



## Composés bioactifs

### Etude du potentiel antioxydant de quatre fractions obtenues par ultrafiltration membranaire d'hydrolysats de protéines de fenugrec (*Trigonella foenumgraecum*)

Antioxidant properties of ultrafiltration membrane fractions obtained from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) proteins hydrolysates

Amine ALLAOU<sup>1\*</sup>, Khadidja ZOUD<sup>1\*</sup>, Moncef NASRI<sup>2</sup>, Ahmed BOUALGA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Nutrition Clinique et Métabolique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Oran1, Algérie. <sup>2</sup>Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax, Tunisie

Auteur correspondant : boualga.ahmed@univ-oran1.dz

Reçu le 17 novembre 2018, Révisé le 15 décembre 2018, Accepté le 31 décembre 2018

**Résumé Introduction.** Vu leur richesse en protéines, les légumineuses peuvent constituer une source potentielle de biopeptides. Ces derniers peuvent être libérés des protéines par une hydrolyse enzymatique contrôlée. Les hydrolysats, ainsi obtenus, sont formés d'un mélange de peptides. **Objectif.** Cette étude vise à évaluer, *in vitro*, l'activité antioxydante d'hydrolysats protéiques de fenugrec et de leurs fractions. **Matériel et méthodes.** Les protéines sont purifiées à partir de la farine de fenugrec délipidée, par précipitation au point isoélectrique. Ces protéines sont ensuite hydrolysées par deux enzymes : l'Espérase et la Purafect. Les hydrolysats obtenus (PFHE et PFHP, respectivement pour protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase et Purafect) sont alors fractionnés par ultrafiltration membranaire aux seuils de coupure moléculaire 30, 10 et 5 kDa. Les propriétés antioxydantes de chaque fraction ont été évaluées par la détermination de la capacité de piégeage du diphenylpicrylhydrazyl et du pouvoir de réduction de l'ion ferrique. **Résultats.** Les PFHE montrent des propriétés antioxydantes supérieures à celles enregistrées avec les PFHP. Les activités antioxydantes des deux hydrolysats varient d'une fraction à une autre, avec de meilleures activités enregistrées avec les fractions <5 kDa et >30 kDa. Les fractions ont montré des propriétés antioxydantes inférieures ou égales à celles des hydrolysats. **Conclusion.** Les hydrolysats de protéines de fenugrec possèdent des propriétés antioxydantes. Par ailleurs, ces propriétés ne sont pas significativement améliorées après fractionnement.

**Mots clés :** *Activité antioxydante, Hydrolysats, Protéines de fenugrec, Fractions, Ultrafiltration, DPPH, FRAP*

**Abstract Introduction.** Legumes may be a potential source of biopeptides. These biopeptides can be released from proteins by controlled enzymatic hydrolysis. The obtained

hydrolysates consist of a peptides mixture. **Objective.** This study was conducted to evaluate the *in vitro* antioxidant activity of fenugreek protein hydrolysates, and their fractions. **Material and methods.** Fenugreek proteins hydrolysates by Esperase- (EFPH), and by Purafect (PFPH) were then fractionated by membrane ultrafiltration at the molecular cutoff thresholds of 30, 10 and 5 kDa. The antioxidant activity of obtained hydrolysates and fractions was assayed, and compared by two antioxidant test: diphenylpicrylhydrazyl scavenging activity, and ferric reducing activity power. **Results.** EFPH exhibited higher antioxidant properties compared to PFPH. Among the fractions, those <5kDa and >30kDa showed the best antioxidant activities. However, the fractions showed antioxidant properties less than or equal to those of the hydrolysates. **Conclusion.** Fenugreek protein hydrolysates have antioxidant properties. Moreover, these properties are not significantly improved after fractionation.

**Keywords :** Antioxidant activity, Fenugreek proteins, Hydrolysate, Membrane fraction, DPPH, FRAP

---

### Introduction

Les protéines de légumineuses peuvent constituer une source potentielle de peptides biologiquement actifs [1]. Ces peptides bioactifs sont des séquences d'acides aminés (2-50 acides aminés) encryptées dans la molécule protéique et demeurent inactives jusqu'à ce qu'elles soient libérées par digestion gastro-intestinale ou par hydrolyse enzymatique *in vitro* [2,3].

La propriété antioxydante est une des propriétés biologiques attribuées aux hydrolysats et aux peptides. Les travaux sur les protéines de légumineuses et leurs hydrolysats rapportent que le soja est le mieux étudié [4,5]. Cependant, d'autres légumineuses ont fait l'objet de certains travaux. Setti *et al.* [6] ont rapporté que les propriétés antioxydantes des protéines de fenugrec semblent augmenter après leur fermentation. De même, Sbroggio *et al.* [7] ont noté que l'activité antioxydante, *in vitro*, des protéines de l'okara (sous-produit du soja) augmente après leur hydrolyse avec Alcalase et Flavourzyme.

Selon Sbroggio *et al.* [7], l'activité antioxydante dépend fortement du degré d'hydrolyse (DH), qui définit, en partie, la taille du peptide. Abu-Salem *et al.* [8] ont également noté que les peptides de soja, ayant un poids moléculaire faible, ont une meilleure propriété antioxydante, comparés aux peptides ayant un poids moléculaire élevé. Cette relation entre le DH et l'activité antioxydante est aussi observée avec les hydrolysats de protéines de pois chiche et de sésame [2,9]. Par ailleurs, les propriétés antioxydantes des peptides peuvent aussi dépendre de la protéase utilisée, la nature des peptides libérés et leur composition en acides aminés [10].

Étant donné qu'un hydrolysat est formé d'un ensemble hétérogène de peptides, et dont l'activité biologique peut varier d'un peptide à un autre, de nombreux essais ont été réalisés pour l'isolement, la purification et l'identification des fractions avec l'activité biologique désirée. Parmi ces techniques, on cite l'ultrafiltration, la chromatographie d'exclusion de taille, la chromatographie échangeuse d'ions ou encore la chromatographie en phase inverse. Ces procédés peuvent séparer les biopeptides dans les hydrolysats de protéines en fractions selon leurs propriétés physico-chimiques, tels que leur taille, leur charge ou leur caractère hydrophobe [3,11].

Le fenugrec reste très peu étudié, malgré sa richesse en protéines qui peuvent présenter une source potentielle de peptides bioactifs.

A cet effet, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante des différentes fractions des protéines hydrolysées de fenugrec, afin d'identifier la ou les fractions les plus actives.

### Matériel et méthodes

#### Matière première

Les grains de fenugrec, utilisés dans ce protocole, proviennent d'un marché local (Tiarat, Ouest algérien). Ils sont nettoyés, moulus puis tamisés pour obtenir une poudre fine (farine) qui est ensuite délipidée au Soxhlet (*Labotech LT-6, Allemagne*) avec du n-hexane (*Biochem Chemopharma, Royaume-Uni*).

#### Préparation de l'isolat de protéines de fenugrec

Les protéines de fenugrec (PF) sont extraites par précipitation au pH isoélectrique [12]. La farine de

fenugrec délipidée est mise en suspension dans l'eau distillée à un rapport 1:20 (p :v), sous agitation continue, le pH du mélange est ensuite ramené à 10 avec du NaOH (1N). Après 30 minutes d'incubation sous agitation, cette suspension est centrifugée à 2000xg pendant 30 min à 4°C. Les protéines dans le surnageant sont récupérées par précipitation à pH 4,5 (HCl 2N), suivie d'une centrifugation (3000xg, 30 min). Le culot est ensuite récupéré après deux lavages successifs à l'eau distillée. Les protéines obtenues sont alors lyophilisées et conservées à 4°C comme isolat de protéines de fenugrec (IPF).

### Préparation des hydrolysats des protéines de fenugrec

L'hydrolyse des protéines de fenugrec est réalisée selon la technique du pH-stat [13] qui consiste à effectuer une hydrolyse enzymatique des protéines dans un milieu non tamponné, par l'ajout continu de soude afin de maintenir le pH de la réaction constant au cours de l'hydrolyse. Ceci permet de suivre le degré d'hydrolyse (DH) en temps réel. Deux hydrolysats sont préparés moyennant deux endopeptidases :

PFHE : PF hydrolysées avec Espérase® 0.8L (*Sigma Chemical, Etats-Unis*) (pH 9 ; 50°C).

PFHP : PF hydrolysées avec Purafect® 2000E (*GenencorInternational, Etats-Unis*) (pH 10 ; 50°C).

L'IPF est d'abord solubilisé dans de l'eau distillée à raison de 50 g/L. La température et le pH de la solution sont ensuite ajustés aux valeurs optimales de chaque enzyme. Après stabilisation du pH, l'enzyme est ajoutée au mélange avec un rapport enzyme/-substrat de 5 U.mg<sup>-1</sup>. Le produit de l'hydrolyse est continuellement titré par une solution de soude (2N) pour maintenir le pH constant. Après 5 heures d'hydrolyse, la solution d'hydrolysat est chauffée à 90°C pendant 10 min afin d'inactiver l'enzyme. Après refroidissement, la solution est centrifugée à 5000xg pendant 15 min et le surnageant contenant l'hydrolysat est lyophilisé et conservé à l'abri de l'humidité.

### Calcul du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH), défini comme le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques coupées (h) et le nombre total de liaisons peptidiques de la protéine ( $h_{tot}=7,8 \text{ meq.g}^{-1}$ ), est calculé à partir de la quantité de base (NaOH) ajoutée au milieu réactionnel durant l'hydrolyse, selon la formule :

$$DH (\%) = \frac{V_B \times N_B}{mp} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

$V_B$  : volume de base (litre) ajouté.  $N_B$  : normalité de la base.  $mp$  : masse de la protéine (kg).  $\alpha$  : facteur de dissociation

des groupements  $\alpha\text{-NH}_2$  libérés durant l'hydrolyse (dans cette étude  $\alpha=1$ ).

### Electrophorèse des protéines

Une électrophorèse des échantillons, en conditions dénaturantes, est réalisée selon la technique de Laemmli [14], sur un gel de polyacrylamide, contenant du dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE), composé d'un gel de concentration à 5% et d'un gel de séparation à 20%. Après migration, les bandes protéiques sont mises en évidence par coloration au bleu de Coomassie R-250 (*Bio-Rad Laboratories, Mexique*) à 0,025% dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (15 :5 :80 ; v :v :v), puis lavage avec un mélange de méthanol/eau/acide acétique (5 :4 :1 ; v :v :v).

### Fractionnement des hydrolysats de fenugrec

Les hydrolysats des protéines de fenugrec sont fractionnés par ultrafiltration (UF) baro-membranaire frontale sur des membranes en triacétate de cellulose, aux seuils de coupure de 30, 10 et 5 kDa, successivement. Cinquante mL d'une solution d'hydrolysat (1 mg.mL<sup>-1</sup>) sont introduits dans une cellule d'ultrafiltration (*Millipore AmiconStirredCell 8050, Etats-Unis*). A la fin des ultrafiltrations, quatre fractions sont obtenues : >30, entre 10-30, entre 5-10 et <5 kDa. Les fractions sont lyophilisées, pesées et enfin testées pour leurs propriétés antioxydantes.

### Test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité anti-radicalaire des hydrolysats et des fractions fenugrec est mesurée selon la méthode décrite par Jridi *et al.* [15]. Cinq cents  $\mu\text{L}$  d'échantillon à tester (concentration finale 1 mg.mL<sup>-1</sup>) ou de butyle hydroxyanisole (BHT) sont incubés avec 375  $\mu\text{L}$  d'éthanol pur et 125  $\mu\text{L}$  d'une solution de DPPH (*Sigma Chemical, Etats-Unis*) à 0,02 mM dans l'éthanol pur. Un blanc (500  $\mu\text{L}$  d'échantillon et 500  $\mu\text{L}$  d'éthanol) est préparé pour chaque concentration. Un témoin est préparé en remplaçant l'échantillon par l'eau ultrapure. Les tubes sont incubés pendant 1h, à l'obscurité et l'absorbance est ensuite mesurée à 517 nm (spectrophotomètre Analytik Jena AG série Specord 200, Allemagne). L'activité antiradicalaire est calculée comme suit :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \left( 1 - \frac{DO_{\text{éch.}} - DO_{\text{blanc}}}{DO_{\text{témoin}}} \right) \times 100$$

### Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur (*ferricreducingantioxidant power ; FRAP*) des hydrolysats et des fractions est

déterminé selon la méthode de Oyaizu [16]. Un échantillon de 0,5 mL (concentration finale 1 mg.mL<sup>-1</sup>) est incubé avec 1,25 mL de tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 1,25 mL d'une solution de ferricyanure de potassium à 10 g.L<sup>-1</sup> (Normapur, France), pendant 30 min à 50°C. Ensuite, 1,25 mL d'acide trichloroacétique (10%) est ajouté et le tout est centrifugé 10 min à 3000xg. Un volume de 1,25 mL de surnageant est repris et mélangé avec 1,25 mL d'eau bi-distillée et 0,25 mL de FeCl<sub>3</sub> (1 g.L<sup>-1</sup>). Après une incubation de 10 min, l'absorbance est mesurée à 700 nm. La vitamine C est utilisée comme témoin positif.

### Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart type (M±ET). Après analyse de variance (Anova à un facteur), la classification des moyennes est effectuée par le test de rang multiple de LSD-Fisher.

## Résultats

### Cinétique et degré d'hydrolyse

Le suivi de l'hydrolyse de l'isolat protéique, *via* le calcul du degré d'hydrolyse, a donné deux profils différents selon l'enzyme utilisée. La cinétique d'hydrolyse (Fig. 1), avec les deux enzymes est caractérisée par une phase initiale très rapide. Cependant, cette phase initiale d'hydrolyse en présence de l'Espérase prend plus de temps pour atteindre le plateau, comparée à celle de la Purafect (60 min vs 15 min). De plus, avec un même rapport E/S, le degré d'hydrolyse obtenu avec l'Espérase (DH=19%) est largement supérieur à celui de la Purafect (DH=9%).

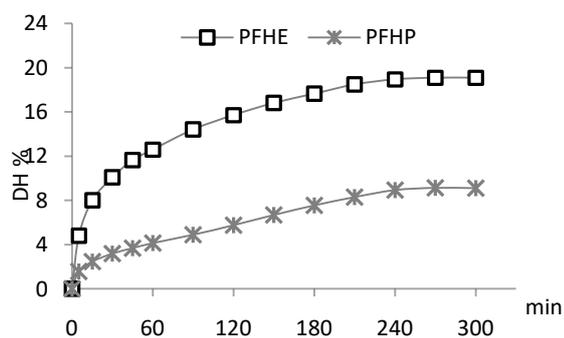


Fig. 1. Cinétique d'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase et la Purafect

$E/S=5 \text{ U.mg}^{-1} \text{ protéine}$ , [protéines]=5%.

### Profil électrophorétique de l'isolat et des hydrolysats des protéines

Le profil électrophorétique de l'isolat de protéines de

fenugrec (colonne A), analysé par une SDS-PAGE en conditions dénaturantes, se caractérise par la présence de six bandes (Fig. 2). Après hydrolyse, les bandes 1, 2, 3 et 4 ont disparu avec l'Espérase, alors qu'avec la Purafect la bande 3 subsiste, mais elle est moins dense. Par ailleurs, les bandes 5 et 6, présentes dans l'isolat protéique (A), se retrouvent également dans les hydrolysats (B et C) mais avec une plus forte densité.

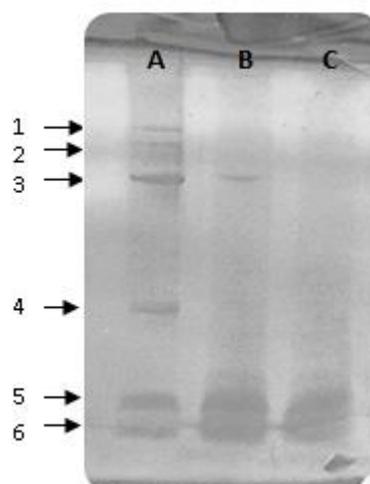


Fig. 2. Profil électrophorétique de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec

(A) IPF: isolat de protéines de fenugrec. (B) PFHP: protéines de fenugrec hydrolysées avec Purafect. (C) PFHE: protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase.

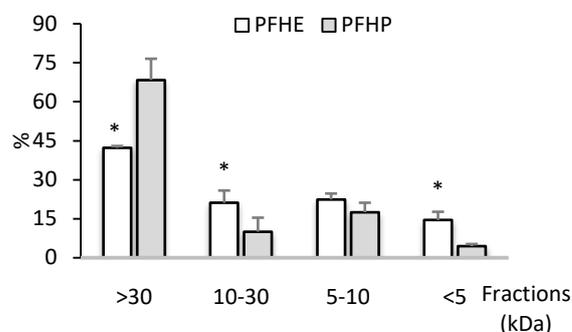


Fig.3. Distribution des protéides issus de l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase et la Purafect

PFHE : protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase.. PFHP : protéines de fenugrec hydrolysées avec Purafect. Les résultats sont exprimés sous forme de M±ET de 3 échantillons. La comparaison des moyennes entre PFHE et PFHP est réalisée par le test LSD-Fisher. \*  $P \leq 0,05$ .

Pourcentage pondéral de la fraction (%) =

$$\frac{\text{masse pondérale de la fraction}}{\text{somme des masses pondérales des fractions}}$$

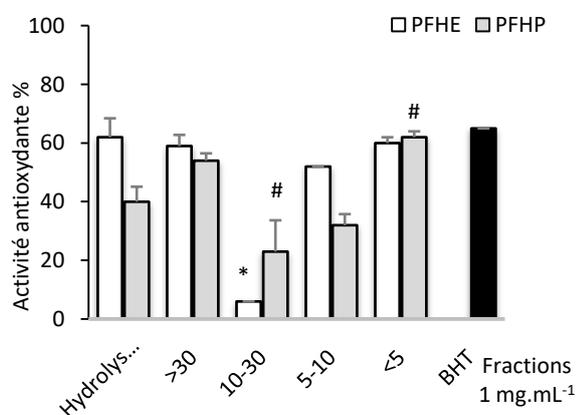
### Répartition des protéides en fonction de leur poids moléculaire

Comparées aux PFHP (DH=9%), les PFHE (DH=19%) contiennent moins de protéides de poids moléculaire

(pm) >30 kDa (68% vs 42%), et plus de protides de pm compris entre 10-30 kDa et, particulièrement, pour la fraction <5 kDa qui en contient 3,5-fois plus (**Fig. 3**).

#### Propriété de piégeage du radical DPPH

Les protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérance montrent une activité antioxydante supérieure à celle enregistrée avec les protéines hydrolysées avec la Purafect (60% vs 40%). Après fractionnement, les fractions >30, 5-10 et <5 kDa des PFHE ont une activité antioxydante (AOx) supérieure à 50% (**Fig. 4**). Cette activité est similaire à celle de leur hydrolysate et au BHT. Pour ce qui est des PFHP, c'est la fraction <5 kDa qui présente l'activité la plus intéressante et dont la valeur est 1,6-fois plus élevée, comparée à celle de son hydrolysate.



**Fig. 4. Pouvoir inhibiteur DPPH par les différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec**

Les résultats sont exprimés sous forme de  $M \pm ET$  de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD-Fisher. Les moyennes portant des signes distincts sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ). \* Fractions PFHE vs Hydrolysate PFHE. # : Fractions PFHP vs Hydrolysate PFHP.

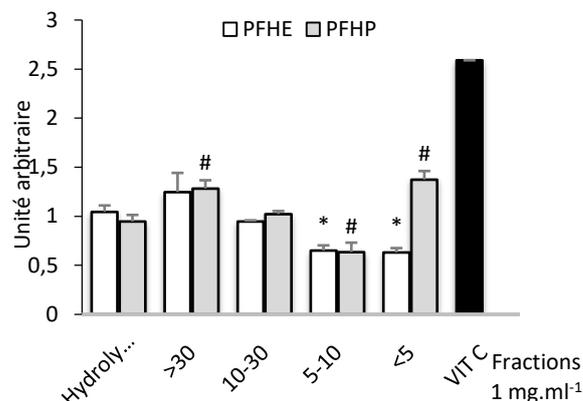
#### Pouvoir réducteur de l'ion ferrique

Aucune différence du pouvoir réducteur n'a été enregistrée entre PFHE et PFHP. Après fractionnement, ce sont les fractions >30 kDa et <5 kDa des PFHP qui montrent le pouvoir réducteur le plus important, comparées à leur hydrolysate (**Fig.5**).

## Discussion

La qualité d'un hydrolysate dépend d'un certain nombre de paramètres : l'enzyme utilisée, les conditions d'hydrolyse, la nature du substrat, le rapport enzyme/substrat et le degré d'hydrolyse. Ce dernier exprime le

nombre de liaisons peptidiques clivées par rapport aux liaisons peptidiques totales dans la protéine.



**Fig. 5. Pouvoir réducteur des différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec**

Les résultats sont exprimés sous forme de  $M \pm ET$  de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD-Fisher. Les moyennes portant des signes distincts sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ). \* Fractions PFHE vs Hydrolysate PFHE. # Fractions PFHP vs Hydrolysate PFHP.

Il renseigne également sur la taille des peptides libérés et la spécificité du catalyseur [3,10]. Dans cette étude, l'isolat de protéines de fenugrec a fait l'objet d'une hydrolyse poussée au moyen de deux enzymes, Purafect ou Espérance. Ces deux enzymes ont donné deux profils d'hydrolyse différents, même si la cinétique de l'hydrolyse a montré une phase initiale très rapide pour les deux enzymes avant d'atteindre un plateau. Cependant, cette phase a duré plus longtemps avec l'Espérance et a permis de produire un hydrolysate, avec un degré d'hydrolyse supérieur à celui de la Purafect. Ceci suggère une présence plus importante de protides de faible poids moléculaire dans les PFHE, comparées aux PFHP.

Cette différence entre les deux cinétiques d'hydrolyse pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes, notamment, la spécificité des enzymes vis-à-vis du substrat, l'épuisement des sites accessibles pour l'enzyme, la dénaturation des enzymes et/ou leur inhibition par les produits de l'hydrolyse [17]. Néanmoins, les deux courbes restent typiques aux profils d'hydrolyse des protéines de légumineuses ou celles d'autres végétaux [7,18,19].

Afin de confirmer l'étendue de l'hydrolyse des protéines, une électrophorèse de l'isolat et des hydrolysats de fenugrec, dans des conditions dénaturantes, a été réalisée. L'électrophorèse de l'IPF montre la présence de six bandes qui correspondent à des pm différents.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Hrčková *et al.* [20] et Surówka *et al.*, [21], avec les hydrolysats de protéines de soja, qui rapportent qu'une électrophorèse dans des conditions dénaturantes d'isolats de protéines de légumineuses est caractérisée par la présence de cinq bandes correspondant aux sous unités  $\alpha'$ ,  $\alpha$  et  $\beta$ - de la 7S globuline ( $\beta$ -conglycinine) et aux deux sous unités, acide et basique, de la 11S globuline (glycinine) et d'une bande de protides de faible poids moléculaire.

Lorsque l'IPF est hydrolysé avec la Purafect, la fraction  $\beta$ - de la sous-unité 7S (bande 3) n'a pas été complètement dégradée. En revanche, avec l'Espérase, toutes les fractions de la sous-unité 7S sont dégradées. Par ailleurs, la sous-unité 11 basique (bande 5) n'a pas été hydrolysée par les deux enzymes. Hrčková *et al.* [20] et Surówka *et al.* [21], rapportent que les fractions de la sous-unité 7S sont hautement sensibles à l'action des enzymes protéolytiques, alors que la sous-unité 11S basique est caractérisée par sa résistance à la protéolyse, ce qui rejoint les résultats de cette étude. De même, une large bande dense est présente au fond du gel après hydrolyse des protéines. Cette bande aurait probablement résulté de la diminution du pm des protides et leur accumulation à la base du gel. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par les travaux de Hrčková *et al.* [20] et Surówka *et al.* [21].

Le degré d'hydrolyse peut renseigner sur la taille des protides. En effet, plus les liaisons peptidiques sont coupées et plus le DH est élevé, et par conséquent la taille des protides diminue. De plus, la taille des protides représente un paramètre essentiel dans leur bioactivité [3]. Dans le but de confirmer cette relation taille-DH, un fractionnement par ultrafiltrations successives a été réalisé, afin de quantifier les proportions de peptides de petite taille. Les résultats montrent que l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec Espérase (DH=19%) produit plus de protides de petite taille et moins de protides de grande taille, comparé à la Purafect (9%). Selon Chi *et al.* [22], l'activité antioxydante des hydrolysats dépend d'un certain nombre de paramètres dont le degré d'hydrolyse, sa composition et la séquence en acides aminés de ses peptides constitutifs.

Les résultats ont montré que les PFHE possèdent une activité inhibitrice du DPPH plus importante que celle des PFHP. Ces résultats rejoignent ceux de Sbroggio *et al.* [7], qui rapportent que l'activité antioxydante dépend du degré d'hydrolyse et de la spécificité d'enzyme. En effet, l'hydrolyse pourrait faire apparaître des peptides avec de nouvelles extrémités,

portant des acides aminés antioxydants et des fonctions libres, qui diffèrent selon l'enzyme utilisée, et pouvant interagir avec les radicaux libres [23].

Dans cette étude, l'activité antioxydante des différentes fractions des hydrolysats de fenugrec a été évaluée afin d'identifier la ou les fractions les plus actives. Après fractionnement, les résultats ont montré que l'activité antioxydante varie d'une fraction à une autre. Cependant, aucune relation n'a été trouvée entre la taille et l'activité antioxydante des fractions, au moins pour les tests anti-DPPH et FRAP. En revanche, pour le même pm, l'activité antioxydante diffère selon l'enzyme utilisée. Ces observations démontrent que l'activité antioxydante ne dépend pas uniquement de la taille des protides, mais probablement d'autres critères, comme il a été rapporté par Lemes *et al.* [1]. Ces observations sont en accord avec d'autres travaux [24,25]. Mundi-&-Aluko, [25], suggèrent que l'activité antioxydante dépend plus de l'hydrophobicité des acides aminés et des peptides que de leur taille. Par ailleurs, Maestri *et al.* [26] ont montré, qu'en plus de la taille des peptides, l'activité antioxydante des hydrolysats de soja dépend également de leur composition en acides aminés et de leur position dans la séquence peptidique.

Cependant, les fractions des hydrolysats de fenugrec n'ont pas montré une différence importante de l'activité antioxydante, comparées aux hydrolysats. Il apparaît donc que le fractionnement n'améliore pas l'activité antioxydante des hydrolysats des protéines de fenugrec.

## Conclusion

Les protéines de fenugrec hydrolysées avec la Purafect et l'Espérase possèdent des propriétés antioxydantes importantes. Par ailleurs, les protéines de fenugrec hydrolysées avec l'Espérase montrent un meilleur potentiel antioxydant, comparées à celles hydrolysées avec la Purafect, probablement, en raison du degré d'hydrolyse élevé et/ou de la nature des peptides libérés par cette enzyme. En revanche, l'activité antioxydante des hydrolysats n'est pas améliorée après leur fractionnement.

## Conflits d'intérêt

Aucun conflit d'intérêt.

## Références

1. Lemes AC., Sala L., Ores JC., Braga ARC., Egea MB., Fernandes KF. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *Int J Mol Sci* 2016;17:950-73.
2. Yust MdM., Millán-Linares MdC., Alcaide-Hidalgo JM., Millán F., Pedroche J. Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *J Sci Food Agric* 2012;92:1994-2001.
3. Nasri M. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. In: Toldrá F, editor. *Advances in Food and Nutrition Research*: Academic Press; 2017, 109-59.
4. Gao C., Sun R., Xie YR., Jiang AL., Lin M., Li M., et al. The soy-derived peptide Vglycin inhibits the growth of colon cancer cells in vitro and in vivo. *Exp Biol Med* 2017;242:1034-43.
5. Ruiz-Ruiz JC., Betancur-Ancona DA., Segura-Campos MR. Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutr Hosp* 2014;29:776-84.
6. Setti K., Kachouri F., Hamdi M. Improvement of the antioxidant activity of fenugreek protein isolates by *Lactococcus lactis* Fermentation. *Int J Pept Res Ther* 2017;24:499-509.
7. Sbroggio MF., Montilha MS., de Figueiredo VRG., Georgetti SR., Kurozawa LE. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Sci Technol* 2016;36:375-81.
8. Abu-Salem FM., Mahmoud MH., El-Kalyoubi MH., Gibriel AY., Abou-Arab AA. Characterization of antioxidant peptides of soybean protein hydrolysate. *Int J Biol Vet Agric Food Eng* 2013;7:238-42.
9. Amza T., Balla A., Tounkara F., Man L., Zhou HM. Effect of hydrolysis time on Neutral, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. *Int Food Res J* 2013;20:2081-90.
10. Nwachukwu ID., Aluko ER. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *J Food Biochem* 2019;43: e12761.
11. Zou TB., He TP., Li H-B., Tang HW., Xia EQ. The structure-activity relationship of the antioxidant-peptides from natural proteins. *Mol* 2016;21:72-85.
12. Boye JI., Aksay S., Roufik S., Ribéreau S., Mondor M., Farnworth E., Rajamohamed SH.. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultra-filtration and isoelectric precipitation techniques. *Food Res Int* 2010;43:537-46.
13. Adler-Nissen J. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *J Chem Tech Biotechnol* 1982;32:138-56.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat* 1970;227:680-5.
15. Jridi M., Lassoued I., Nasri R., Ayadi MA., Nasri M., Souissi N. Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by different microbial proteases. *Bio Med Res Int* 2014; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/461728>.
16. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 1986;44:307-15.
17. Guerard F., Guimas L., Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B-Enzym* 2002;19: 489-98.
18. León-Espinosa EB., Sánchez-Chino X., Garduño-Siciliano L., Álvarez-González RI., Dávila-Ortiz G., Madrigal-Bujaidar E., et al. Hypocholesterolemic and anticarcinogenic effect of *Vicia faba* protein hydrolysates. *Nutr Cancer* 2016;68:856-64.
19. Zhao Q., Xiong H., Selomulya C., Chen XD., Zhong H., Wang S., et al. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chem* 2012;134:1360-7.
20. Hřčková M., Rusňáková M., Zemanovič J. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech J Food Sci* 2002:7-14.
21. Surówka K., Źmudziński D., Surówka J. Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends Food Sci Technol* 2004; 15:153-60.
22. Chi CF., Hu FY., Wang B., Li ZR., Luo HY. Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Mar Drugs* 2015;13:2580-601.

23. Das R., Bhattacharjee C. *In vitro* evaluation of antioxidant activity and radical scavenging activity of sesame bioactive peptides. *Int J Emerg Technol Adv Eng* 2013;3:521-7.
24. He R., Girgih AT., Malomo SA., Ju X., Aluko RE. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *J Funct Foods* 2013;5:219-27.
25. Mundi S., Aluko RE. Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fractions against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. *Austin J Nutr Food Sci* 2014;2:1008-18.
26. Maestri E., Pavlicevic M., Montorsi M., Marmioli N. Meta-analysis for correlating structure of bioactive peptides in foods of animal origin with regard to effect and stability. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2018;18:3-30.