

Pouvoir antioxydant des protéines de colostrum camelin et leurs hydrolysats enzymatiques

OUSSAIEF O. (1), JRAD Z. (1), ADT I. (2), KHORCHANI T. (1), EI-HATMI H. (1,3)

(1) Institut des Régions Arides – Laboratoire d'Elevage et Faune Sauvage, Université de Gabès, El Fejaa, 4119 Medenine, tunisie

(2) BiodyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires) – Equipe Mixte d'Accueil n°3733, IUT Lyon 1, Université Claude Bernard Lyon 1, 01000 Bourg en Bresse, France

(3) Institut Supérieur de Biologie Appliquée – Département Agro-alimentaire, Université de Gabès, El Fejaa, 4119 Medenine, Tunisie

RESUME

L'objectif de ce travail est de déterminer l'activité antioxydante des protéines de colostrum camelin avant et après leur hydrolyse par des enzymes protéolytiques à savoir la pancréatine, la papaïne et la pronase. L'hydrolyse des protéines de colostrum a été réalisée à un rapport enzyme/substrat (protéines) de 1: 100 (m/m) pendant 6 h à 37 °C. La distribution de la masse moléculaire des peptides générés a été déterminée en utilisant une chromatographie de filtration sur gel. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant deux tests *in vitro* : l'activité antiradicalaire (test ABTS) et le pouvoir de chélation des ions ferreux. Les résultats ont montré que le taux des peptides ayant une faible masse moléculaire (< 1 kDa) a été plus important dans les hydrolysats que dans les protéines natives ce qui confirme l'hydrolyse des protéines de colostrum par les différentes enzymes. Les protéines de colostrum camelin ont eu la capacité de neutraliser les radicaux ABTS et de chélater les ions ferreux avant et après leur hydrolyse enzymatique. Toutefois, l'activité antioxydante de tous les hydrolysats a été significativement plus élevée que celle des protéines natives à différentes concentrations ($P < 0,05$). Tous les hydrolysats ont montré une activité antioxydante d'une manière dépendante de la dose. À une concentration de 1 mg/ml, l'activité antiradicalaire et le pouvoir chélateur des ions ferreux ont dépassé 93% et 47% respectivement pour tous les hydrolysats de protéines de colostrum camelin. Le potentiel antioxydant le plus élevé a été trouvé dans les hydrolysats pancréatiques ($P < 0,05$). Ces résultats suggèrent que les hydrolysats de protéines de colostrum camelin pourraient être utilisés comme source des antioxydants naturels dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Antioxidant activity of dromedary colostrum proteins and their enzymatic hydrolysates

OUSSAIEF O. (1), JRAD Z. (1), ADT I. (2), KHORCHANI T. (1), EI-HATMI H. (1,3)

(1) Institut des Régions Arides – Laboratoire d'Elevage et Faune Sauvage, Université de Gabès, El Fejaa, 4119 Medenine, tunisie

SUMMARY

The objective of this work is to determine the antioxidant activity of camel colostrum proteins before and after their hydrolysis by proteolytic enzymes namely pancreatin, papain and pronase. The hydrolysis of colostrum proteins was carried out at an enzyme/substrate (proteins) ratio of 1: 100 (m/m) for 6 h at 37 °C. The molecular mass distribution of the generated peptides was determined using gel filtration chromatography. Antioxidant activity was assessed using two *in vitro* tests: ABTS radical activity and the ferrous ion chelating power. The results showed that the level of peptides with a low molecular mass (<1 kDa) was greater in the hydrolysates than in the native proteins, which confirms the hydrolysis of colostrum proteins by the various enzymes. Dromedary colostrum proteins had the ability to neutralize ABTS radicals and chelate ferrous ions before and after their enzymatic hydrolysis. However, the antioxidant activity of all the hydrolysates was significantly higher than that of the native proteins at different concentrations ($P < 0.05$). All the hydrolysates showed an antioxidant activity in a dose dependent manner. At the concentration of 1 mg/ml, the ABTS radical scavenging activity and the chelating power of ferrous ions exceeded 93% and 47% respectively for all the protein hydrolysates. The highest antioxidant potential was found in pancreatic hydrolysates ($P < 0.05$). These results suggest that dromedary colostrum protein hydrolysates could be used as a source of natural antioxidants in food and pharmaceutical industries.

INTRODUCTION

La consommation des antioxydants est nécessaire pour éviter le stress oxydatif qui est impliqué dans plusieurs maladies dont les troubles neurodégénératifs, l'hypertension, le cancer et les maladies inflammatoires. Le stress oxydatif correspond à une quantité excessive des espèces réactives de l'oxygène en raison d'un déséquilibre entre leur production et leur destruction dans l'organisme. Ce dernier a ses propres défenses antioxydantes. Cependant, leur efficacité est limitée et elle ne peut pas empêcher tous les dommages oxydatifs exogènes tels que la pollution, le stress psychologique et le tabagisme (Poljsak *et al.* 2013). Plusieurs antioxydants

synthétiques ont été utilisés dans les industries alimentaires et pharmaceutiques pour agir contre le stress oxydatif. Néanmoins, les antioxydants synthétiques doivent être utilisés sous une réglementation stricte en raison de leur toxicité. Par conséquent, il existe un intérêt croissant pour trouver des alternatives plus saines, provenant de sources naturelles, aux antioxydants synthétiques.

Le colostrum est le lait produit par les mammifères pendant les premiers jours suivant leur mise bas. La composition du colostrum camelin (*Camelus dromedarius*) diffère du lait camelin car il contient de grandes quantités de protéines sériques, essentiellement les immunoglobulines G (IgG) et la lactoferrine. La β -lactoglobuline, la principale protéine du colostrum bovin, est absente du colostrum camelin (El-Hatmi

et al. 2007). En outre, le colostrum camelin contient peu de matière grasse et de caséines par rapport au lait mature (Jrad et al. 2014). Cette composition protéique spécifique du colostrum camelin peut révéler des activités biologiques particulières. Les hydrolysats des protéines du lait camelin ont été signalés comme une source importante de peptides antioxydants (Al-Shamsi et al. 2020). En effet, les protéines du lait contiennent des séquences cryptées de peptides bioactifs qui pourraient être libérés suivant leur hydrolyse par des enzymes protéolytiques (Bamdad et al. 2017). Le but de ce travail est de déterminer l'activité antioxydante des protéines du colostrum camelin et de leurs hydrolysats obtenus par diverses enzymes protéolytiques.

1. MATERIEL ET METHODES

Le colostrum a été collecté dans les 24 h suivant la parturition de dix dromadaires (*Camelus dromedarius*) multipares élevées en semi-extensif et appartenant au troupeau expérimental du laboratoire d'Elevage et Faune Sauvage (Institut des Régions Arides, Médenine, Tunisie). La composition du colostrum camelin collecté figure dans le Tableau 1.

Tableau 1 Composition chimique du colostrum camelin

Paramètres	Protéines	Lactose	Matière grasse	Matière minérale
Teneur (g/l)	108,32±0,31	37,59±0,42	1,97±0,15	9,82±0,03

Le colostrum camelin a été dégraissé par centrifugation à 5000 g pendant 30 min à 4 °C. Par la suite, le colostrum écrémé a été lyophilisé et conservé à -20 °C jusqu'à utilisation ultérieure. Le colostrum camelin lyophilisé a été dissous dans l'eau ultrapure à 2,5% (m/m, sur la base des protéines) et la solution a été ajustée à la valeur du pH optimale pour l'activité de chaque enzyme selon les instructions du fabricant (8,0 pour la pancréatine et la pronase et 6,5 pour la papaïne). L'hydrolyse des protéines du colostrum camelin a été réalisée à un rapport enzyme/substrat (protéines) de 1: 100 (m/m) pendant 6 h à 37 °C dans un bain-marie sous agitation constante (150 tr/min). À la fin de l'hydrolyse, les échantillons ont été chauffés (85 °C; 20 min) pour arrêter la réaction enzymatique. Les mélanges ont été centrifugés (10 000 g, 15 min, 4 °C); et les surnageants, contenant les hydrolysats des protéines du colostrum camelin (HPCD), ont été collectés, lyophilisés et stockés à -20 °C. Les hydrolysats obtenus par traitement avec la pancréatine, la papaïne et la pronase, ont été notés respectivement HPCD-Pan et HPCD-Pap et HPCD-Pro. Des contrôles ont été menés sans addition d'enzymes et se référaient aux protéines du colostrum camelin non digérées (PCD).

La distribution de la masse moléculaire de la fraction protéique des protéines du colostrum camelin et leurs hydrolysats a été déterminée par la méthode de Dupas et al. (2009). Un système de chromatographie liquide haute performance Shimadzu-Nexera XR équipé d'une colonne Superdex® Peptide PE 7.5/300 a été utilisé. Les échantillons (50 µl) ont été chargés dans la colonne. L'élution a été réalisée à 35 °C pendant 120 min en utilisant 30% d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1% dans l'acétonitrile et 70% de TFA à 0,1% dans l'eau à un débit de 0,25 ml/min. L'absorbance a été contrôlée à 215 nm. Une courbe d'étalonnage a été établie à partir de la masse moléculaire des marqueurs standards et de leur temps d'élution respectifs. La distribution de la masse moléculaire des échantillons a été déterminée à partir de la courbe standard. L'activité de piégeage des radicaux ABTS (2,2'-azinobis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) a été réalisée en utilisant la méthode de Re et al. (1999) avec quelques modifications. Les échantillons (250 µl) à différentes concentrations (0,25 -1,0 mg/ml) ont été mélangés avec 1,0

ml d'une solution d'ABTS. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 min à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (Cecil CE 2041, Cambridge, UK). Le contrôle a été effectué en utilisant l'eau distillée à la place de l'échantillon. L'activité de piégeage des radicaux ABTS a été calculée comme suit :

Piégeage des radicaux ABTS (%)= (absorbance contrôle-absorbance échantillon/ absorbance contrôle) ×100

Le pouvoir chélateur des ions ferreux a été estimé par la méthode de Zhu et al. (2006) avec quelques modifications. Un volume de 1,0 ml de chaque échantillon à différentes concentrations (0,5-3,0 mg/ml) a été additionné à 1,0 ml d'eau distillée et 0,05 ml d'une solution de FeCl₂ (2 mM). Les mélanges ont été incubés pendant 30 s et la réaction a été initiée en ajoutant 0,1 ml d'une solution de ferrozine (5 mM). Après 10 min de réaction, l'absorbance a été mesurée à 562 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (Cecil CE 2041, Cambridge, UK) et le pouvoir chélateur a été calculé comme décrit pour le test ABTS.

Chaque expérience a été réalisée en triple. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft, v19.02). Une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée, suivie du test de Tukey en utilisant une probabilité de 5%.

2. RESULTATS

2.1. DISTRIBUTION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES PROTEINES DU COLOSTRUM CAMELIN ET LEURS HYDROLYSATS

La distribution de la masse moléculaire de la fraction protéique des protéines du colostrum camelin et leurs hydrolysats a été déterminée par chromatographie de filtration sur gel (Tableau 2). Les hydrolysats contiennent principalement des peptides de faible masse moléculaire (<1 kDa) tandis que les protéines natives contiennent la plus faible proportion de ces peptides (23,58%), mais, la plus forte proportion des peptides au-dessus de 10 kDa (56,60%). La quantité des peptides de faible masse moléculaire la plus élevée (<1 kDa) se trouve dans les hydrolysats générés par la pronase (86,80%), suivi de ceux générés par la pancréatine (69,52%) et enfin les hydrolysats obtenus par la papaïne (50,11%).

Tableau 2 Distribution de la masse moléculaire de la fraction protéique (%).

	>10 kDa	10-5 kDa	5-1 kDa	<1 kDa
PCD	56,60	6,13	13,68	23,58
HPCD-Pan	16,94	0,61	12,94	69,52
HPCD-Pap	23,36	3,05	23,48	50,11
HPCD-Pro	6,31	0,64	6,25	86,80

2.2. ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES PROTEINES DU COLOSTRUM CAMELIN ET LEURS HYDROLYSATS

2.2.1. Piégeage des radicaux ABTS

L'activité d'élimination des radicaux ABTS des protéines du colostrum camelin et de leurs hydrolysats est présentée sur la Figure 1.

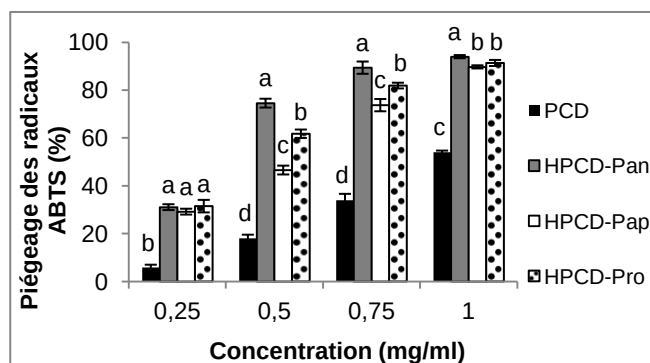


Figure 1 Piégeage des radicaux ABTS par les protéines du colostrum camelin et leurs hydrolysats. Les moyennes avec différentes lettres (a-d) sont significativement différentes.

Les protéines du colostrum camelin ont la capacité de neutraliser les radicaux ABTS avant et après leur hydrolyse enzymatique d'une manière dépendante de la dose ; l'activité antiradicalaire augmente avec l'augmentation de la concentration de l'échantillon. Cependant, l'activité de tous les hydrolysats est significativement plus élevée que celle des protéines natives à différentes concentrations ($P < 0,05$). Quelle que soit la concentration testée, les hydrolysats générés par la pancréatine ont présenté la plus grande activité d'élimination des radicaux ABTS ($P \leq 0,05$). Les valeurs IC₅₀, définies comme la concentration des échantillons nécessaires pour inhiber 50% de la concentration initiale du radical ABTS est de 0,35, 0,54 et 0,40 mg/ml pour les hydrolysats générés par la pancréatine, la papaïne et la pronase, respectivement. Pour les protéines natives du colostrum, elle est de 0,59 mg/ml.

2.2.2. Pouvoir chélateur

Le pouvoir chélateur des ions ferreux des protéines de colostrum de dromadaire et leurs hydrolysats à différentes concentrations est illustrée sur la Figure 2. L'hydrolyse enzymatique des protéines du colostrum augmente leur activité de chélation des ions ferreux quelle que soit l'enzyme utilisée. Tous les hydrolysats ont montré un grand pouvoir chélateur d'une manière dépendante de la dose. À 3 mg/ml, le pouvoir chélateur dépasse 71% pour tous les hydrolysats. Les hydrolysats générés par la pancréatine, possédant l'activité de piégeage des radicaux ABTS la plus élevée, possède également le pouvoir chélateur le plus élevé à toutes les concentrations testées ($P \leq 0,05$). La valeur IC₅₀ est de 0,53, 1,06 et 0,98 mg/ml pour les hydrolysats générés par la pancréatine, la papaïne et la pronase. Cependant, le pouvoir chélateur des protéines natives du colostrum n'a pas atteint 50% même à une concentration de 3 mg/ml.

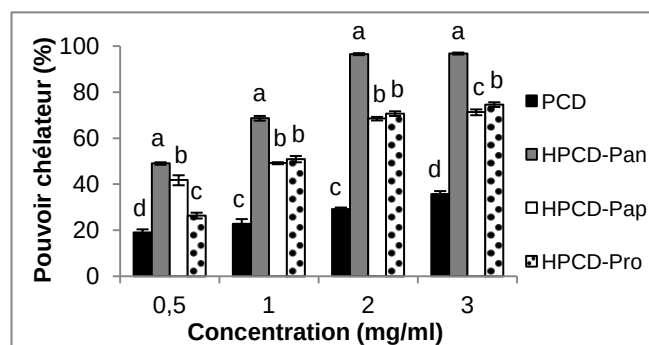


Figure 2 Pouvoir chélateur par les protéines du colostrum camelin et leurs hydrolysats. Les moyennes avec différentes lettres (a-d) sont significativement différentes.

3. DISCUSSION

Les résultats de la chromatographie de filtration sur gel confirme l'hydrolyse des protéines du colostrum par les enzymes protéolytiques utilisées vu que les peptides de faible masse moléculaire (<1 kDa) augmentent après l'hydrolyse enzymatique. La différence de la distribution de la masse moléculaire entre les hydrolysats dépend de l'enzyme utilisée. En effet, la pancréatine présente une grande spécificité, mais elle a une préférence pour Arg, Lys, Tyr et Leu. La papaïne attaque les liaisons Arg, Lys et Phe (Nongonierma et FitzGerald, 2015). Par ailleurs, la pronase a une très large spécificité d'action vis-à-vis des protéines car elle est formée par un ensemble des protéinases et des

peptidases issues de la souche *Streptomyces griseus* (Frackenhof et al. 2001).

L'ABTS est un radical libre qui accepte un électron ou un hydrogène pour devenir stable. Par conséquent, il est largement utilisé comme substrat pour évaluer l'activité antioxydante de divers composés (Re et al. 1999).

L'augmentation de l'activité de piégeage du radical ABTS après l'hydrolyse des protéines du colostrum camelin suggère que les hydrolysats contiennent des acides aminés ou des peptides qui sont des donneurs d'hydrogène ou des donneurs d'électrons et pourraient réagir avec le radical ABTS pour le transformer en un produit stable. L'exposition des groupes réactifs des protéines, comme les résidus d'acides aminés aromatiques et hydrophobes, après leur protéolyse enzymatique peut conduire à l'amélioration de l'activité antioxydante des protéines (Brandelli et al. 2015). La différence de la capacité d'élimination du radical ABTS entre les hydrolysats pourrait être due à la différence de la séquence en acides aminés des peptides au sein de ces hydrolysats, car les enzymes utilisées ont des spécificités différentes.

L'activité de piégeage du radical ABTS par tous les hydrolysats du colostrum camelin est supérieure à celle des hydrolysats des protéines préparés par Oh et al. (2013) à partir du lait de vache, qui présentent des valeurs d'inhibition du radical ABTS de 50% à une fourchette des concentrations de 1,17-10 mg/ml.

Les ions des métaux de transition comme le Fe^{2+} accélèrent la génération des espèces réactives de l'oxygène à travers la réaction de Fenton, ce qui accélère le processus de l'oxydation (Bamdad et al. 2017). Par conséquent, l'évaluation du pouvoir chélateur est une mesure importante des propriétés antioxydante. L'augmentation du pouvoir chélateur des protéines du colostrum camelin après leur hydrolyse enzymatique prouve la libération des peptides ayant un pouvoir chélateur du fer ferreux. Wiriyaphan et al. (2015) ont rapporté que les acides aminés acides et basiques dans les chaînes latérales jouent un rôle important dans la chélation des ions métalliques. Le pouvoir chélateur des hydrolysats des protéines du lait camelin préparés par Al-Shamsi et al. (2018) n'a pas dépassé 40% à une concentration de 5 mg/ml, ce qui est bien inférieur à celui des hydrolysats du colostrum camelin. Par conséquent, cette étude suggère que la différence entre le pouvoir chélateur des hydrolysats pourrait résulter de séquence des peptides résultant de l'hydrolyse enzymatique ainsi que les substrats utilisés. Il semblerait que la distribution de la masse moléculaire de la fraction protéique n'a pas influencé l'activité antioxydante (test ABTS et pouvoir chélateur). L'activité antioxydante est liée essentiellement à la séquence en acide aminés des peptides libérés au cours de l'hydrolyse.

CONCLUSION

Dans cette étude, des hydrolysats des protéines ont été générés à partir du colostrum camelin par des enzymes protéolytiques. L'activité antioxydante des protéines du colostrum, mesurées par deux tests *in vitro*, a augmenté après la protéolyse. La différence de l'activité antioxydante entre les hydrolysats est principalement due à la spécificité des enzymes utilisées. Les hydrolysats de protéines du colostrum obtenus avec la pancréatine ont montré l'activité antioxydante la plus élevée. D'autres études sont nécessaires pour purifier et identifier les peptides antioxydants des hydrolysats de protéines du colostrum camelin générées par la pancréatine.

Al-Shamsi K.A., Mudgil P., Hassan H.M., Maqsood S., 2018. J. Dairy. Sci., 101, 47–60

Bamdad F., Shin S.H., Suh J.W., Nimalaratne C., Sunwoo H., 2017. Molecules., 22., 609–618

Brandelli A., Daroit D.J., Corrêa A.P.F., 2015. Food. Res. Int., 73, 149–161

El-Hatmi H., Girardet J.M., Gaillard J.L., Yahyaoui M.H., Attia H., 2007. Small. Rum. Res., 70, 267–271

Frackenpohl J., Arvidsson P.I., Schreiber J.V., Seebach D., 2001. ChemBioChem., 2, 445–455

Jrad Z., El Hatmi H., Adt I., Girardet J.M., Cakir-Kiefer C., Jardin J., Degraeve P., Khorchani T., Oulahal N., 2014. Dairy. Sci. Technol., 94, 205–224

Nongonierma A.B., FitzGerald R.J., 2015. J.Func. Food., 17, 640–656

Oh N.S., Lee H.A., Lee J.Y., Joung J.Y., Lee K.B., Kim Y., Lee K.W., Kim S.H., 2013. J.Dairy. Sci., 96, 4899–4911

Poljsak B., Šuput D., Milisav, I., 2013. Oxid Med Cell Longev., 2013, 1-11

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., 1999. Free. Radical. Bio. Med., 26, 1231–1237

Wiriyaaphan, C., Xiao, H., Decker, E. A., Yongsawatdigul, J., 2015. Food Chem., 167, 7–15

Zhu K., Zhou H., Qian H., 2006. Process. Biochem., 41, 1296–1302