatment applied. This can be explained by the presence of structurally robust or intrinsically accessible protein regions to chymotryptic hydrolysis, irrespective of the denaturation or structural rearrangements induced by PEF or thermal treatments. Their presence highlighted the resilience of certain protein regions to structural modifications. Furthermore, unique peptides were observed under each condition (e.g., 78 for the native condition, 81 for the condition heated at 75°C, and between 60 and 141 for the various PEF conditions). This reflected distinct mechanisms of action associated with the different treatments. These specific peptides may have resulted from the way each treatment altered the protein structure, either exposing or masking certain chymotrypsin-specific hydrolysis sites. This variability provided further evidence of the differentiated impact of PEF and heating on the modulation and diversity of peptide populations.

Finally, the PEF 3 and 6 conditions clearly stood out from the native PP or those pretreated by heating at 75 °C, due to their ability to induce a more diverse and abundant regulation of peptides. These PEF conditions caused targeted and efficient structural modifications, promoting enhanced hydrolysis and the release of specific peptides.

5.7.4.1.2. Screening bioactivities

Among the 1625 peptides analyzed, only one, LSSGDVF, was previously documented in the literature for its bioactivity, specifically its antihypertensive effect. The remaining 1624

peptides were evaluated based on physicochemical characteristics associated with antihypertensive and antidiabetic activities to predict their bioactive potential. As a result, 109 peptides were identified as potentially antidiabetic and 287 as potentially antihypertensive. A total of 41 sequences were potentially antidiabetic and antihypertensive (Figure 5.42).

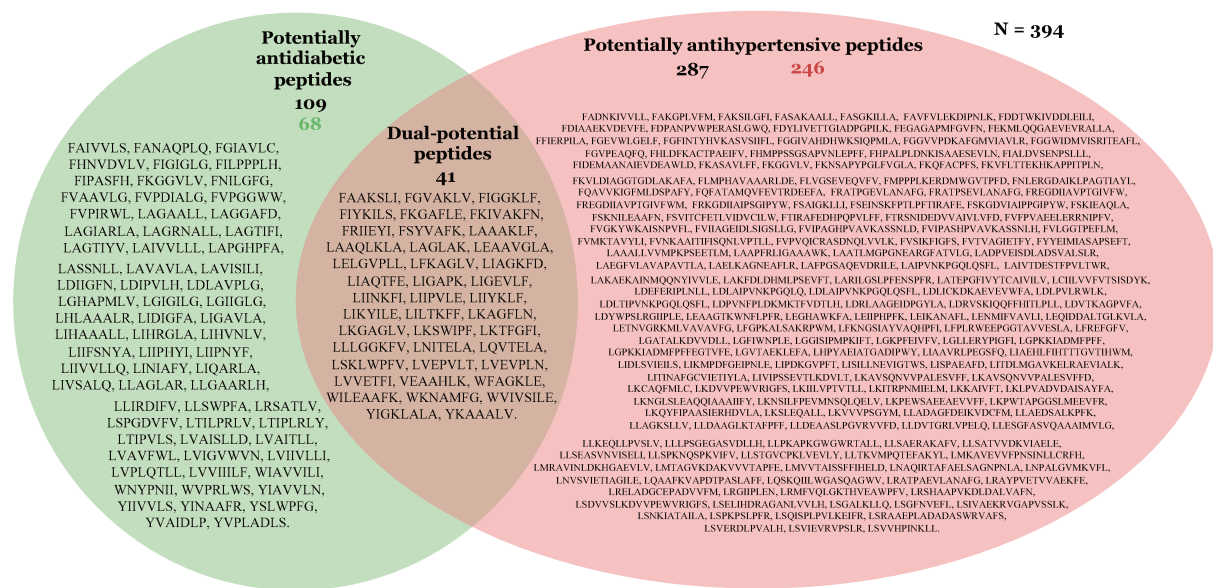


Figure 5.42. Venn Diagram : potentially antihypertensive and antidiabetic peptides sequences. The number in green represents the sequences with exclusively antidiabetic potential, while the number in red indicates those with only an antihypertensive potential.

The analysis of antihypertensive and antidiabetic peptides revealed that PEF conditions 3 (10 kV/cm, 19 pulses) and 6 (10 kV/cm, 38 pulses) have promoted a significant increase in the abundance of these specific peptides (Box A, Figure). Since PEF 3 previously exhibited a higher DH compared to PEF 6, the selected conditions for the combined approach, incorporating PEF and enzymatic hydrolysis with immobilized α -chymotrypsin, included the native treatment, thermal pretreatment at 75 °C, and PEF 3 conditions.

5.7.4.2. Hydrolysates of PP obtained with alumina@CTMS@APTES@DOP@chymotrypsin

5.7.4.2.1. Identification PP peptide hydrolysates by RP-UPLC-MS/MS

The influence of chymotrypsin immobilization, combined with different pretreatments, on the production of peptide hydrolysates was evaluated by analyzing the relative abundances of peptide populations. The experimental conditions included PP in their native state, heated at 75 °C, or pretreated with PEF 3 (10 kV/cm, 19 pulses). A hierarchical clustering analysis was performed, and the results were presented as a heat map (Figure 5.43). To study the impact of enzyme immobilization on the composition of peptide populations, the DH was kept constant for each experimental condition (native, PEF 3, 75°C), regardless of the enzyme state (free or immobilized). For example, for native PP, the DH was $19.9 \pm 0.2\%$ for both the free and immobilized enzyme. Similarly, for the other conditions, the DH values were identical between the two enzyme states: DH (PEF 3) = $32.1 \pm 0.1\%$ and DH (75°C) = $16.1 \pm 0.6\%$. Only the hydrolysis time was adjusted for each condition to ensure that the observed differences in peptide composition resulted solely from the effect of enzyme immobilization and not from variations in the DH.

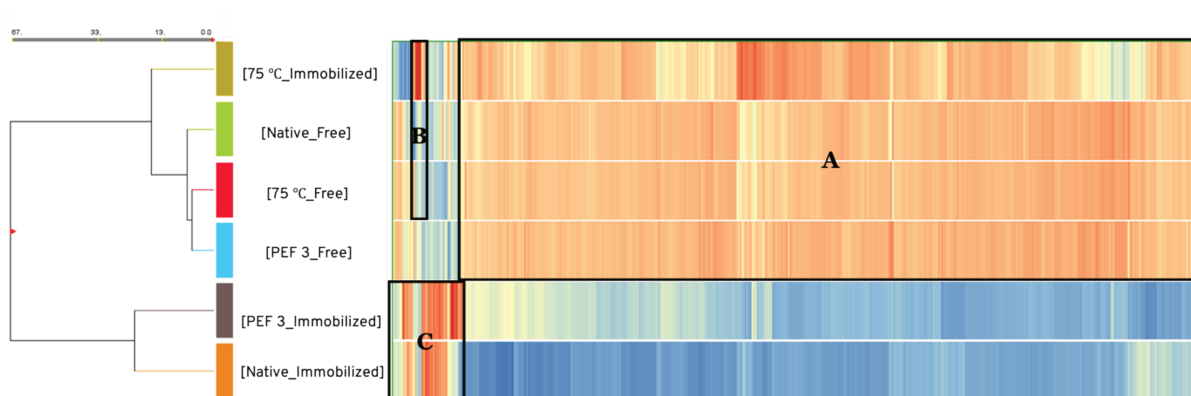


Figure 5.43. Heat map and hierarchical clustering of specific peptides obtained by digestion with free or immobilized chymotrypsin under different pretreatment conditions (native, thermal 75 °C and PEF 3). Similarities are assessed using Euclidean distance, and the color scale indicates the relative abundance of peptide ions: red for up-regulation and blue for down-regulation.

The heat map revealed five distinct clusters based on hierarchical clustering analysis. Using Euclidean distance, the most similar conditions corresponded to the three hydrolysates produced by free chymotrypsin, which formed a homogeneous group (Box A). The condition closest to this group was the hydrolysate obtained by hydrolysis with immobilized chymotrypsin pretreated at 75 °C (Box A). Conversely, the hydrolysates generated under native and PEF 3 conditions with immobilized chymotrypsin exhibited similar profiles to each other but were clearly distinct from the other four conditions, indicating greater divergence in their peptide composition (Box C). The hydrolysates from the native conditions contained 504 peptides, characterized by an average relative abundance (Box A). Two main trends were identified. First, a notable difference emerged between the hydrolysates produced by free and immobilized chymotrypsin under Native and PEF 3 conditions. Those obtained with immobilized chymotrypsin were marked by a low abundance or even absence of peptides associated with Box A, whereas peptides from Box C were generated in large abundance (50 peptides). In contrast, the hydrolysates produced by free chymotrypsin displayed a low relative abundance of Box C peptides. These observations suggest that enzyme immobilization possibly alters its specificity and redirects cleavage pathways. The steric constraints induced by immobilization could limit access to specific substrate sites at the active site, explaining the reduced peptides in Box A. Furthermore, immobilization seems to stabilize certain enzyme-substrate interactions, promoting the production of peptides specific to Box C. Secondly, a different trend was observed under the 75°C condition. The peptides generated by both free and immobilized chymotrypsin were identical (Box A), but their relative abundance was higher in the hydrolysates produced by the immobilized enzyme. Moreover, some peptides that were present in low abundance in the 75°C condition with free chymotrypsin became highly abundant in the 75°C condition with immobilized chymotrypsin (Box B). This indicates that, although immobilization did not alter the nature of the peptides generated, it significantly influenced their relative abundance, favoring the production of specific peptides. Consequently, unlike the Native and PEF 3 conditions, where immobilization appeared to affect enzymatic selectivity, this condition highlights a redistribution of the generated peptides, suggesting that immobilization can modulate quantitative peptide production without directly affecting overall enzymatic specificity.

5.7.4.2.2. Venn Diagram of PP hydrolysates

To analyze the relationships between peptide populations generated under different experimental conditions (native, heated at 75 °C, pretreated with PEF3: 10 kV/cm, 19 pulses, hydrolyzed by free or immobilized chymotrypsin), a Venn diagram was created (Figure 5.44).

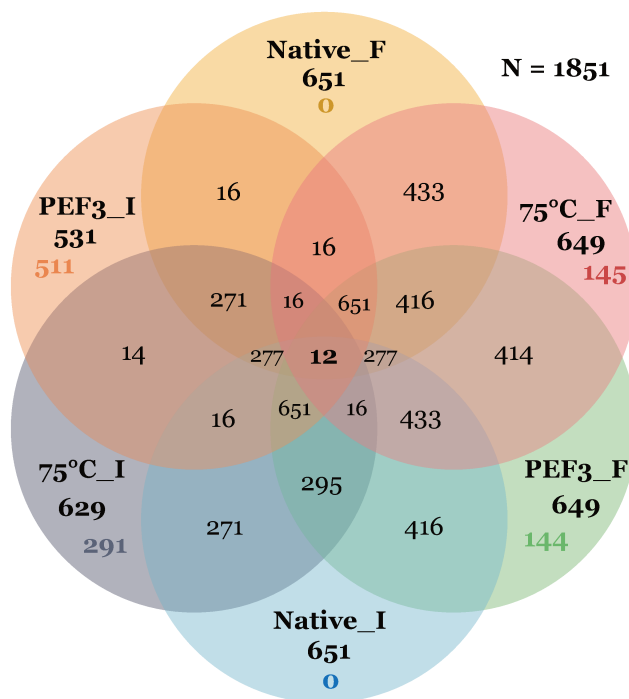


Figure 5.44. Venn diagram of peptides in PP hydrolysates. Sequences common to two or more fractions are shown in black, and unique sequences are shown in condition color. Native_F: peptides obtained from pea proteins by free chymotrypsin. Same principle for 75 °C_F and PEF3_F. Native_I: peptides obtained from pea proteins by immobilized chymotrypsin. Same principle for 75 °C_I and PEF3_I.

Among the 1851 identified peptides, none were found exclusively in the Native-free and Native-immobilized conditions. Conversely, 145 peptides were specific to the 75 °C-free condition, 144 to PEF3-free, 291 to 75 °C-immobilized, and 511 were unique to PEF3-immobilized. These observations can be explained by the absence of physical pretreatment in the native conditions. Without heating or PEF, proteins retain their compact three-dimensional structure, limiting chymotrypsin's access to certain cleavage sites. In contrast,

heating at 75 °C or applying PEF induced partial denaturation or reorganization of secondary and tertiary structures, thereby exposing new sites to enzymatic action. These structural alterations may explain the production of specific peptides under pretreated conditions, unlike native conditions, where the generated peptides are mostly shared with other treatments.

The Venn diagram also revealed that the experimental condition of PEF3 combined with hydrolysis by immobilized chymotrypsin generated the largest number of unique peptides. This condition alone produced 511 unique peptides, representing 96% of the PEF3 population and 28% of all identified peptides. This increased specificity may be attributed to a modified enzyme selectivity after immobilization. This result was corroborated by the heat map (Box C, Figure), which also highlighted significant variations in the distribution and relative abundance of peptides when chymotrypsin was immobilized. Finally, the presence of 12 sequences common to all fractions indicated that certain cleavage sites were particularly accessible and conserved, regardless of treatment or hydrolysis method (free or immobilized chymotrypsin). These common peptides appear to originate from protein regions whose structure remains largely unchanged, irrespective of heating, PEF treatment, or hydrolysis method used.

5.7.4.2.3. Screening bioactivities

Among the 1 851 peptides analyzed, only one, LSSGDVF, previously identified in the bioactivity predictions of hydrolysates produced by free chymotrypsin, has been reported in the literature for its antihypertensive effect. The remaining 1 850 peptides were evaluated based on physicochemical criteria associated with antihypertensive and antidiabetic bioactivities to predict their bioactive potential. This analysis identified 129 potentially antidiabetic peptides, 62 of which were specific to the hydrolysates produced by immobilized chymotrypsin. Additionally, 401 peptides were predicted to have antihypertensive activity, with 201 being exclusive to the hydrolysates generated by the immobilized enzyme. These findings highlighted the critical role of enzymatic immobilization in generating unique potentially bioactive peptides. Unlike free chymotrypsin, immobilization altered substrate accessibility to the chymotrypsin active sites, thereby promoting the production of specific

peptides. Furthermore, the binding of chymotrypsin to alumina slightly altered its three-dimensional structure, influencing its selectivity for certain cleavage sites on the PP and enabling the production of more diverse peptides (Wu et al., 2015; Mazzocato & Jacquier, 2024). These mechanisms explain why a significant proportion of bioactive peptides was exclusively generated by immobilized chymotrypsin. The sequences of potentially bioactive peptides generated from the hydrolysis of PP using immobilized chymotrypsin are detailed in the Figure 5.45.

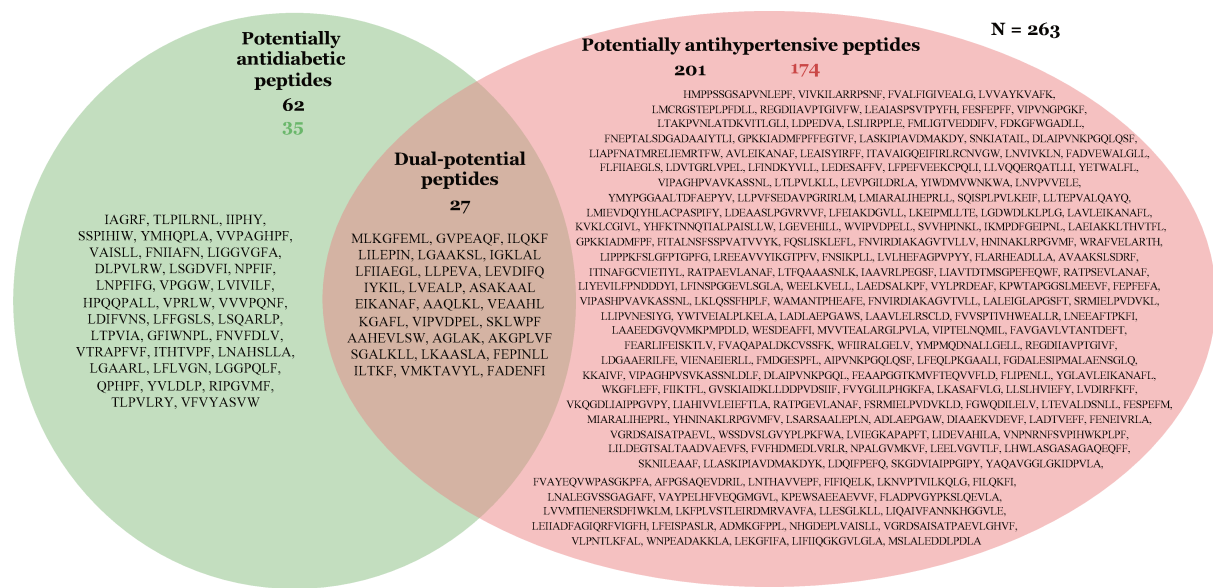


Figure 5.45. Venn diagram: Potentially antihypertensive and antidiabetic peptide sequences obtained from immobilized chymotrypsin. The number in green indicates sequences with exclusively antidiabetic potential, while the number in red indicates those with only antihypertensive potential.

The analysis of the relative abundances of potentially antihypertensive and antidiabetic peptides revealed significant variations between the protein hydrolysate pretreated with PEF under condition 3, followed by hydrolysis using immobilized chymotrypsin, and other experimental conditions. Several peptides, such as AAHEVLSW, AAQLKL, and ADLAEPGAW, exhibited marked variations in relative abundance in the PEF condition 3 combined with immobilized chymotrypsin hydrolysis. For instance, the peptide ADLAEPGAW showed a notable increase in relative abundance under this condition compared to native PP hydrolyzed with immobilized chymotrypsin (+41.6%) and PP

pretreated with PEF under condition 3 and hydrolyzed with free chymotrypsin (+318.7%). This peptide was found in Box B of the heat map (Figure 5.43). Conversely, a significant decrease in relative abundance was observed for the peptide AAHEVLSW, with values 134.2% and 121.6% lower compared to native PP hydrolyzed with free chymotrypsin and PP pretreated with PEF under condition 3 and hydrolyzed with free chymotrypsin, respectively. This peptide was found in Box A of the heat map (Figure 5.43). These results highlighted the combined impact of PEF 3 and chymotryptic hydrolysis using an immobilized enzyme on modulating the peptide profile. PEF improved the accessibility of cleavage sites in PP, while chymotrypsin immobilization enhanced the stability and specificity of catalytic activity. Consequently, this combination enriched certain potentially bioactive peptides while influencing their relative distribution compared to other conditions. These observations support the idea that the PEF strategy and hydrolysis using an immobilized enzyme constitute a promising approach for the targeted production of bioactive peptides, suitable for functional or therapeutic applications.

5.8. Conclusion and perspectives

This study demonstrated that PEF enhance the chymotryptic hydrolysis of PP. PEF pretreatments 3 (10 kV/cm, 19 pulses) and 6 (10 kV/cm, 38 pulse) significantly increased the DH compared to untreated or preheated PP at 75 °C. These results can be attributed to structural alterations induced by PEF, including an increase in β -sheets and β -turns, accompanied by a decrease in α -helices, leading to increased structural disorder. These modifications promoted greater accessibility of sulfhydryl groups and enhanced surface hydrophobicity, disrupting intermolecular interactions and facilitating the partial unfolding of PP. These structural changes directly contributed to the improvement in enzymatic hydrolysis, as evidenced by the increase in DH and the enhanced production of potentially bioactive peptides, including antihypertensive and antidiabetic sequences previously unreported in the literature. Moreover, PEF pretreatments 3 and 6 demonstrated greater eco-efficiency compared to thermal treatment. While most studies involving PEF focus on modifying protein structure and enhancing enzymatic hydrolysis, the research conducted in

this study also incorporated chymotrypsin immobilization and its impact on the resulting peptide hydrolysates. This approach not only led to possible differences in the selectivity of enzymatic cleavage, but also enabled the generation of potentially bioactive peptides, such as ADLAEPGAW, that have not been previously documented in the literature. Future research should delve deeper into evaluating the bioactivity of hydrolysates both *in vitro* and *in vivo* to expand their potential applications in food or therapeutic contexts. Additionally, further improvement of enzyme immobilization protocols could further enhance the production and diversity of generated bioactive peptides. Equally important is the identification of immobilization conditions that preserve peptide profiles similar to those of the native protein, or the selection of pretreatments (such as 75°C) that promote the consistent production of specific peptides, ensuring greater reproducibility in hydrolysate composition. In conclusion, this study proposes an innovative and sustainable strategy for valorizing plant proteins. By combining PEF treatments with enzyme immobilization, it opens new avenues to produce high-value bioactive peptides in protein-rich food matrices.

5.9. Supplementary Material

Table 5.6. Statistical analysis of DH evolution across different treatments (native, heat and PEF) during PP enzymatic hydrolysis.

	Level of significance											
	Hydrolysis duration (min)											
	0	5	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240
Native	a	c, d	c	d	d	d, e	d	d	d	d	d	d
Heat treatment 75 °C	a	e	d	e	e	f	f	f	f	f	f	g
PEF 1	a	c	c	d	d	d	d,e	d,e	d	d	d	e
PEF 2	a	d	c	d	d	e	e	e	e	e	e	f
PEF 3	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
PEF 4	a	c	c	d	d	d, e	e	d,e	e	e	e	f
PEF 5	a	b	b	c	c	c	c	c	c	c	c	c
PEF 6	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b

*Treatments with different letters within a column are significantly different ($P < 0.05$).

Credit authorship contribution statement

Hélorie Clouzot: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Sergey Mikhaylin:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Rénato Froidevaux:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Mélanie Faucher:** Student assistance for analysis, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Jacinthe Thibodeau:** Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Laurent Bazinet:** Methodology, Validation, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This research was funded by the University of Lille, France (European Metropolis of Lille and the Isite-ULNE within the framework of the Charles Viollette Industrial Chair) and Université Laval Québec, Canada (NSERC Discovery grant, RGPIN-2017-05970). Financial support of the Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF, Quebec, Canada) and the Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQNT) is also acknowledged. The researchers would like to thank all participants for their time and their interest in the study.

6. Chapitre 6 – Discussion Générale

Les résultats exposés dans cette thèse témoignent d'une étude approfondie visant à améliorer l'hydrolyse enzymatique en vue de la valorisation des protéines agroalimentaires (α -LA et PP) en produits à haute valeur ajoutée, notamment des peptides aux propriétés bioactives. Les méthodes conventionnelles d'hydrolyse enzymatique présentent plusieurs limitations majeures. D'une part, la structure globulaire et compacte des protéines peut limiter l'accessibilité aux sites de clivage enzymatiques, réduisant ainsi l'efficacité du processus (Dullius et al., 2018). D'autre part, l'utilisation d'enzymes libres entraîne une faible stabilité catalytique et un usage unique, ce qui augmente les coûts de production (Sheldon et al., 2021). Enfin, les procédés thermiques, souvent employés pour induire une modification structurelle des protéines et améliorer l'efficacité enzymatique, entraînent une consommation énergétique élevée, pouvant compromettre la durabilité des procédés (Nicoleta et al., 2010; Jovanović et al., 2016; Agoua et al., 2022).

Jusqu'à présent, les recherches sur l'optimisation de l'hydrolyse enzymatique des protéines se sont principalement focalisées soit sur l'application des technologies athermiques, notamment les CEP, pour moduler la structure des protéines et améliorer leur susceptibilité à l'action enzymatique (Mikhaylin et al., 2017; Agoua et al., 2020 ; Agoua et al., 2022), soit sur l'immobilisation enzymatique afin d'accroître la stabilité et la recyclabilité des enzymes dans le cadre de l'hydrolyse des protéines (Bayramoglu et al., 2020). Toutefois, bien que ces approches aient été explorées de manière indépendante, aucune étude ne s'est jusqu'à présent intéressée à leur combinaison. Cette thèse constitue ainsi la première étude intégrant l'association des CEP et de l'immobilisation enzymatique dans le but d'améliorer simultanément l'accessibilité enzymatique, la sélectivité du clivage des liens peptidiques et l'éco-efficience du procédé de production des peptides ayant les activités biologiques.

À cette fin, une hydrolyse enzymatique a été réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, l'enzyme sous forme libre a été utilisée afin d'évaluer l'effet des CEP sur la structure des protéines natives et leur impact sur la composition des hydrolysats. Dans un second temps, l'hydrolyse a été effectuée avec l'enzyme immobilisée pour analyser spécifiquement

l'influence de l'immobilisation sur les produits de l'hydrolyse. Enfin, la combinaison des deux procédés a été examinée afin d'analyser leur effet conjoint sur la production de peptides. Cette approche progressive a permis d'établir une preuve de concept avec l' α -LA, protéine modèle bien caractérisée, avant son application aux PP, un mélange protéique plus complexe d'intérêt industriel et stratégique pour l'exploitation de sources protéiques végétales.

Le **premier objectif spécifique** de cette étude a été d'évaluer l'impact des CEP sur les protéines agroalimentaires et leur hydrolyse par la α -CT libre. Cette technologie verte émergente a permis d'induire des modifications structurelles des protéines grâce à un contrôle précis de divers paramètres, améliorant leur susceptibilité enzymatique et offrant ainsi une alternative prometteuse aux techniques conventionnelles (Figure 6.46).

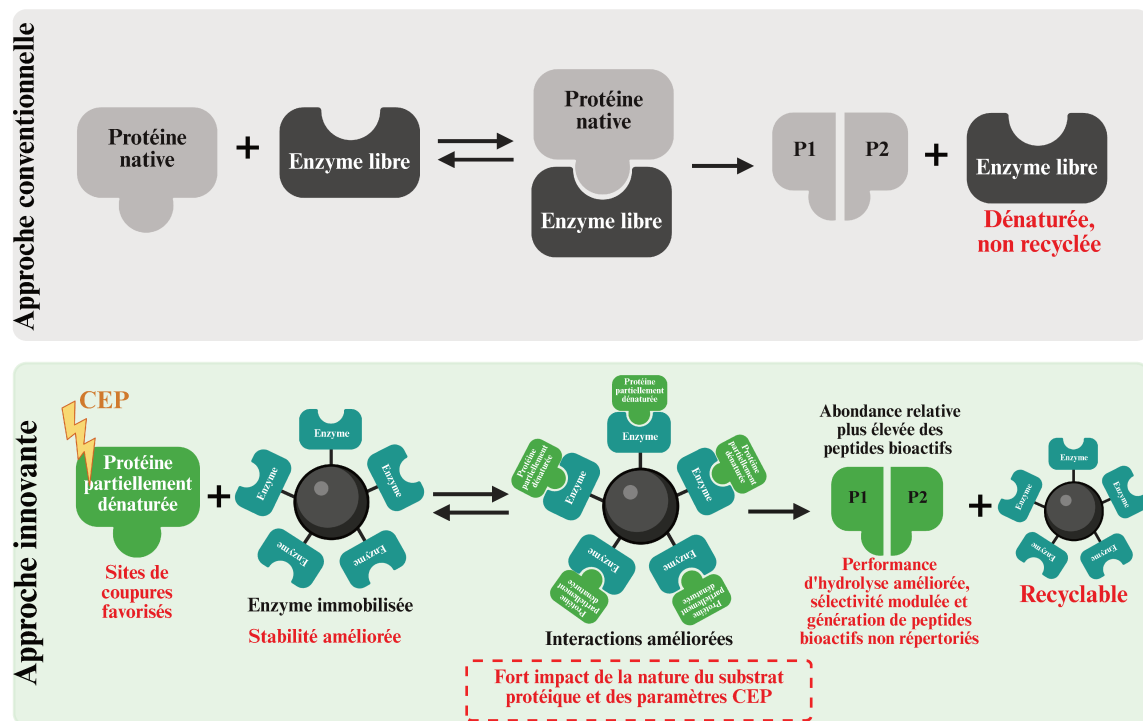


Figure 6.46. Effet combiné des CEP et de l'immobilisation enzymatique sur la production d'hydrolysats de peptides bioactifs de l' α -LA et des PP.

Impact des CEP sur la modification de la structure protéique et leur hydrolyse

Effets des CEP sur l' α -LA

L'application de conditions spécifiques de CEP sur l' α -LA a induit une modification substantielle de sa structure secondaire et tertiaire. Des paramètres élevés en termes de force du champ électrique et de nombre d'impulsions (15 kV/cm, 75 impulsions ou 20 kV/cm, 37 impulsions) ont exercé une influence déterminante sur la dénaturation partielle de l' α -LA. En effet, l'augmentation de ces paramètres a permis un contrôle plus précis du processus de dénaturation, favorisant ainsi une meilleure exposition des sites de clivage à l' α -CT. Toutefois, l'intensification de ces conditions expérimentales s'est avérée limitée par la conductivité intrinsèque de la solution d' α -LA, laquelle a constitué un facteur limitant en empêchant l'augmentation de l'intensité du champ électrique ou du nombre d'impulsions sans induire la formation d'arcs électriques. Malgré cette contrainte, une diminution significative de la proportion des hélices α , couplée à une augmentation des feuilletts β , a été observée. Ces modifications structurales se sont accompagnées d'une élévation de la concentration des groupements -SH accessibles ainsi que d'une augmentation de l'hydrophobicité de surface, ce qui a renforcé l'accessibilité des sites de clivage à l' α -CT. Ce phénomène de dénaturation induit par le CEP a conduit à une amélioration notable du DH, qui a été multiplié par un facteur de 2 sous cette condition, ainsi qu'à une augmentation de l'abondance relative de 32 peptides sur les 35 identifiés, atteignant plus de 200 % par rapport à l' α -LA native. Néanmoins, la modification structurale induite par ce traitement s'est révélée plus efficace que celle obtenue par un prétraitement thermique conventionnel, à l'exception de celui réalisé à 75 °C, qui a entraîné une dénaturation partielle de l' α -LA et une augmentation du DH par un facteur de 4. Toutefois, l'abondance relative des 32 peptides générés n'a progressé que de 128 % par rapport à l' α -LA native. Ces résultats mettent en évidence le fait que, bien que le DH constitue un indicateur clé de la dénaturation des protéines et de l'efficacité de leur hydrolyse enzymatique, il ne permet pas, à lui seul, d'évaluer de manière exhaustive la production des peptides obtenus. Une hydrolyse excessive peut même s'avérer contre-productive. Ainsi, un prétraitement thermique à 90 °C a induit une aggrégation de l' α -LA, aboutissant à un DH similaire à celui de l' α -LA native et à une abondance relative des peptides qui est restée proche de celle observée en l'absence de

traitement. Par ailleurs, un prétraitement thermique à 85 °C a eu un effet plus modéré, induisant une augmentation du DH d'un facteur de 1,7, tandis que l'abondance relative des 32 peptides n'a progressé que de 69 % par rapport à l' α -LA native. Ces observations soulignent la nécessité d'adopter une approche intégrée qui prenne en compte non seulement le DH, mais également la nature des peptides générés et leurs activités biologiques, afin d'évaluer avec précision l'efficacité du processus d'hydrolyse. Cette démarche est essentielle pour optimiser la valorisation des protéines agroalimentaires et leur transformation en produits à haute valeur ajoutée.

Effets des CEP sur les PP

Les PP ont manifesté une réponse distincte aux CEP par rapport à l' α -LA, leur efficacité étant fortement conditionnée par la force du champ électrique et le nombre d'impulsions appliquées. Une force de champ modérée (10 kV/cm) couplée à un nombre restreint d'impulsions (19) constitue un exemple de condition ayant permis d'induire une dénaturation partielle, facilitant ainsi l'accessibilité des sites de clivage à l' α -CT. Cette dénaturation contrôlée s'est traduite par des modifications structurales notables, caractérisées par une diminution des hélices α , une augmentation des feuilletts β , ainsi qu'une élévation de la concentration des groupements -SH accessibles et de l'hydrophobicité de surface. Ces altérations structurales ont renforcé la sensibilité des PP à l'hydrolyse enzymatique, se traduisant par une augmentation du DH par un facteur de 1,6 et une hausse de l'abondance relative des peptides d'environ +140 % par rapport aux PP natives. Toutefois, contrairement à l' α -LA, une force de champ trop élevée a induit une dénaturation excessive des PP, entraînant une agrégation des protéines et réduisant ainsi l'accessibilité enzymatique. Un effet similaire a été observé avec un prétraitement thermique à 75 °C, qui a favorisé une forte agrégation protéique, limitant significativement la disponibilité des sites de clivage.

Synthèse des effets des CEP

Ces résultats mettent en évidence l'influence conjointe de la nature de la protéine et des paramètres des CEP sur l'efficacité du processus de dénaturation et d'hydrolyse enzymatique. En effet, plusieurs études ont démontré que l'application des CEP induit une modification structurales au sein de nombreuses protéines, notamment celles du lactosérum,

du canola, du soja, ainsi que des protéines myofibrillaires de poulet. Ces altérations se traduisent principalement par une réduction des hélices α , une augmentation des feuillets β , ainsi qu'une élévation des groupements -SH accessibles et de l'hydrophobicité de surface (Y. Li et al., 2007; Xiang et al., 2011; Zhao & Yang, 2012; Mikhaylin et al., 2017; L. Zhang et al., 2017; Agoua et al., 2020a; Dong et al., 2020; Xu et al., 2021; Axelrod et al., 2022). Toutefois, bien que ces réarrangements structuraux présentent une dynamique similaire pour l' α -LA et les PP, leur impact diffère en termes de dénaturation et de sensibilité à l'hydrolyse enzymatique. L'efficacité des CEP est intrinsèquement conditionnée par les propriétés intrinsèques des protéines ainsi que par les paramètres appliqués, notamment la force du champ électrique et le nombre d'impulsions. Ces facteurs modulent l'accessibilité des sites de clivage, régissant ainsi le processus d'hydrolyse enzymatique. Plusieurs études ont corroboré cette influence : dans le cas des protéines musculaires bovines, une intensification du champ électrique et une augmentation du nombre d'impulsions se traduisent par une élévation significative du DH, suggérant une facilitation de l'accès aux sites de clivage (Chian et al., 2019). À l'inverse, pour la β -lactoglobuline, une augmentation du nombre d'impulsions n'engendre qu'un effet marginal sur le DH, mettant en évidence une réponse différenciée des protéines aux CEP en fonction de leur organisation structurale et de leurs propriétés physicochimiques spécifiques (Agoua et al., 2020a).

Ces résultats soulignent ainsi la nécessité d'une optimisation rigoureuse des conditions de traitement, permettant d'ajuster précisément les paramètres des CEP aux caractéristiques de chaque protéine afin d'en maximiser la valorisation et l'efficacité du procédé.

Par ailleurs, l'évaluation de l'EE des performances d'hydrolyse a mis en évidence la supériorité des CEP par rapport au chauffage conventionnel, sous réserve que les conditions appliquées permettent une dénaturation partielle et favorable de la protéine à l'action subséquente de l'enzyme. Toutefois, en l'absence d'un ajustement rigoureux de ces paramètres, l'application des CEP ne confère aucun avantage significatif, voire peut s'avérer contre-productive, comme en attestent les scores d'EE négatifs observés dans certaines conditions expérimentales. Ces résultats soulignent ainsi la nécessité d'un contrôle précis des conditions opératoires, adapté aux spécificités de chaque protéine, afin d'optimiser l'efficacité énergétique et environnementale du procédé.

Impact de l'immobilisation enzymatique

Le **second objectif** spécifique de cette étude était d'évaluer et de comparer les performances de l' α -CT sous ses formes libre et immobilisée, tout en analysant l'impact de l'immobilisation sur la production, le profil et les caractéristiques des hydrolysats peptidiques issus de l' α -LA et des PP. Pour ce faire, l' α -CT a été immobilisée sur un support d'alumine fonctionnalisé via des liaisons covalentes avec de la DOP, formant le complexe alumine@CTMS@APTES@DOP-CT. Cette stratégie d'immobilisation a permis d'améliorer significativement la stabilité enzymatique ainsi que sa recyclabilité, avec une activité conservée sur 10 cycles successifs d'hydrolyse. Outre son efficacité pour l'hydrolyse des protéines agroalimentaires, le support développé présente des propriétés particulièrement adaptées aux applications industrielles de digestion enzymatique. Sa biocompatibilité et son absence de toxicité en font un matériau prometteur pour une utilisation à grande échelle, garantissant à la fois un rendement optimisé et une réduction des coûts liés au renouvellement enzymatique.

L'immobilisation enzymatique a également influencé le profil des peptides générés, de manière distincte selon la protéine substrat. Pour l' α -LA, elle a permis une hydrolyse similaire à celle de l'enzyme libre, maintenant une spécificité de clivage comparable et produisant des peptides identiques. En revanche, pour les PP, l'immobilisation a induit une modification notable de la sélectivité catalytique de l' α -CT, aboutissant à la formation de nouveaux peptides absents des hydrolysats issus de l'enzyme libre. Cette redistribution des fragments peptidiques met en évidence l'influence de l'immobilisation sur la conformation enzymatique et son interaction avec le substrat, modifiant ainsi son mode d'action.

Impact de la combinaison CEP et immobilisation enzymatique sur les performances d'hydrolyse et la production de peptides bioactifs

Le **troisième et le quatrième objectifs** spécifiques ont porté sur l'effet combiné des CEP et de l'hydrolyse enzymatique catalysée par l' α -CT immobilisée (alumine@CTMS@APTES@DOP-CT) ainsi que sur la production de peptides bioactifs.

Effets sur l'hydrolyse de l' α -LA

La combinaison CEP/enzyme immobilisée a en partie levé la résistance de l' α -LA à l'hydrolyse, facilitant ainsi la dégradation de la protéine et permettant une extension de la couverture de séquence de 26 % par rapport à l'hydrolyse catalysée par l' α -CT sous forme libre. En particulier, cette stratégie a favorisé la libération de peptides situés à proximité des ponts disulfures, dans la région f(61-92). Par ailleurs, la stratégie combinatoire induit principalement la génération de peptides identiques à ceux obtenus avec CEP/ α -CT libre, garantissant ainsi le maintien d'une spécificité enzymatique comparable à celle de l'enzyme en solution. Cette approche a également permis la production des mêmes peptides bioactifs, mais avec une abondance relative accrue. Toutefois, malgré ces améliorations, le nombre total de peptides produits est resté inférieur à celui obtenu avec CEP/ α -CT libre, les hydrolysats étant majoritairement constitués de peptides de plus grande taille.

Effets sur l'hydrolyse des PP

Les PP ayant subi la combinaison CEP/enzyme immobilisée ont présenté une réponse distincte par rapport à l' α -LA. Alors que, pour cette dernière, l'immobilisation enzymatique s'est principalement traduite par une augmentation de l'abondance relative des peptides sans altération majeure de leur profil, elle a induit chez les PP une modification notable de la sélectivité catalytique. Cette sélectivité modifiée de l' α -CT a conduit à la production de 511 nouveaux peptides, absents dans les hydrolysats obtenus avec CEP/ α -CT libre, révélant une redistribution des séquences peptidiques et l'émergence d'un profil distinct. Ces résultats illustrent ainsi l'influence conjointe de la nature de la protéine et du prétraitement par CEP sur les conditions d'hydrolyse enzymatique, modulant ainsi le profil des peptides générés et ouvrant des perspectives prometteuses pour la production plus performante de peptides bioactifs.

Enfin, le criblage des activités biologiques potentielles a révélé la présence de nouvelles séquences peptidiques aux propriétés antihypertensives et antidiabétiques, jamais documentées jusqu'alors dans la littérature.

Concernant l'hypothèse de recherche, les résultats de cette étude démontrent que l'association des CEP en tant que prétraitement avec l'hydrolyse enzymatique catalysée par l' α -CT immobilisée constitue une approche particulièrement efficace pour la valorisation des protéines agroalimentaires. La preuve de concept réalisée sur l' α -LA a permis de valider l'efficacité de cette stratégie, tandis que son application à des matrices alimentaires plus complexes, telles que les PP, a révélé un effet encore plus marqué sur l'amélioration des performances d'hydrolyse et la production de peptides bioactifs.

L'un des principaux atouts de cette stratégie réside dans l'immobilisation de l' α -CT, qui confère à l'enzyme une stabilité accrue et une recyclabilité de l'enzyme tout en conservant une activité catalytique élevée sur plusieurs cycles d'hydrolyse. L'intégration des CEP au procédé d'hydrolyse constitue une avancée majeure, permettant un contrôle précis des réactions enzymatiques et une amélioration significative du rendement d'hydrolyse. D'un point de vue industriel, l'association des CEP et des enzymes immobilisées offre une alternative économiquement viable aux procédés thermiques conventionnels. En effet, les CEP se distinguent par une faible consommation énergétique, et leur mise en œuvre en continu, couplée à l'utilisation d'enzymes stabilisées, favorise une optimisation des coûts d'exploitation. Bien que l'investissement initial pour l'acquisition et l'installation des équipements de CEP puisse osciller entre 450 000 et 2 000 000 USD selon l'échelle de production, cette approche innovante permet d'accélérer l'amortissement des coûts grâce à la production de peptides bioactifs à haute valeur ajoutée, prisés pour leurs applications nutraceutiques et pharmaceutiques (Ulug et al., 2021). De surcroît, l'adaptabilité des CEP et de l'hydrolyse via une enzyme immobilisée aux infrastructures industrielles existantes limite les besoins en modifications structurelles, facilitant ainsi son adoption à grande échelle tout en renforçant la rentabilité du procédé (Ulug et al., 2021; Maghraby et al., 2023).

Cependant, certaines limites doivent être prises en compte avant une généralisation de cette approche. Tout d'abord, seules deux protéines ont été testées dans cette étude, ce qui ne permet pas d'affirmer que les résultats obtenus sont transposables à l'ensemble des protéines agroalimentaires. De plus, une seule enzyme (α -CT) a été évaluée, bien que d'autres protéases puissent présenter des spécificités catalytiques différentes, influençant ainsi la nature des peptides obtenus. Concernant l'immobilisation enzymatique, un seul support a été

utilisé, alors que d'autres pourraient offrir des performances distinctes en fonction des conditions d'hydrolyse. De même, bien que certaines conditions CEP aient montré un effet bénéfique sur l'accessibilité des sites de clivage, seules quelques conditions expérimentales ont été testées, laissant une marge d'optimisation pour adapter le procédé à différentes matrices protéiques et applications spécifiques.

Ces résultats mettent en évidence le potentiel de cette approche, mais soulignent également la nécessité d'études complémentaires afin d'explorer un plus large éventail de protéines, d'enzymes et de conditions de traitement. Une meilleure compréhension des interactions entre les CEP, l'immobilisation enzymatique et la structure des protéines permettrait d'affiner les stratégies d'hydrolyse et d'optimiser la production de peptides aux propriétés bioactives.

Conclusion générale et perspectives

Dans un contexte où la valorisation des protéines agroalimentaires constitue un levier stratégique pour le développement de nouvelles approches en biotechnologie, l'optimisation des procédés d'hydrolyse enzymatique apparaît comme une voie privilégiée pour la production de peptides bioactifs. Toutefois, les contraintes liées à la structure native des protéines, limitant l'accessibilité aux sites de clivage enzymatiques, ainsi que la stabilité des enzymes, influençant la reproductibilité des processus, demeurent des verrous scientifiques et technologiques majeurs. Au cœur de ce travail, l'association du prétraitement par CEP et de l'immobilisation enzymatique s'est imposée comme une approche innovante, permettant de moduler la structure des protéines tout en améliorant la stabilité enzymatique.

Les travaux menés pendant cette thèse ont démontré que l'application ciblée des CEP, sous des conditions spécifiques définies par la force de champs et le nombre d'impulsion), induit des réarrangements structuraux significatifs au sein des protéines, entraînant un dépliement partiel et une meilleure exposition des sites de clivage enzymatiques. Cette modification conformationnelle a influencé de manière notable l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique, favorisant la libération de peptides spécifiques dont le profil et l'abondance varient en fonction des paramètres de traitement appliqués ainsi que de la nature intrinsèque de la protéine cible. L'analyse approfondie des hydrolysats a révélé la présence de peptides présentant un potentiel bioactif, notamment des activités antihypertensive et antidiabétique, mettant en lumière la pertinence de cette approche pour la production de peptides d'intérêt à haute valeur ajoutée.

L'immobilisation covalente de l' α -CT sur de l'alumine a permis d'améliorer sa stabilité et d'assurer une activité catalytique prolongée. Cette approche a également accru la recyclabilité enzymatique, réduisant ainsi la consommation d'enzyme tout en préservant une hydrolyse efficace. Comparée à l'enzyme libre, l'immobilisation a induit des modifications dans la sélectivité enzymatique, influençant directement la composition des hydrolysats peptidiques.

En induisant une modulation spécifique de l'orientation des sites de clivage enzymatiques, l'immobilisation a favorisé la génération de peptides présentant une diversité de tailles, de masses moléculaires et de séquences. Cette modulation s'est révélée déterminante, influençant directement le potentiel bioactif des peptides en conditionnant leur aptitude à interagir efficacement avec leurs cibles biologiques. Ces variations résultent probablement d'un effet combiné entre les contraintes spatiales imposées par l'immobilisation, l'accessibilité au substrat et la nature intrinsèque de la protéine hydrolysée.

Ces résultats confirment l'hypothèse générale selon laquelle le prétraitement par CEP favorise le dépliement partiel des protéines, améliorant l'accessibilité des sites de clivage de l' α -CT immobilisée et favorisant ainsi la libération de peptides bioactifs.

Les connaissances générées au cours de cette étude ont permis d'approfondir la compréhension de la combinaison entre les traitements physiques et enzymatiques. Toutefois, des explorations complémentaires demeurent nécessaires afin d'optimiser ces processus et d'affiner leur impact sur la structure et l'hydrolyse des protéines :

1. Affinement des paramètres des CEP

- Explorer l'impact d'autres force de champ et nombre d'impulsions de CEP pour mieux contrôler les modifications structurelles de l' α -LA et des PP.
- Vérifier si ces effets sont reproductibles sur d'autres protéines d'intérêt pour la production de peptides bioactifs.
- Tester d'autres paramètres CEP (p. ex. durée d'impulsions, fréquence, forme des impulsions...).
- Approfondir la compréhension de la dépendance des interactions entre les paramètres de traitement et la réponse des protéines.

2. Amélioration de l'immobilisation enzymatique

- Tester d'autres supports, d'autres enzymes, ou modifier la chimie de greffage pour optimiser l'accessibilité des sites actifs de l'enzyme.
- Étudier plus en détail la stabilité et la recyclabilité de l' α -CT immobilisée sur plusieurs cycles d'hydrolyse.
- Développer l'hydrolyse avec l'enzyme immobilisée en réacteur à lit fixe pour permettre une hydrolyse continue et un meilleur contrôle des paramètres réactionnels.

3. Compréhension des mécanismes à l'échelle moléculaire :

- Intégrer des approches complémentaires de modélisation moléculaire (p. ex. dynamique moléculaire ou docking enzymatique) afin d'affiner la compréhension des mécanismes d'interaction enzyme-substrat et de prédire avec plus de précision l'impact des CEP sur l'accessibilité des sites de clivage.

4. Caractérisation avancée des peptides bioactifs

- Optimiser les conditions d'hydrolyse enzymatique (ratio enzyme/substrat, durée d'hydrolyse...) afin d'améliorer la libération ciblée de peptides bioactifs. Des études cinétiques approfondies contribueraient à une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels et de la dynamique de formation de ces peptides et de leurs bioactivités.
- Étendre le screening à d'autres activités biologiques d'intérêt (antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, etc.) en lien avec les besoins en alimentation fonctionnelle ou santé préventive.
- Compléter le screening *in silico* par des études *in vitro* et *in vivo* : modèles cellulaires, modèles animaux et essais cliniques afin d'évaluer l'efficacité physiologique réelle des peptides identifiés.

- Étudier la stabilité des peptides bioactifs dans des conditions digestives simulées et leur absorption intestinale pour mieux comprendre leur biodisponibilité.
- Évaluer la toxicité et l'innocuité des peptides bioactifs avant d'envisager leur potentielle application en alimentation fonctionnelle ou en nutraceutique.
- Explorer l'intégration des peptides bioactifs dans des formulations alimentaires, nutraceutiques et pharmaceutiques en considérant les contraintes technologiques (stabilisation, conservation, solubilité...) et les exigences des consommateurs (goût, texture, odeur...) afin de garantir l'efficacité, la stabilité et l'acceptabilité des produits développés.

5. Extension aux protéines végétales et nouvelles sources

- Explorer l'application de cette approche à d'autres sources protéiques végétales pour diversifier les peptides bioactifs potentiels et valoriser les co-produits agroalimentaires.

6. Mise à l'échelle pilote et industrielle

- Les expériences de ce projet doctoral ont été réalisées à l'échelle laboratoire. Ainsi, une validation à plus grande échelle sera nécessaire, en passant par des essais à l'échelle pilote afin d'optimiser les paramètres procédés et d'évaluer la reproductibilité des résultats.
- Transposer aux conditions industrielles en prenant en compte les contraintes de production (coût, rendement, efficacité des procédés) et les exigences réglementaires.
- Étendre l'analyse d'éco-efficience à l'ensemble des étapes du procédé afin d'identifier les leviers d'optimisation environnementale. L'intégration d'outils d'analyse du cycle de vie (ACV) permettrait de positionner le procédé

dans une démarche globale d'écoconception, en comparant l'intérêt environnemental et fonctionnel des différentes configurations technologiques (par exemple : traitement thermique avec enzyme libre vs CEP avec enzyme immobilisée).

Ainsi, cette thèse établit les bases d'une amélioration des stratégies de production de peptides bioactifs en associant pour la première fois un prétraitement des protéines par CEP à l'immobilisation enzymatique. La preuve de concept réalisée sur l' α -LA a démontré la faisabilité de cette approche, et sa transposition aux PP ouvre des perspectives pour l'exploitation de nouvelles sources de peptides bioactifs, avec des applications potentielles en nutrition et santé.

Bibliographie

- 20240112_FICHE_FILIERE_LAIT_DE_VACHE_2024.pdf. (s. d.). Consulté 27 janvier 2025, à l'adresse https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/72757/document/20240112_FICHE_FILIERE_LAIT_DE_VACHE_2024.pdf?version=8
- Abdelhedi, O., Nasri, R., Jridi, M., Mora, L., Oseguera-Toledo, M. E., Aristoy, M.-C., Amara, I. B., Toldrá, F., & Nasri, M. (2017). *In silico* analysis and antihypertensive effect of ACE-inhibitory peptides from smooth-hound viscera protein hydrolysate : Enzyme-peptide interaction study using molecular docking simulation. *Process Biochemistry*, 58, 145-159. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.032>
- Abdo, E. M., Allam, M. G., Gomaa, M. A. E., Shaltout, O. E., & Mansour, H. M. M. (2022). Valorization of whey proteins and beetroot peels to develop a functional beverage high in proteins and antioxidants. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.984891>
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers.
- Agoua, R.-S., Bazinet, L., Thibodeau, J., Vorobiev, E., Grimi, N., & Mikhaylin, S. (2022). High voltage electrical treatments can eco-efficiently promote the production of high added value peptides during chymotryptic hydrolysis of β -lactoglobulin. *Food Bioscience*, 47, 101610. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101610>
- Agoua, R.-S., Bazinet, L., Vorobiev, E., Grimi, N., & Mikhaylin, S. (2020a). Substantial Improvement of Tryptic and Chymotryptic Hydrolysis of β -Lactoglobulin Pretreated

- with High Voltage Electrical Treatments. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(39), 14775-14785. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03904>
- Agoua, R.-S., Bazinet, L., Vorobiev, E., Grimi, N., & Mikhaylin, S. (2020b). Substantial Improvement of Tryptic and Chymotryptic Hydrolysis of β -Lactoglobulin Pretreated with High Voltage Electrical Treatments. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(39), 14775-14785. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03904>
- Aguirre-Villegas, Milani, Kraatz, & Reinemann. (2012). *Life Cycle Impact Assessment and Allocation Methods Development for Cheese and Whey Processing*. <https://doi.org/10.13031/2013.41363>
- Akaberi, S., Gusbeth, C., Silve, A., Senthilnathan, D. S., Navarro-López, E., Molina-Grima, E., Müller, G., & Frey, W. (2019). Effet du traitement par champ électrique pulsé sur l'hydrolyse enzymatique des protéines de *Scenedesmus almeriensis*. *Algal Research*, 43, 101656. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101656>
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive Peptides : Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1445. <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>
- Alba, A., Báez, J., Fernández-Fernández, A. M., Nardo, A., Añón, M. C., Medrano, A., & Paulino, M. (2022). Study of the Antihypertensive Peptides Derived from Alpha-Lactalbumin Hydrolysate after Simulation of Digestion. *Biology and Life Sciences Forum*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/Foods2022-12972>
- Alfieri, M. L., Weil, T., Ng, D. Y. W., & Ball, V. (2022). Polydopamine at biological interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 305, 102689. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102689>

- Alirezalu, K., Munekata, P. E. S., Parniakov, O., Barba, F. J., Witt, J., Toepfl, S., Wiktor, A., & Lorenzo, J. M. (2020). Pulsed electric field and mild heating for milk processing : A review on recent advances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(1), 16-24. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9942>
- Alizadeh-Pasdar, N., & Li-Chan, E. C. Y. (2000). Comparison of Protein Surface Hydrophobicity Measured at Various pH Values Using Three Different Fluorescent Probes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(2), 328-334. <https://doi.org/10.1021/jf990393p>
- Antila, P., Paakkari, I., Järvinen, A., Mattila, M. J., Laukkanen, M., Pihlanto-Leppälä, A., Mäntsälä, P., & Hellman, J. (1991). Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. *International Dairy Journal*, *1*(4), 215-229. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(91\)90015-Z](https://doi.org/10.1016/0958-6946(91)90015-Z)
- Arif, U., Ahmed, M. J., Arif, A. A., & Rabbani, M. A. (2020). Assessment of genetic diversity in pea (PISUM SATIVUM L) landraces based on physico-chemical and nutritive quality using cluster and principal component analysis. *Pakistan Journal of Botany*, *52*(2), 575-580.
- Arshad, R. N., Abdul-Malek, Z., Munir, A., Buntat, Z., Ahmad, M. H., Jusoh, Y. M. M., Bekhit, A. E.-D., Roobab, U., Manzoor, M. F., & Aadil, R. M. (2020). Electrical systems for pulsed electric field applications in the food industry : An engineering perspective. *Trends in Food Science & Technology*, *104*, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.008>
- Arshad, R. N., Abdul-Malek, Z., Roobab, U., Munir, M. A., Naderipour, A., Qureshi, M. I., El-Din Bekhit, A., Liu, Z.-W., & Aadil, R. M. (2021). Pulsed electric field : A

- potential alternative towards a sustainable food processing. *Trends in Food Science & Technology*, *111*, 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.041>
- Axelrod, R., Beyrer, M., & Mathys, A. (2022). Impact of the electric field intensity and treatment time on whey protein aggregate formation. *Journal of Dairy Science*, *105*(8), 6589-6600. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21395>
- Bagnani, M., Peydayesh, M., Knapp, T., Appenzeller, E., Sutter, D., Kränzlin, S., Gong, Y., Wehrle, A., Greuter, S., Bucher, M., Schmid, M., & Mezzenga, R. (2024). From Soy Waste to Bioplastics : Industrial Proof of Concept. *Biomacromolecules*, *25*(3), 2033-2040. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c01416>
- Ballatore, M. B., Bettioli, M. del R., Vanden Braber, N. L., Aminahuel, C. A., Rossi, Y. E., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Cavaglieri, L. R., & Montenegro, M. A. (2020). Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chemistry*, *319*, 126472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126472>
- Bayón, B., Berti, I. R., Gagnetten, A. M., & Castro, G. R. (2018). Biopolymers from Wastes to High-Value Products in Biomedicine. In R. R. Singhanian, R. A. Agarwal, R. P. Kumar, & R. K. Sukumaran (Éds.), *Waste to Wealth* (p. 1-44). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7431-8_1
- Bayramoglu, G., Salih, B., & Arica, M. Y. (2020). Catalytic Activity of Immobilized Chymotrypsin on Hybrid Silica-Magnetic Biocompatible Particles and Its Application in Peptide Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *190*(4), 1224-1241. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03158-z>
- Bazinet, L., & Castaigne, F. (2019). *Concepts de génie alimentaire*.

- Bazinet, L., Lamarche, F., Boulet, M., & Amiot, J. (1997). Combined Effect of pH and Temperature during Electroreduction of Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 101-107. <https://doi.org/10.1021/jf9602434>
- Bechaux, J., Gatellier, P., Page, J.-F. L., Drillet, Y., & Sante-Lhoutellier, V. (2019). A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. *Food & Function*, 10(10), 6244-6266. <https://doi.org/10.1039/C9FO01546A>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bergé. (2008). *Added value to fisheries waste*. Research Signpost. India publishers.
- Bertrand-Harb, C., Baday, A., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., & Haertlé, T. (2002). Thermal modifications of structure and co-denaturation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. *Die Nahrung*, 46(4), 283-289. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20020701\)46:4<283::AID-FOOD283>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20020701)46:4<283::AID-FOOD283>3.0.CO;2-A)
- Beveridge, T., Toma, S. j., & Nakai, S. (1974). Determination of Sh- and Ss-Groups in Some Food Proteins Using Ellman's Reagent. *Journal of Food Science*, 39(1), 49-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb00984.x>
- Bhutto, R. A., Bhutto, N. ul ain H., Fan, Y., Kang, L., Wang, M., Iqbal, S., & Yi, J. (2024a). Bovine α -lactalbumin: Source, extraction, techno-functional properties, and applications as a (nano-) delivery system for nutraceuticals. *Trends in Food Science & Technology*, 146, 104381. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104381>

- Bhutto, R. A., Bhutto, N. ul ain H., Fan, Y., Kang, L., Wang, M., Iqbal, S., & Yi, J. (2024b). Bovine α -lactalbumin: Source, extraction, techno-functional properties, and applications as a (nano-) delivery system for nutraceuticals. *Trends in Food Science & Technology*, *146*, 104381. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104381>
- Bhutto, R. A., Bhutto, N. ul ain H., Fan, Y., Kang, L., Wang, M., Iqbal, S., & Yi, J. (2024c). Bovine α -lactalbumin: Source, extraction, techno-functional properties, and applications as a (nano-) delivery system for nutraceuticals. *Trends in Food Science & Technology*, *146*, 104381. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104381>
- Boboua, S. Y. B., Wen, Q., Zhang, L., Chen, Y., Yu, J., Chen, P., Sun, Y., & Zheng, T. (2024). Valorization of animal waste proteins for agricultural, food production, and medicinal applications. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1366333>
- Boudrant, J., Woodley, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, *90*, 66-80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>
- Bouglé, D., & Bouhallab, S. (2017). Dietary bioactive peptides : Human studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(2), 335-343. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.873766>
- Boukil, A., Marciniak, A., Mezdour, S., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2022). Effect of High Hydrostatic Pressure Intensity on Structural Modifications in Mealworm (*Tenebrio molitor*) Proteins. *Foods*, *11*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/foods11070956>
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score

- method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183-S211.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512002309>
- Boye, J., Zare, F., & Pletch, A. (2010). Pulse proteins : Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414-431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003>
- Bragg, W. L., Gottfried, C., & West, J. (1931). The Structure of β Alumina. *Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials*, 77(1-6), 255-274.
<https://doi.org/10.1524/zkri.1931.77.1.255>
- Cao, D., Cheng, W., Tao, K., & Liang, Y. (2018). Preparation of Polydopamine-Modified 3D Interconnected Macroporous Silica for Laccase Immobilization. *Macromolecular Research*, 26(7), 616-622. <https://doi.org/10.1007/s13233-018-6087-z>
- Carballares, D., Abellanas-Perez, P., de Andrades, D., Polizeli, M. de L. T. de M., Rocha-Martin, J., & Fernandez-Lafuente, R. (2024). Reutilization of the Most Stable Coimmobilized Enzyme Using Glutaraldehyde Chemistry to Produce a New Combi-biocatalyst When the Coimmobilized Enzyme with a Lower Stability Is Inactivated. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 12(17), 6564-6572.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.3c08231>
- Caron, P., Ferrero y de Loma-Osorio, G., Nabarro, D., Hainzelin, E., Guillou, M., Andersen, I., Arnold, T., Astralaga, M., Beukeboom, M., Bickersteth, S., Bwalya, M., Caballero, P., Campbell, B. M., Divine, N., Fan, S., Frick, M., Friis, A., Gallagher, M., Halkin, J.-P., ... Verburg, G. (2018). Food systems for sustainable development : Proposals for a profound four-part transformation. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(4), 41. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0519-1>

- Carullo, D., Donsi, F., & Ferrari, G. (2020). Influence of high-pressure homogenization on structural properties and enzymatic hydrolysis of milk proteins. *LWT*, *130*, 109657. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109657>
- Catiau, L., Delval-Dubois, V., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). Characterization and Identification of a Chymotryptic Hydrolysate of Alpha-Lactalbumin Stimulating Cholecystokinin Release in STC-1 Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *165*(5), 1264-1273. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9344-6>
- CCIL. (2023). *Aperçu de l'industrie laitière* [Statistiques]. <https://agriculture.canada.ca/fr/secteur/production-animale/centre-canadien-information-laitiere/industrie-laitiere>
- Chang, J.-Y., & Li, L. (2001). The Structure of Denatured α -Lactalbumin Elucidated by the Technique of Disulfide Scrambling : FRACTIONATION OF CONFORMATIONAL ISOMERS OF α -LACTALBUMIN *. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(13), 9705-9712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010700200>
- Chao, D., & Aluko, R. E. (2018). Modification of the structural, emulsifying, and foaming properties of an isolated pea protein by thermal pretreatment. *CyTA - Journal of Food*, *16*(1), 357-366. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1406536>
- Chaplin, L. C., & Lyster, R. L. J. (1986). Irreversible heat denaturation of bovine α -lactalbumin. *Journal of Dairy Research*, *53*(2), 249-258. <https://doi.org/10.1017/S0022029900024857>
- Chatzipaschali, A. A., & Stamatis, A. G. (2012). Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey : Current Status and Prospects. *Energies*, *5*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/en5093492>

- Cheison, S. C., & Kulozik, U. (2017). Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 418-453. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.959115>
- Chen, Z.-L., Li, Y., Wang, J.-H., Wang, R., Teng, Y.-X., Lin, J.-W., Zeng, X.-A., Woo, M.-W., Wang, L., & Han, Z. (2023). Pulsed electric field improves the EGCG binding ability of pea protein isolate unraveled by multi-spectroscopy and computer simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 244, 125082. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125082>
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-407. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)86187-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)86187-2)
- Chi, G., Liu, H., Zu, S., Tang, B., Wang, Y., Cao, M., Quek, S. Y., & He, N. (2024). Effects of high hydrostatic pressure treatment: Identification and characterization of snakehead-muscle-protein-based angiotensin-converting-enzyme-inhibitory peptides. *LWT*, 194, 115782. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115782>
- Chian, F. M., Kaur, L., Oey, I., Astruc, T., Hodgkinson, S., & Boland, M. (2019). Effect of Pulsed Electric Fields (PEF) on the ultrastructure and in vitro protein digestibility of bovine longissimus thoracis. *LWT*, 103, 253-259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.005>
- Chourasia, R., Phukon, L. C., Abedin, M. M., Padhi, S., Singh, S. P., & Rai, A. K. (2022). Whey valorization by microbial and enzymatic bioprocesses for the production of

- nutraceuticals and value-added products. *Bioresource Technology Reports*, 19, 101144. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101144>
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using *o*-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins¹. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219-1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- Coletti-Previero, M.-A., & Previero, A. (1989). Alumina-phosphate complexes for immobilization of biomolecules. *Analytical Biochemistry*, 180(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90080-8)
- Cournoyer, A., Daigle, G., Thibodeau, J., Perreault, V., & Bazinet, L. (2024). Effects of applied current modes on the migration selectivity of peptides from a porcine cruor hydrolysate during electrodialysis with ultrafiltration membrane. *Separation and Purification Technology*, 338, 126280. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.126280>
- Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation : The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>
- Daba, S. D., & Morris, C. F. (2022). Pea proteins : Variation, composition, genetics, and functional properties. *Cereal Chemistry*, 99(1), 8-20. <https://doi.org/10.1002/cche.10439>
- D'Alessio, G., Flamminii, F., Faieta, M., Prete, R., Di Michele, A., Pittia, P., & Di Mattia, C. D. (2023). High pressure homogenization to boost the technological functionality

- of native pea proteins. *Current Research in Food Science*, 6, 100499.
<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100499>
- Data Bridge Market Research. (2021). *Bioactive Peptides Market Size, Share, Value & Revenue Analysis By 2030*.
<https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-bioactive-peptides-market>
- de Wit, J.N. (2001). *Lecturer 's Handbook on whey and whey products (Hunterskil Howard (ed.); first)*. European Whey Products Association.
- Decarpigny, C., Ponchel, A., Monflier, E., & Bleta, R. (2022). Effect of Functional Group on the Catalytic Activity of Lipase B from *Candida antarctica* Immobilized in a Silica-Reinforced Pluronic F127/ α -Cyclodextrin Hydrogel. *Gels*, 8(1), Article 1.
<https://doi.org/10.3390/gels8010003>
- Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Sertier, C., Ghidossi, R., Mietton Peuchot, M., & Vorobiev, E. (2015). Comparison of the effect of pulsed electric field or high voltage electrical discharge for the control of sweet white must fermentation process with the conventional addition of sulfur dioxide. *Food Research International*, 77, 718-724.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.017>
- Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Sertier, C., Ghidossi, R., Vorobiev, E., & Mietton Peuchot, M. (2016). Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 152-164. <https://doi.org/10.1111/jam.12981>
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 86, 39-48.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.018>

- de Oliveira, A. P. H., Omura, M. H., Barbosa, É. de A. A., Bressan, G. C., Vieira, É. N. R., Coimbra, J. S. dos R., & de Oliveira, E. B. (2020). Combined adjustment of pH and ultrasound treatments modify techno-functionalities of pea protein concentrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 603, 125156. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125156>
- Ding, J., Liang, R., Yang, Y., Sun, N., & Lin, S. (2020). Optimisation de la préparation d'hydrolysats de protéines de pois et purification de peptides antioxydants basée sur une approche analytique *in silico*. *LWT*, 123, 109126. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109126>
- Dong, M., Xu, Y., Zhang, Y., Han, M., Wang, P., Xu, X., & Zhou, G. (2020). Physicochemical and structural properties of myofibrillar proteins isolated from pale, soft, exudative (PSE)-like chicken breast meat : Effects of pulsed electric field (PEF). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 59, 102277. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102277>
- Duffuler, P., Bhullar, K. S., de Campos Zani, S. C., & Wu, J. (2022). Bioactive Peptides : From Basic Research to Clinical Trials and Commercialization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(12), 3585-3595. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06289>
- Dullius, A., Goettert, M. I., & de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>
- El-Nemr, M. A., Abdelmonem, N. M., Ismail, I. M. A., Ragab, S., & El Nemr, A. (2020). Ozone and Ammonium Hydroxide Modification of Biochar Prepared from Pisum

- sativum Peels Improves the Adsorption of Copper (II) from an Aqueous Medium. *Environmental Processes*, 7(3), 973-1007. <https://doi.org/10.1007/s40710-020-00455-2>
- Famutimi, O. G., Adebisi, V. G., Akinmolu, B. G., Dada, O. V., & Adewale, I. O. (2024). Trypsin, chymotrypsin and elastase in health and disease. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s43094-024-00709-y>
- Fan, H., Liu, H., Zhang, Y., Zhang, S., Liu, T., & Wang, D. (2022). Review on plant-derived bioactive peptides : Biological activities, mechanism of action and utilizations in food development. *Journal of Future Foods*, 2(2), 143-159. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.003>
- Farrell, H. M., Qi, P. X., Brown, E. M., Cooke, P. H., Tunick, M. H., Wickham, E. D., & Unruh, J. J. (2002). Molten Globule Structures in Milk Proteins : Implications for Potential New Structure-Function Relationships¹. *Journal of Dairy Science*, 85(3), 459-471. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74096-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74096-4)
- Fatima, R., Fatima, F., Altemimi, A. B., Bashir, N., Sipra, H. M., Hassan, S. A., Mujahid, W., Shehzad, A., Abdi, G., & Aadil, R. M. (2024). Bridging sustainability and industry through resourceful utilization of pea pods- A focus on diverse industrial applications. *Food Chemistry: X*, 23, 101518. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101518>
- Fédération Internationale de Laiterie (FIL-IDF). (2019). Dairy's Global Impact. *IDF - IDF is the leading source of scientific and technical expertise for all stakeholders of the dairy chain*. <https://fil-idf.org/dairys-global-impact/>

- Filière lait de vache conventionnel*. (s. d.). Consulté 27 janvier 2025, à l'adresse <https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/67515/document/NCO-DIA-LAI-Vache%20conventionnel-2021-11-04.pdf?version=1>
- Fleury, L., Deracinois, B., Dugardin, C., Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J., Flahaut, C., Cudennec, B., & Ravallec, R. (2022). In Vivo and In Vitro Comparison of the DPP-IV Inhibitory Potential of Food Proteins from Different Origins after Gastrointestinal Digestion. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ijms23158365>
- Gallego, M., Mora, L., & Toldrá, F. (2018a). Health relevance of antihypertensive peptides in foods. *Current Opinion in Food Science*, 19, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.004>
- Gallego, M., Mora, L., & Toldrá, F. (2018b). Health relevance of antihypertensive peptides in foods. *Current Opinion in Food Science*, 19, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.004>
- Gao, J., Gong, H., & Mao, X. (2020). Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity and Related Molecular Mechanism of Bovine α -Lactalbumin-Derived Peptides. *Molecules*, 25(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/molecules25133009>
- Gao, J., Guo, K., Du, M., & Mao, X. (2022). Bovine α -lactalbumin-derived peptides attenuate TNF- α -induced insulin resistance and inflammation in 3T3-L1 adipocytes through inhibiting JNK and NF- κ B signaling. *Food & Function*, 13(4), 2323-2335. <https://doi.org/10.1039/D1FO01217G>
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J.-B., Chen, B., & Rao, J. (2020). Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea

- protein isolate. *Food Research International*, 131, 109045.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045>
- García Arteaga, V., Apéstegui Guardia, M., Muranyi, I., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2020). Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 65, 102449.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102449>
- Gavahian, M. (2024). Opinion on the prospects of emerging food processing technologies to achieve sustainability in the industry by reduced energy consumption, waste reduction and valorisation, and improved food nutrition. *International Journal of Food Science and Technology*, 59(11), 8135-8140. <https://doi.org/10.1111/ijfs.17525>
- Ge, J., Sun, C.-X., Corke, H., Gul, K., Gan, R.-Y., & Fang, Y. (2020). The health benefits, functional properties, modifications, and applications of pea (*Pisum sativum* L.) protein: Current status, challenges, and perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1835-1876. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12573>
- Ge, X., Zhang, J., Regenstein, J. M., Liu, D., Huang, Y., Qiao, Y., & Zhou, P. (2024). α -Lactalbumin : Functional properties and potential health benefits. *Food Bioscience*, 60, 104371. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104371>
- Genene, A., Hansen, E. B., Eshetu, M., Hailu, Y., & Ipsen, R. (2019). Effect of heat treatment on denaturation of whey protein and resultant rennetability of camel milk. *LWT*, 101, 404-409. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.047>
- Ghafourifar, G., Fleitz, A., & Waldron, K. C. (2013). Development of glutaraldehyde-crosslinked chymotrypsin and an in situ immobilized enzyme microreactor with

- peptide mapping by capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 34(12), 1804-1811. <https://doi.org/10.1002/elps.201200663>
- Giteru, S. G., Oey, I., & Ali, M. A. (2018). Feasibility of using pulsed electric fields to modify biomacromolecules : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 91-113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.009>
- Gonawan, F. N., Romli, M. M., Zuhani, M. K. N. M., & Jaya, M. a. T. (2022). Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on the Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. *Journal of Chemical Engineering and Industrial Biotechnology*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.15282/jceib.v8i1.7771>
- GrandviewResearch. (2023). *Protein Ingredients Market Size, 2030*. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/protein-ingredients-market>
- Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2011). Impact of apple processing modes on extracted juice quality : Pressing assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 103(1), 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.019>
- Grossmann, L., & Weiss, J. (2021). Alternative Protein Sources as Technofunctional Food Ingredients. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12(Volume 12, 2021), 93-117. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-062520-093642>
- Guéguen, J., Walrand, S., & Bourgeois, O. (2016). Les protéines végétales : Contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 51(4), 177-185. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2016.02.001>
- Guo, F., Tsao, R., Wang, X., Jiang, L., Sun, Y., & Xiong, H. (2021). Phenolics of Yellow Pea (*Pisum sativum* L.) Hulls, Their Plasma and Urinary Metabolites, Organ

- Distribution, and In Vivo Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), 5013-5025. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00713>
- Guo, F., Xiong, H., Wang, X., Jiang, L., Yu, N., Hu, Z., Sun, Y., & Tsao, R. (2019). Phenolics of Green Pea (*Pisum sativum* L.) Hulls, Their Plasma and Urinary Metabolites, Bioavailability, and in Vivo Antioxidant Activities in a Rat Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(43), 11955-11968. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04501>
- Guo, K., Lin, L., Fan, X., Zhang, L., & Wei, C. (2018). Comparison of structural and functional properties of starches from five fruit kernels. *Food Chemistry*, 257, 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.004>
- Guo, L., Wang, X., Ren, Y., Zhang, X., Li, Q., Zhang, C., & Qian, J.-Y. (2024). Outcomes of structure, function and flavor of pea protein isolate treated by AC, DC and pulsed electric fields. *Food Research International*, 176, 113817. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113817>
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2016). Effects of hydrocolloids and processing conditions on acid whey production with reference to Greek yogurt. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 61-76. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.013>
- Hall, A. E., & Moraru, C. I. (2021). Structure and function of pea, lentil and faba bean proteins treated by high pressure processing and heat treatment. *LWT*, 152, 112349. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112349>
- Han, Z., Cai, M., Cheng, J.-H., & Sun, D.-W. (2018). Effects of electric fields and electromagnetic wave on food protein structure and functionality : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.017>

- Hanan, E., Rudra, S. G., Sagar, V. R., & Sharma, V. (2020). Utilization of pea pod powder for formulation of instant pea soup powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(11), e14888. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14888>
- Hanan, E., Rudra, S. G., Sharma, V., Sagar, V. R., & Sehgal, S. (2021). Pea pod powder to enhance the storage quality of buckwheat bread. *Vegetos*, 34(4), 790-799. <https://doi.org/10.1007/s42535-021-00259-1>
- Hartmann, M., & Jung, D. (2010). Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts : The status quo and future trends. *Journal of Materials Chemistry*, 20(5), 844-857. <https://doi.org/10.1039/B907869J>
- Hartmann, M., & Kostrov, X. (2013). Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6277-6289. <https://doi.org/10.1039/C3CS60021A>
- Hedstrom, L. (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501-4524. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>
- Heilmann, A., Teuscher, N., Kiesow, A., Janasek, D., & Spohn, U. (2003). Nanoporous aluminum oxide as a novel support material for enzyme biosensors. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 3(5), 375-379. <https://doi.org/10.1166/jnn.2003.224>
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future Protein Supply and Demand : Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods*, 6(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Hernández-Sánchez, H. (2023). Effect of Nonthermal Processing on the Structural and Techno-Functional Properties of Bovine α -Lactalbumin. *Food Engineering Reviews*, 15(2), 187-195. <https://doi.org/10.1007/s12393-023-09340-8>

- Hettiarachchy, N. S., Feliz, D. J., Edwards, J. S., & Horax, R. (2018). The use of immobilized enzymes to improve functionality. In *Proteins in Food Processing* (p. 569-597). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X>
- Hosseini-pour, S. L., Khiabani, M. S., Hamishehkar, H., & Salehi, R. (2015). Enhanced stability and catalytic activity of immobilized α -amylase on modified Fe₃O₄ nanoparticles for potential application in food industries. *Journal of Nanoparticle Research*, *17*(9), 382. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3174-3>
- Hu, X., Wang, H., Hu, Y., & Tu, Z. (2024). Insight into the effects of pulsed electric field on the structure, aggregation characteristics and functional properties of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, *154*, 110111. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110111>
- Ichim, N., Marín, F., & Orenes-Piñero, E. (2024). Potential Impact of Bioactive Peptides from Foods in the Treatment of Hypertension. *Molecular Nutrition & Food Research*, *68*(14), 2400084. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202400084>
- Iram, D., Sansi, M. S., Zanab, S., Vij, S., Ashutosh, & Meena, S. (2022). In silico identification of antidiabetic and hypotensive potential bioactive peptides from the sheep milk proteins—A molecular docking study. *Journal of Food Biochemistry*, *46*(11), e14137. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14137>
- Ismail, B. P., Senaratne-Lenagala, L., Stube, A., & Brackenridge, A. (2020). Protein demand: Review of plant and animal proteins used in alternative protein product development and production. *Animal Frontiers*, *10*(4), 53-63. <https://doi.org/10.1093/af/vfaa040>
- Iyer, P. V., & Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, *43*(10), 1019-1032. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>

- Izquierdo, F. J., Alli, I., Gómez, R., Ramaswamy, H. S., & Yaylayan, V. (2005). Effects of high pressure and microwave on pronase and α -chymotrypsin hydrolysis of β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 92(4), 713-719. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.006>
- Jaccard, J., Becker, M. A., & Wood, G. (1984). Pairwise multiple comparison procedures : A review. *Psychological Bulletin*, 96(3), 589-596. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.96.3.589>
- Jacquot, A., Gauthier, S. F., Drouin, R., & Boutin, Y. (2010). Proliferative effects of synthetic peptides from β -lactoglobulin and α -lactalbumin on murine splenocytes. *International Dairy Journal*, 20(8), 514-521. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.013>
- Jakopović, K. L., Barukčić, I., & Božanić, R. (2016). *Physiological significance, structure and isolation of α -lactalbumin*. 9.
- Jaziri et al. (1992). *Specific binding sites on human phagocytic blood cells for Gly-Leu-Phe and Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, immunostimulating peptides from human milk proteins—PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1477096/>
- Jha, A. B., Arganosa, G., Tar'an, B., Diederichsen, A., & Warkentin, T. D. (2013). Characterization of 169 diverse pea germplasm accessions for agronomic performance, *Mycosphaerella* blight resistance and nutritional profile. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(2), 747-761. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9871-1>
- Jiang, Z., Yao, K., Yuan, X., Mu, Z., Gao, Z., Hou, J., & Jiang, L. (2018). Effects of ultrasound treatment on physico-chemical, functional properties and antioxidant

- activity of whey protein isolate in the presence of calcium lactate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1522-1529. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8623>
- Jin, T. Z. (2017). Pulsed Electric Fields for Pasteurization : Defining Processing Conditions. In D. Miklavčič (Éd.), *Handbook of Electroporation* (p. 2271-2295). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32886-7_132
- Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organization Technical Report Series*, 935, 1-265, back cover.
- Jovanović, J. R., Stefanović, A. B., Šekuljica, N. Ž., Tanasković, S. M. J., Dojčinović, M. B., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2016). Ultrasound Pretreatment as an Useful Tool to Enhance Egg White Protein Hydrolysis : Kinetics, Reaction Model, and Thermodynamics. *Journal of Food Science*, 81(11), C2664-C2675. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13503>
- Kan, L., Nie, S., Hu, J., Wang, S., Bai, Z., Wang, J., Zhou, Y., Jiang, J., Zeng, Q., & Song, K. (2018). Comparative study on the chemical composition, anthocyanins, tocopherols and carotenoids of selected legumes. *Food Chemistry*, 260, 317-326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.148>
- Kanda, Y., Hisayasu, S., Abe, Y., Katsura, K., & Mashimo, K. (2007). Growth-active peptides are produced from α -lactalbumin and lysozyme. *Life Sciences*, 81(6), 449-457. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.06.005>
- Karim, A., & Aider, M. (2022). Bioconversion du lactose électroactivé, du lactosérum et du perméat de lactosérum pour produire des protéines unicellulaires, de l'éthanol, des composés volatils aromatiques, des acides organiques et des graisses par

- Kluyveromyces marxianus*. *International Dairy Journal*, 129, 105334.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105334>
- Kaushik, N. K., Kaushik, N., Pardeshi, S., Sharma, J. G., Lee, S. H., & Choi, E. H. (2015). Biomedical and Clinical Importance of Mussel-Inspired Polymers and Materials. *Marine Drugs*, 13(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/md13116792>
- Kiersnowska, K., & Jakubczyk, A. (2022). Bioactive Peptides Obtained from Legume Seeds as New Compounds in Metabolic Syndrome Prevention and Diet Therapy. *Foods*, 11(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/foods11203300>
- Korczek, K. R., Tkaczewska, J., Duda, I., & Migdał, W. (2020). Effect of Heat Treatment on the Antioxidant and Antihypertensive Activity as Well as in vitro Digestion Stability of Mackerel (*Scomber scombrus*) Protein Hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29(1), 73-89. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1695033>
- Kujawa, J., Głodek, M., Koter, I., Ośmiałowski, B., Knozowska, K., Al-Gharabli, S., Dumée, L. F., & Kujawski, W. (2021). Molecular Decoration of Ceramic Supports for Highly Effective Enzyme Immobilization—Material Approach. *Materials*, 14(1), 201. <https://doi.org/10.3390/ma14010201>
- Kujawa, J., Głodek, M., Li, G., Al-Gharabli, S., Knozowska, K., & Kujawski, W. (2021). Highly effective enzymes immobilization on ceramics : Requirements for supports and enzymes. *Science of The Total Environment*, 801, 149647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>
- Kumar, A., Singh, A. K., Bilal, M., & Chandra, R. (2022). Sustainable Production of Thermostable Laccase from Agro-Residues Waste by *Bacillus aquimaris* AKRC02. *Catalysis Letters*, 152(6), 1784-1800. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03753-y>

- Kumar, R., Chaudhary, K., Sharma, M., Nagpal, G., Chauhan, J. S., Singh, S., Gautam, A., & Raghava, G. P. S. (2015). AHTPDB : A comprehensive platform for analysis and presentation of antihypertensive peptides. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D956-D962. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1141>
- Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2014a). Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*, *54*, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.002>
- Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2014b). Peptide Array on Cellulose Support—A Screening Tool to Identify Peptides with Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibitory Activity within the Sequence of α -Lactalbumin. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms151120846>
- Lacroix, I. M. E., Meng, G., Cheung, I. W. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2016). Do whey protein-derived peptides have dual dipeptidyl-peptidase IV and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities? *Journal of Functional Foods*, *21*, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.038>
- Laguna, L., Picouet, P., Guàrdia, M. D., Renard, C. M. G. C., & Sarkar, A. (2017). *In vitro* gastrointestinal digestion of pea protein isolate as a function of pH, food matrices, autoclaving, high-pressure and re-heat treatments. *LWT*, *84*, 511-519. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.021>
- Lajnaf, R., Picart-Palmade, L., Cases, E., Attia, H., Marchesseau, S., & Ayadi, M. A. (2018). The foaming properties of camel and bovine whey : The impact of pH and heat treatment. *Food Chemistry*, *240*, 295-303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.064>

- Lam, A. C. Y., Can Karaca, A., Tyler, R. T., & Nickerson, M. T. (2018). Pea protein isolates : Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126-147. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2015a). The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 427-434. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.031>
- Lam, R. S. H., & Nickerson, M. T. (2015b). The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of alpha-lactalbumin. *Food Chemistry*, 173, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.078>
- L'économie laitière en chiffres—Edition 2024.pdf*. (s. d.). Consulté 27 janvier 2025, à l'adresse <https://www.cniel.com/sites/default/files/2024-10/L%27%C3%A9conomie%20laiti%C3%A8re%20en%20chiffres%20-%20Edition%202024.pdf>
- Lee, H., Dellatore, S. M., Miller, W. M., & Messersmith, P. B. (2007). Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5849), 426. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>
- Li, H., Shi, H., He, Y., Fei, X., & Peng, L. (2020). Preparation and characterization of carboxymethyl cellulose-based composite films reinforced by cellulose nanocrystals derived from pea hull waste for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4104-4112. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.010>

- Li, R., Kirkensgaard, J. J. K., & Corredig, M. (2024). Structural evolution of pea-derived albumins during pH and heat treatment studied with light and X-ray scattering. *Food Research International*, *186*, 114380. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114380>
- Li, S.-Y., Ng, I.-S., Chen, P. T., Chiang, C.-J., & Chao, Y.-P. (2018). Biorefining of protein waste for production of sustainable fuels and chemicals. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1234-5>
- Li, T., Jiao, R., Ma, J., Zang, J., Zhao, G., & Zhang, T. (2022). Zinc binding strength of proteins dominants zinc uptake in Caco-2 cells. *RSC Advances*, *12*(33), 21122-21128. <https://doi.org/10.1039/D2RA03565K>
- Li, Y., Chen, Z., & Mo, H. (2007). Effects of pulsed electric fields on physicochemical properties of soybean protein isolates. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(7), 1167-1175. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.015>
- Liao, W., Fan, H., Liu, P., & Wu, J. (2019). Identification of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) up-regulating peptides from pea protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, *60*, 103395. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.05.051>
- Liu, D., Guan, X., Huang, K., Li, S., Liu, J., Yu, W., & Duan, R. (2019). Protective effects of mung bean (*Vigna radiata* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) against high-fat-induced oxidative stress. *Food Science & Nutrition*, *7*(12), 4063-4075. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1271>
- Liu, D.-M., Chen, J., & Shi, Y.-P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *102*, 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>
- Liu, H., Wang, J., Liu, Y., Bi, H., Zhou, X., Wen, L., & Yang, B. (2024). Characterisation of functional pea protein hydrolysates and their immunomodulatory activity.

- International Journal of Food Science and Technology*, 59(5), 3317-3330.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.17077>
- Liu, Y. Y., Zeng, X. A., Deng, Z., Yu, S. J., & Yamasaki, S. (2011). Effect of pulsed electric field on the secondary structure and thermal properties of soy protein isolate. *European Food Research and Technology*, 233(5), 841-850.
<https://doi.org/10.1007/s00217-011-1580-z>
- Liu, Y.-F., Oey, I., Bremer, P., Silcock, P., & Carne, A. (2018). Proteolytic pattern, protein breakdown and peptide production of ovomucin-depleted egg white processed with heat or pulsed electric fields at different pH. *Food Research International*, 108, 465-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.075>
- Liu, Y.-Y., Zhang, Y., Zeng, X.-A., El-Mashad, H., Pan, Z.-L., & Wang, Q.-J. (2014). Effect of Pulsed Electric Field on Microstructure of Some Amino Acid Group of Soy Protein Isolates. *International Journal of Food Engineering*, 10(1), 113-120.
<https://doi.org/10.1515/ijfe-2013-0033>
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Uribe, J. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bioactive Peptides and Hydrolysates from Pulses and Their Potential Use as Functional Ingredients. *Journal of Food Science*, 79(3), R273-R283. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12365>
- Lu, Z. X., He, J. F., Zhang, Y. C., & Bing, D. J. (2020a). Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2593-2605.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1651248>
- Lu, Z. X., He, J. F., Zhang, Y. C., & Bing, D. J. (2020b). Composition, physicochemical properties of pea protein and its application in functional foods. *Critical Reviews in*

- Food Science and Nutrition*, 60(15), 2593-2605.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1651248>
- Ludvíková, M., & Griga, M. (2022). Pea transformation : History, current status and challenges. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 58(3), 127-161.
<https://doi.org/10.17221/24/2022-CJGPB>
- Ma, Z., Boye, J. I., & Hu, X. (2017). *In vitro* digestibility, protein composition and techno-functional properties of Saskatchewan grown yellow field peas (*Pisum sativum* L.) as affected by processing. *Food Research International*, 92, 64-78.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.012>
- Mabrouki, J., Abbassi, M. A., Khiari, B., Jellali, S., Zorpas, A. A., & Jeguirim, M. (2022). The dairy biorefinery : Integrating treatment process for Tunisian cheese whey valorization. *Chemosphere*, 293, 133567.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133567>
- Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E.-S. (2023). Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, 8(6), 5184-5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- Malik, M. A., & Saini, C. S. (2019). Heat treatment of sunflower protein isolates near isoelectric point : Effect on rheological and structural properties. *Food Chemistry*, 276, 554-561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.060>
- Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., & Athira, S. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3235-3241.
<https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3>

- Manus, J., Millette, M., Dridi, C., Salmieri, S., Aguilar Uscanga, B. R., & Lacroix, M. (2021). Protein quality of a probiotic beverage enriched with pea and rice protein. *Journal of Food Science*, 86(8), 3698-3706. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15838>
- Market Research Report. (2020). *Bioactive Protein And Peptides Market—Price, Size, Share & Growth*. Coherent Market Insights. <https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/bioactive-protein-and-peptides-market-3402>
- Martin, M., Hagemann, D., Henle, T., & Deussen, A. (2018). THE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME-INHIBITORY EFFECTS OF THE PEPTIDE ISOLEUCINE-TRYPTOPHAN AFTER ORAL INTAKE VIA WHEY HYDROLYSATE IN MEN. *Journal of Hypertension*, 36, e220. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000539622.35704.22>
- Martínez-Augustin, O., Rivero-Gutiérrez, B., Mascaraque, C., & Sánchez de Medina, F. (2014). Food Derived Bioactive Peptides and Intestinal Barrier Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms151222857>
- Martínez-Medina, G. A., Barragán, A. P., Ruiz, H. A., Ilyina, A., Martínez Hernández, J. L., Rodríguez-Jasso, R. M., Hoyos-Concha, J. L., & Aguilar-González, C. N. (2019). Chapter 14—Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. In M. Kuddus (Éd.), *Enzymes in Food Biotechnology* (p. 221-246). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00014-1>
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization

- techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Mazorra-Manzano, M. A., Robles-Porchas, G. R., González-Velázquez, D. A., Torres-Llanez, M. J., Martínez-Porchas, M., García-Sifuentes, C. O., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2020). Cheese Whey Fermentation by Its Native Microbiota: Proteolysis and Bioactive Peptides Release with ACE-Inhibitory Activity. *Fermentation*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010019>
- Mazurkiewicz, J., Kołoczek, H., & Tomasik, P. (2015). Effect of the external electric field on selected tripeptides. *Amino Acids*, 47(7), 1399-1408.
<https://doi.org/10.1007/s00726-015-1971-8>
- Mazzocato, M. C., & Jacquier, J.-C. (2024). Recent Advances and Perspectives on Food-Grade Immobilisation Systems for Enzymes. *Foods*, 13(13), 2127.
<https://doi.org/10.3390/foods13132127>
- McCarthy, N. A., Kennedy, D., Hogan, S. A., Kelly, P. M., Thapa, K., Murphy, K. M., & Fenelon, M. A. (2016). Emulsification properties of pea protein isolate using homogenization, microfluidization and ultrasonication. *Food Research International*, 89, 415-421. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.024>
- McGuffey, M. K., Epting, K. L., Kelly, R. M., & Foegeding, E. A. (2005). Denaturation and Aggregation of Three α -Lactalbumin Preparations at Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3182-3190.
<https://doi.org/10.1021/jf048863p>
- Mehra, R., Kumar, H., Kumar, N., Ranvir, S., Jana, A., Buttar, H. S., Telessy, I. G., Awuchi, C. G., Okpala, C. O. R., Korzeniowska, M., & Guiné, R. P. F. (2021). Whey proteins processing and emergent derivatives: An insight perspective from constituents,

- bioactivities, functionalities to therapeutic applications. *Journal of Functional Foods*, 87, 104760. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104760>
- Mehrabi, Z., Harsij, Z., & Taheri-Kafrani, A. (2024). Polydopamine-functionalized polyethersulfone membrane : A paradigm advancement in the field of α -amylase stability and immobilization. *Journal of Biotechnology*, 394, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.08.007>
- Menchik, P., Zuber, T., Zuber, A., & Moraru, C. I. (2019). Short communication : Composition of coproduct streams from dairy processing : Acid whey and milk permeate. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3978-3984. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15951>
- Meng, Y., Liang, Z., Zhang, C., Hao, S., Han, H., Du, P., Li, A., Shao, H., Li, C., & Liu, L. (2021). Ultrasonic modification of whey protein isolate : Implications for the structural and functional properties. *LWT*, 152, 112272. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112272>
- Mikhaylin, S., Boussetta, N., Vorobiev, E., & Bazinet, L. (2017). High Voltage Electrical Treatments To Improve the Protein Susceptibility to Enzymatic Hydrolysis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(12), 11706-11714. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03192>
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste : A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>
- Mirmoghtadaie, L., Shojaee Aliabadi, S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food Chemistry*, 199, 619-627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.067>

- Mohamed, H., Ayyash, M., & Kamal-Eldin, A. (2022). Effect of heat treatments on camel milk proteins – A review. *International Dairy Journal*, *133*, 105404. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105404>
- Mollea, C., Marmo, L., Bosco, F., Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. (2013). Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. In *Food Industry*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/53159>
- Mora, L., & Toldrá, F. (2023). Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides. *Current Opinion in Food Science*, *49*, 100973. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100973>
- Morris, R., Black, K. A., & Stollar, E. J. (2022). Uncovering protein function : From classification to complexes. *Essays in Biochemistry*, *66*(3), 255-285. <https://doi.org/10.1042/EBC20200108>
- Moulin, G., & Galzy, P. (1984). Whey, a Potential Substrate for Biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *1*(1), 347-374. <https://doi.org/10.1080/02648725.1984.10647790>
- Mu, X., Wang, R., Cheng, C., Ma, Y., Zhang, Y., & Lu, W. (2023). Preparation, structural properties, and in vitro and in vivo activities of peptides against dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and α -glucosidase : A general review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *0*(0), 1-13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2217444>
- Munir, M., Nadeem, M., Qureshi, T. M., Leong, T. S. H., Gamlath, C. J., Martin, G. J. O., & Ashokkumar, M. (2019). Effects of high pressure, microwave and ultrasound processing on proteins and enzyme activity in dairy systems—A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *57*. <https://findanexpert.unimelb.edu.au/scholarlywork/1406613-effects-of-high->

pressure--microwave-and-ultrasound-processing-on-proteins-and-enzyme-activity-
in-dairy-systems-%E2%80%94a-review

- N, W., Elbarbary, H. A., Ibrahim, E. M. A., Mohamed, H. A., & Jenssen, H. (2022). EFFECT OF ENZYME TYPE AND HYDROLYSIS TIME ON ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WHEY PROTEIN HYDROLYSATES. *IRAQI JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES*, 53(6), Article 6. <https://doi.org/10.36103/ijas.v53i6.1650>
- Nakagawa, H., & Ubbink, J. (2024). *Reversible and irreversible changes in protein secondary structure in the heat- and shear-induced texturization of native pea protein isolate*. ChemRxiv. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2024-pxx63>
- Nasri, M. (2017). Chapter Four - Protein Hydrolysates and Biopeptides : Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. In F. Toldrá (Éd.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 81, p. 109-159). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
- Nayak, N., Huertas, R., Crespo, J. G., & Portugal, C. A. M. (2019). Surface modification of alumina monolithic columns with 3-aminopropyltetraethoxysilane (APTES) for protein attachment. *Separation and Purification Technology*, 229, 115674. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115674>
- Nicoleta, S., Alina, H., Silviu, S., & Gabriela, R. (2010). Thermal Treatment Can Modify the Susceptibility of Whey Protein Concentrate to Enzymatic Hydrolysis. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7, Article 7.
- Nielsen, L. R., Lund, M. N., Davies, M. J., Nielsen, J. H., & Nielsen, S. B. (2018). Effect of free cysteine on the denaturation and aggregation of holo α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 79, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.11.014>

- Nikolopoulou, D., Grigorakis, K., Stasini, M., Alexis, M. N., & Iliadis, K. (2007). Differences in chemical composition of field pea (*Pisum sativum*) cultivars : Effects of cultivation area and year. *Food Chemistry*, *103*(3), 847-852. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.035>
- Nimbalkar, P. R., Khedkar, M. A., Chavan, P. V., & Bankar, S. B. (2018). Biobutanol production using pea pod waste as substrate : Impact of drying on saccharification and fermentation. *Renewable Energy*, *117*, 520-529. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.079>
- Nongonierma, A. B., Maux, S. L., Hamayon, J., & FitzGerald, R. J. (2016). Strategies for the release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in an enzymatic hydrolyzate of α -lactalbumin. *Food & Function*, *7*(8), 3437-3443. <https://doi.org/10.1039/C6FO00239K>
- Olde Damink, L. H. H., Dijkstra, P. J., Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P., & Feijen, J. (1995). Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *6*(8), 460-472. <https://doi.org/10.1007/BF00123371>
- Olvera-Rosales, L. B., Cruz-Guerrero, A. E., García-Garibay, J. M., Gómez-Ruíz, L. C., Contreras-López, E., Guzmán-Rodríguez, F., & González-Olivares, L. G. (2023). Bioactive peptides of whey : Obtaining, activity, mechanism of action, and further applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *63*(30), 10351-10381. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2079113>
- OMS. (2019). *L'OMS publie son premier rapport détaillé sur les conséquences désastreuses de l'hypertension et les moyens d'en venir à bout.*

- <https://www.who.int/fr/news/item/19-09-2023-first-who-report-details-devastating-impact-of-hypertension-and-ways-to-stop-it>
- OMS. (2022). *Diabète*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- Ostertagová, E., Ostertag, O., & Kováč, J. (2014). Methodology and Application of the Kruskal-Wallis Test. *Applied Mechanics and Materials*, 611, 115-120. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.611.115>
- Ozyurt, O., Comakli, O., Yilmaz, M., & Karşlı, S. (2004). Heat pump use in milk pasteurization : An energy analysis. *International Journal of Energy Research*, 28(9), 833-846. <https://doi.org/10.1002/er.999>
- Pallarès, I., Vendrell, J., Avilés, F. X., & Ventura, S. (2004). Amyloid Fibril Formation by a Partially Structured Intermediate State of α -Chymotrypsin. *Journal of Molecular Biology*, 342(1), 321-331. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.089>
- Pan, J., Zhang, Z., Mintah, B. K., Xu, H., Dabbour, M., Cheng, Y., Dai, C., He, R., & Ma, H. (2022). Effects of nonthermal physical processing technologies on functional, structural properties and digestibility of food protein : A review. *Journal of Food Process Engineering*, 45(4), 1-16. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14010>
- Panghal, A., Patidar, R., Jaglan, S., Chhikara, N., Khatkar, S. K., Gat, Y., & Sindhu, N. (2018). Whey valorization : Current options and future scenario – a critical review. *Nutrition & Food Science*, 48(3), 520-535. <https://doi.org/10.1108/NFS-01-2018-0017>
- Parlement Européen et Conseil. (2002a). *Directive—2002/32—EN - EUR-Lex*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2002/32/oj/eng>
- Parlement Européen et Conseil. (2002b). *EUR-Lex—02002R0178-20210526—EN - EUR-Lex*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2002/178/2021-05-26/eng>

- Patil, P. J. (2024). Exploring the Modern Bioactive Peptides (BAPs) Universe : Doors to the Future. *Peptide Science*, 116(5), e24366. <https://doi.org/10.1002/pep2.24366>
- Pei, J., Gao, X., Pan, D., Hua, Y., He, J., Liu, Z., & Dang, Y. (2022). Advances in the stability challenges of bioactive peptides and improvement strategies. *Current Research in Food Science*, 5, 2162-2170. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.10.031>
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., & von Fellenberg, R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENERAL SUBJECTS*, 1426(3), 439-448. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00165-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00165-2)
- Peng, W., Kong, X., Chen, Y., Zhang, C., Yang, Y., & Hua, Y. (2016). Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins. *Food Hydrocolloids*, 52, 301-310. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.06.025>
- Pereira, R. N., & Vicente, A. A. (2010). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43(7), 1936-1943. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.013>
- Permyakov, E. A. (2020). α -Lactalbumin, Amazing Calcium-Binding Protein. *Biomolecules*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/biom10091210>
- Permyakov, E. A., & Berliner, L. J. (2000). α -Lactalbumin : Structure and function. *FEBS Letters*, 473(3), 269-274. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01546-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01546-5)
- Permyakov, E. A., Permyakov, S. E., Breydo, L., Redwan, E. M., Almehdar, H. A., & Uversky, V. N. (2016). Disorder in Milk Proteins : α -Lactalbumin. Part A. Structural Properties and Conformational Behavior. *Current Protein & Peptide Science*, 17(4), 352-367. <https://doi.org/10.2174/138920371704160405001222>

- Pescuma, M., de Valdez, G. F., & Mozzi, F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), 6183-6196. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6766-z>
- Peydayesh, M., Bagnani, M., Soon, W. L., & Mezzenga, R. (2023). Turning Food Protein Waste into Sustainable Technologies. *Chemical Reviews*, 123(5), 2112-2154. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00236>
- Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., & Pereira, C. D. (2021). Dairy By-Products : A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/foods10051067>
- Pourmadadi, M., Farokh, A., Rahmani, E., Shamsabadipour, A., Eshaghi, M. M., Rahdar, A., & Ferreira, L. F. R. (2022). Porous alumina as potential nanostructures for drug delivery applications, synthesis and characteristics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 77, 103877. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103877>
- Pugnière, M., San Juan, C., Coletti-Previero, M.-A., & Previero, A. (1988). Immobilization of enzymes on alumina by means of pyridoxal 5'-phosphate. *Bioscience Reports*, 8(3), 263-269. <https://doi.org/10.1007/BF01115043>
- Ramírez-Rodríguez, L. C., Díaz Barrera, L. E., Quintanilla-Carvajal, M. X., Mendoza-Castillo, D. I., Bonilla-Petriciolet, A., & Jiménez-Junca, C. (2020). Preparation of a Hybrid Membrane from Whey Protein Fibrils and Activated Carbon to Remove Mercury and Chromium from Water. *Membranes*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/membranes10120386>
- Rehman, A., Gulfranz, M., Raja, G. K., Haq, M. I. U., & Anwar, Z. (2015). A Comprehensive Approach to Utilize an Agricultural Pea peel (*Pisum sativum*) Waste as a Potential Source for Bio-ethanol Production. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(3).

- Ren, Y., Li, Q., Zhang, C., & Qian, J.-Y. (2025). Implications for structural and digestive properties of broad bean protein modified by pulsed electric field. *Journal of Food Engineering*, 391, 112444. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2024.112444>
- Rizzello, C. G., Tagliazucchi, D., Babini, E., Sefora Rutella, G., Taneyo Saa, D. L., & Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices : Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549-569. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.023>
- Robbins, F. M., & Holmes, L. G. (1970). Circular dichroism spectra of α -lactalbumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 221(2), 234-240. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(70\)90263-1](https://doi.org/10.1016/0005-2795(70)90263-1)
- Robles-López, M. R., Robles de la Torre, R., Camarillo-Cadena, M., Hernández-Arana, A., Welti-Chanes, J. S., & Hernández-Sánchez, H. (2012). Efecto de los campos eléctricos pulsantes sobre la estructura de la α -lactoalbúmina bovina. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(3), 373-382.
- Rocha, C. M. R., Genisheva, Z., Ferreira-Santos, P., Rodrigues, R., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Pereira, R. N. (2018). Electric field-based technologies for valorization of bioresources. *Bioresource Technology*, 254, 325-339. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.068>
- Romo, M., Castellari, M., Fartdinov, D., & Felipe, X. (2023). Separation of α -Lactalbumin Enriched Fraction from Bovine Native Whey Concentrate by Combining Membrane and High-Pressure Processing. *Foods*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods12030480>
- Roy, S., & Teron, R. (2019). BioDADPep : A Bioinformatics database for anti diabetic peptides. *Bioinformatics*, 15(11), 780-783. <https://doi.org/10.6026/97320630015780>

- Rudolph, S., Lunow, D., Kaiser, S., & Henle, T. (2017). Identification and quantification of ACE-inhibiting peptides in enzymatic hydrolysates of plant proteins. *Food Chemistry*, 224, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.039>
- Rukhma, Ghazi, M., Mujahid, A., Mukhtar, H., Sarwar, A., Ullah, N., Aziz, T., Alharbi, M., Alasmari, A. F., & Albekairi, T. H. (2024). Fabrication of polydopamine-functionalized nanobioconjugates for improved stability and catalytic efficiency towards industrial application. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(13), 15129-15142. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-05114-8>
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 170-184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- Santos, C. S., Carbas, B., Castanho, A., Vasconcelos, M. W., Vaz Patto, M. C., Domoney, C., & Brites, C. (2019). Variation in Pea (*Pisum sativum* L.) Seed Quality Traits Defined by Physicochemical Functional Properties. *Foods*, 8(11), 570. <https://doi.org/10.3390/foods8110570>
- Santos, M. P. F., de Souza Junior, E. C., Villadóniga, C., Vallés, D., Castro-Sowinski, S., Bonomo, R. C. F., & Veloso, C. M. (2024). Proteases : Importance, Immobilization Protocols, Potential of Activated Carbon as Support, and the Importance of Modifying Supports for Immobilization. *BioTech*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/biotech13020013>
- Sebastián-Nicolás, J. L., González-Olivares, L. G., Vázquez-Rodríguez, G. A., Lucho-Constatino, C. A., Castañeda-Ovando, A., & Cruz-Guerrero, A. E. (2020). Valorization of whey using a biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(5), 1010-1027. <https://doi.org/10.1002/bbb.2100>

- Serralheiro, M. L. M., & Cabral, J. M. S. (1999). Irreversible thermoinactivation of α -chymotrypsin in buffer and water miscible organic solvent. Comparison with a reverse micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7(1), 191-205. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00029-6)
- Shanthakumar, P., Klepacka, J., Bains, A., Chawla, P., Dhull, S. B., & Najda, A. (2022). The Current Situation of Pea Protein and Its Application in the Food Industry. *Molecules*, 27(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/molecules27165354>
- Sheldon, R. A., Basso, A., & Brady, D. (2021). New frontiers in enzyme immobilisation : Robust biocatalysts for a circular bio-based economy. *Chemical Society Reviews*, 50(10), 5850-5862. <https://doi.org/10.1039/D1CS00015B>
- Shen, Q., Xiong, T., Dai, J., Chen, X., Wang, L., Li, Y., Li, J., Li, B., & Chen, Y. (2022). Effects of pH-shifting treatments on oil-water interfacial properties of pea protein isolates : Identification and quantification of proteins at interfacial protein layer. *Food Hydrocolloids*, 133, 107937. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107937>
- Shen, X., Fang, T., Gao, F., & Guo, M. (2017). Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post-thermal aggregation. *Food Hydrocolloids*, 63, 668-676. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.003>
- Shen, Y., Hong, S., & Li, Y. (2022). Chapter Three - Pea protein composition, functionality, modification, and food applications : A review. In J. Wu (Éd.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 101, p. 71-127). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.02.002>
- Shi, Y.-J., Chiou, J.-T., Huang, C.-H., Lee, Y.-C., Wang, L.-J., & Chang, L.-S. (2020). Modification of carboxyl groups converts α -lactalbumin into an active molten globule

- state with membrane-perturbing activity and cytotoxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1697-1706.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.095>
- Shirley, B. A. (1995). *Protein Stability and Folding : Theory and Practice*. Humana Press.
<http://ebookcentral.proquest.com/lib/ulaval/detail.action?docID=3062001>
- Shoaib, A., Sahar, A., Sameen, A., Saleem, A., & Tahir, A. T. (2018). Use of pea and rice protein isolates as source of meat extenders in the development of chicken nuggets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(9), e13763.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.13763>
- Siddiqui, I., & Husain, Q. (2019). Stabilization of polydopamine modified silver nanoparticles bound trypsin : Insights on protein hydrolysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 733-741. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.021>
- Sigurdardóttir, S. B., Lehmann, J., Ovtar, S., Grivel, J.-C., Negra, M. D., Kaiser, A., & Pinelo, M. (2018). Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications : Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 360(14), 2578-2607.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201800307>
- Singh, N., & Gaur, S. (2024). New insights into multifunctional aspects of milk derived bioactive peptides : A review. *Food Chemistry Advances*, 4, 100628.
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100628>
- Smithers, G. W. (2015a). Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>
- Smithers, G. W. (2015b). Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>

- Socas-Rodríguez, B., Álvarez-Rivera, G., Valdés, A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2021). Food by-products and food wastes : Are they safe enough for their valorization? *Trends in Food Science & Technology*, 114, 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.002>
- Song, J., Lei, T., Yang, Y., Wu, N., Su, P., & Yang, Y. (2018). Attachment of enzymes to hydrophilic magnetic nanoparticles through DNA-directed immobilization with enhanced stability and catalytic activity. *New Journal of Chemistry*, 42(11), 8458-8468. <https://doi.org/10.1039/C8NJ00426A>
- Soumati, B., Atmani, M., Benabderrahmane, A., & Benjelloun, M. (2023). Whey Valorization – Innovative Strategies for Sustainable Development and Value-Added Product Creation. *Journal of Ecological Engineering*, 24(10), 86-104. <https://doi.org/10.12911/22998993/169505>
- Souza, P. M., Aliakbarian, B., Filho, E. X. F., Magalhães, P. O., Junior, A. P., Converti, A., & Perego, P. (2015). Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043>
- Stănciuc, N., & Râpeanu, G. (2010). An overview of bovine α -lactalbumin structure and functionality. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI - Food Technology*, 34(2), Article 2.
- Subaşı, B. G., Jahromi, M., Casanova, F., Capanoglu, E., Ajalloueiian, F., & Mohammadifar, M. A. (2021). Effect of moderate electric field on structural and thermo-physical properties of sunflower protein and sodium caseinate. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 67, 102593. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102593>

- Sun, H., Sun, J., Dou, N., Li, J., Hussain, M. A., Ma, J., & Hou, J. (2023). Characterization and comparison of structure, thermal and functional characteristics of various commercial pea proteins. *Food Bioscience*, 53, 102740. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102740>
- Sureshkumar, M., & Lee, C.-K. (2011). Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 775-780. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.036>
- Tassoni, A., Tedeschi, T., Zurlini, C., Cigognini, I. M., Petrusan, J.-I., Rodríguez, Ó., Neri, S., Celli, A., Sisti, L., Cinelli, P., Signori, F., Tsatsos, G., Bondi, M., Verstringe, S., Bruggerman, G., & Corvini, P. F. X. (2020). State-of-the-Art Production Chains for Peas, Beans and Chickpeas—Valorization of Agro-Industrial Residues and Applications of Derived Extracts. *Molecules*, 25(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/molecules25061383>
- Terres Univia, FranceAgriMer. (2021). *La filière du pois en France*.
- Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., & Jean, J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 706-714. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.014>
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2006). Review : Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing. *Food Reviews International*, 22(4), 405-423. <https://doi.org/10.1080/87559120600865164>
- Toldrá, F., Gallego, M., Reig, M., Aristoy, M.-C., & Mora, L. (2020). Recent Progress in Enzymatic Release of Peptides in Foods of Animal Origin and Assessment of

- Bioactivity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(46), 12842-12855.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08297>
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M.-C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395-404.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>
- Topoglidis, E., Discher, B. M., Moser, C. C., Dutton, P. L., & Durrant, J. R. (2003). Functionalizing Nanocrystalline Metal Oxide Electrodes With Robust Synthetic Redox Proteins. *ChemBioChem*, 4(12), 1332-1339.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200300707>
- Torres de Souza, I., Moreira, F. S., de Souza Ferreira, J., Cardoso, V. L., & Batista, F. R. X. (2019). Technological advances in hydrogen production by *Enterobacter* bacteria upon substrate, luminosity and anaerobic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(31), 16190-16198.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.036>
- Torres, J., Rutherford, S. M., Muñoz, L. S., Peters, M., & Montoya, C. A. (2016). The impact of heating and soaking on the in vitro enzymatic hydrolysis of protein varies in different species of tropical legumes. *Food Chemistry*, 194, 377-382.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.022>
- Turgeon, S. L., Bard, C., & Gauthier, S. F. (1991). Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24(1), 14-18.
[https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(91\)70013-8](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(91)70013-8)

- Tzitzikas, E. N., Vincken, J.-P., de Groot, J., Gruppen, H., & Visser, R. G. F. (2006). Genetic Variation in Pea Seed Globulin Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(2), 425-433. <https://doi.org/10.1021/jf0519008>
- Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *108*, 27-39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>
- USDA. (2025). *Search Accessions GRIN-Global*. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search>
- Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., & Almonacid, S. (2015). Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, *50*(4), 589-597. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028>
- Vargha, A., & Delaney, H. D. (1998). The Kruskal-Wallis Test and Stochastic Homogeneity. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, *23*(2), 170-192. <https://doi.org/10.3102/10769986023002170>
- Velusamy, V., & Palaniappan, L. (2016). Effect of pH and Glucose on the Stability of α -lactalbumin. *Food Biophysics*, *11*(1), 108-115. <https://doi.org/10.1007/s11483-015-9423-2>
- Vreeke, G. J. C., Vincken, J.-P., & Wierenga, P. A. (2023). The path of proteolysis by bovine chymotrypsin. *Food Research International*, *165*, 112485. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112485>
- Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F., & Ghoshal, S. K. (2020). On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. *Reactive and Functional Polymers*, *152*, 104613. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613>

- Wang, D., & Jiang, W. (2019). Preparation of chitosan-based nanoparticles for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1125-1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.243>
- Wang, J., Kadyan, S., Ukhanov, V., Cheng, J., Nagpal, R., & Cui, L. (2022). Recent advances in the health benefits of pea protein (*Pisum sativum*): Bioactive peptides and the interaction with the gut microbiome. *Current Opinion in Food Science*, 48, 100944. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100944>
- Wang, J., Wang, L., Yu, H., Zain-ul-Abdin, Chen, Y., Chen, Q., Zhou, W., Zhang, H., & Chen, X. (2016). Recent progress on synthesis, property and application of modified chitosan: An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.002>
- Wang, J.-M., Xia, N., Yang, X.-Q., Yin, S.-W., Qi, J.-R., He, X.-T., Yuan, D.-B., & Wang, L.-J. (2012). Adsorption and Dilatational Rheology of Heat-Treated Soy Protein at the Oil–Water Interface: Relationship to Structural Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3302-3310. <https://doi.org/10.1021/jf205128v>
- Wang, M., Chen, X., Dong, L., Nan, X., Ji, W., Wang, S., Sun, W., & Zhou, Q. (2021). Modification of pea dietary fiber by ultrafine grinding and hypoglycemic effect in diabetes mellitus mice. *Journal of Food Science*, 86(4), 1273-1282. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15669>
- Wang, N., Hatcher, D. W., Warkentin, T. D., & Toews, R. (2010). Effect of cultivar and environment on physicochemical and cooking characteristics of field pea (*Pisum sativum*). *Food Chemistry*, 118(1), 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.082>

- Wang, X., Zhou, H., Xu, Z., Wu, H., Lan, C. Q., & Zhang, J. (2024). Immobilization of alcalase on polydopamine modified magnetic particles. *Biochemical Engineering Journal*, 207, 109310. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109310>
- Wehbi, Z., Pérez, M.-D., Sánchez, L., Pocoví, C., Barbana, C., & Calvo, M. (2005). Effect of Heat Treatment on Denaturation of Bovine α -Lactalbumin : Determination of Kinetic and Thermodynamic Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(25), 9730-9736. <https://doi.org/10.1021/jf050825y>
- Wei, Y., Zhang, R., Fang, L., Qin, X., Cai, M., Gu, R., Lu, J., & Wang, Y. (2019). Hypoglycemic effects and biochemical mechanisms of Pea oligopeptide on high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Food Biochemistry*, 43(12), e13055. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13055>
- Wen, Q., Zhang, L., Zhao, F., Chen, Y., Su, Y., Zhang, X., Chen, P., & Zheng, T. (2022). Production Technology and Functionality of Bioactive Peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 29(9), 652-674. <https://doi.org/10.2174/1381612829666230201121353>
- Wong, D. E., Senecal, K. J., & Goddard, J. M. (2017). Immobilization of chymotrypsin on hierarchical nylon 6,6 nanofiber improves enzyme performance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154, 270-278. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.033>
- Wu, D.-T., Li, W.-X., Wan, J.-J., Hu, Y.-C., Gan, R.-Y., & Zou, L. (2023). A Comprehensive Review of Pea (*Pisum sativum* L.): Chemical Composition, Processing, Health Benefits, and Food Applications. *Foods*, 12(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/foods12132527>

- Wu, J. C. Y., Hutchings, C. H., Lindsay, M. J., Werner, C. J., & Bundy, B. C. (2015). Enhanced Enzyme Stability Through Site-Directed Covalent Immobilization. *Journal of Biotechnology*, *193*, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.10.039>
- Xiang, B. Y., Ngadi, M. O., Ochoa-Martinez, L. A., & Simpson, M. V. (2011). Pulsed Electric Field-Induced Structural Modification of Whey Protein Isolate. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(8), 1341-1348. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0266-z>
- Xie, D., Du, L., Lin, H., Su, E., Shen, Y., Xie, J., & Wei, D. (2022). In vitro-in silico screening strategy and mechanism of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from α -lactalbumin. *LWT*, *156*, 112984. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112984>
- Xie, D., Shen, Y., Su, E., Du, L., Xie, J., & Wei, D. (2022). The effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide VGINYW and the hydrolysate of α -lactalbumin on blood pressure, oxidative stress and gut microbiota of spontaneously hypertensive rats. *Food & Function*, *13*(5), 2743-2755. <https://doi.org/10.1039/D1FO03570C>
- Xie, X., Tang, J., Xing, Y., Wang, Z., Ding, T., Zhang, J., & Cai, K. (2021). Intervention of Polydopamine Assembly and Adhesion on Nanoscale Interfaces : State-of-the-Art Designs and Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials*, *10*(9), 2002138. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002138>
- Xiong, T., Xiong, W., Ge, M., Xia, J., Li, B., & Chen, Y. (2018). Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate. *Food Research International*, *109*, 260-267. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.044>

- Xu, F.-Y., Wen, Q.-H., Wang, R., Li, J., Chen, B.-R., & Zeng, X.-A. (2021). Enhanced synthesis of succinylated whey protein isolate by pulsed electric field pretreatment. *Food Chemistry*, 363, 129892. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129892>
- Xue, L., Yin, R., Howell, K., & Zhang, P. (2021). Activity and bioavailability of food protein-derived angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1150-1187. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12711>
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 1), 756-774. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
- Yang, F., Zhang, M., Chen, J., & Liang, Y. (2006). Structural changes of α -lactalbumin induced by low pH and oleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764(8), 1389-1396. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.06.012>
- Yushkova, E. D., Nazarova, E. A., Matyuhina, A. V., Noskova, A. O., Shavronskaya, D. O., Vinogradov, V. V., Skvortsova, N. N., & Krivoschapkina, E. F. (2019). Application of Immobilized Enzymes in Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(42), 11553-11567. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04385>
- Zhang, L., Wang, L.-J., Jiang, W., & Qian, J.-Y. (2017). Effect of pulsed electric field on functional and structural properties of canola protein by pretreating seeds to elevate oil yield. *LWT*, 84, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.048>
- Zhang, M., Zhu, L., Wu, G., Liu, T., Qi, X., & Zhang, H. (2024). Food-derived dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides: Production, identification, structure-activity relationship, and their potential role in glycemic regulation. *Critical Reviews in Food*

Science and Nutrition, 64(8), 2053-2075.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2120454>

Zhang, W., & Lai, E. P. C. (2022). Chemical Functionalities of 3-aminopropyltriethoxysilane for Surface Modification of Metal Oxide Nanoparticles. *Silicon*, 14(12), 6535-6545. <https://doi.org/10.1007/s12633-021-01477-7>

Zhang, X., Wang, C., Qi, Z., Zhao, R., Wang, C., & Zhang, T. (2022). Pea protein based nanocarriers for lipophilic polyphenols: Spectroscopic analysis, characterization, chemical stability, antioxidant and molecular docking. *Food Research International*, 160, 111713. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111713>

Zhang, Y., Chen, R., Chen, X., Zeng, Z., Ma, H., & Chen, S. (2016). Dipeptidyl Peptidase IV-Inhibitory Peptides Derived from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(4), 831-839. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05429>

Zhao, W., & Yang, R. (2012). Pulsed Electric Field Induced Aggregation of Food Proteins: Ovalbumin and Bovine Serum Albumin. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1706-1714. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0464-8>

Zheng, L., Wang, Z., Kong, Y., Ma, Z., Wu, C., Regenstein, J. M., Teng, F., & Li, Y. (2021). Different commercial soy protein isolates and the characteristics of Chiba tofu. *Food Hydrocolloids*, 110, 106115. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106115>

Zheng, L., Xu, Q., Lin, L., Zeng, X.-A., Sun, B., & Zhao, M. (2019). In Vitro Metabolic Stability of a Casein-Derived Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) Inhibitory Peptide VPYPQ and Its Controlled Release from Casein by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(38), 10604-10613. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03164>

- Zhou, J., Li, D., Zhang, X., Liu, C., & Chen, Y. (2023). Valorization of protein-rich waste and its application. *Science of The Total Environment*, 901, 166141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166141>
- Zhou, Z., & Hartmann, M. (2013). Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3894-3912. <https://doi.org/10.1039/C3CS60059A>
- Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules*, 19(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>