

Mise au point d'un procédé d'extraction et de caractérisation de l'activité de la collagénase de crabe des neiges pour un accès à de nouveaux marchés

Marie-Gil Fortin, M. Sc., chercheuse industrielle, Merinov

N° de projet : IA117742

Durée : 2017/04–2018/12

FAITS SAILLANTS

- Différents procédés d'extraction de collagénase à partir d'hépatopancréas de crabe des neiges ont été mis à l'essai à l'échelle semi-pilote et à l'échelle laboratoire.
-
- L'hépatopancréas de crabe des neiges contient un fort taux de lipides, qui forment une émulsion assez stable avec les fractions protéiques. Il est difficile de séparer les fractions lipidiques et protéiques.
-
- Une méthode de suivi efficace de l'activité collagénolytique de la collagénase a été mise au point et permet de suivre efficacement la collagénase lors des procédés d'extraction.
-
- Les procédés de microfiltration, de filtration tangentielle et d'extraction biphasique, avec une phase aqueuse et du polyéthylène glycol, testés au cours du projet ne permettent pas de séparer efficacement les phases lipidiques et protéiques de l'hépatopancréas.
-
- Un procédé d'extraction par précipitation au sulfate d'ammonium en deux étapes permet d'obtenir une fraction riche en collagénase et faible en lipides. Ce procédé implique cependant des pertes importantes en collagénase lors de la première étape de précipitation.
-
- L'activité des extraits de collagénase de crabe des neiges est indépendante des ions métalliques (calcium, magnésium), ce qui la distingue des collagénases bactériennes commerciales.
-
- Les extraits de collagénase de crabe des neiges ne se distinguent pas des collagénases commerciales quant à leur activité totale ou à leur activité en fonction de la température.
- Des essais de cicatrisation n'ont pas permis de mettre en évidence des propriétés différentes de la collagénase de crabe des neiges par rapport aux collagénases commerciales.
-
- Des applications permettant d'utiliser des extraits de collagénase avec lipides seraient à privilégier.

OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

L'objectif général du projet était de caractériser l'activité de la collagénase d'hépatopancréas de crabe des neiges dans une optique de diversification des marchés. Les objectifs spécifiques étaient de développer un procédé d'extraction à l'échelle semi-pilote et de caractériser l'extrait pour cibler les marchés les plus prometteurs. Des méthodes de suivi de l'activité protéolytique (trypsique et collagénolytique) par spectrophotométrie ont été développées. Des essais d'extraction de collagénase par microfiltration et déstabilisation de l'émulsion, par filtration

tangentielle, par extraction biphasique liquide-liquide, par coagulation et floculation et par précipitation ont été testés. L'activité des extraits de collagénase de crabe des neiges a été comparée à celle de collagénase commerciale. L'activité totale et spécifique et l'activité selon la température ont été évaluées. Des essais de cicatrisation ont été effectués, en évaluant d'abord les concentrations qui induisaient une toxicité puis la capacité à induire une fermeture de plaies.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS POUR L'INDUSTRIE

Procédés d'extraction de la collagénase

Des méthodes de suivi enzymatique de la collagénase ont été développées, permettant de suivre la collagénase lors des procédés d'extraction et pouvant être utilisées comme contrôle de qualité en entreprise. Différents procédés d'extraction ont été évalués pour extraire et concentrer la collagénase à partir d'hépatopancréas de crabe des neiges. L'hépatopancréas contient une forte proportion de lipides. Ces lipides forment une émulsion assez stable avec les fractions protéiques contenant la collagénase. Des procédés de fractionnement par filtration tangentielle, d'extractions biphasiques liquide-liquide et de déstabilisation de l'émulsion par ajustement de température et de pH n'ont pas permis de séparer efficacement la collagénase des lipides présents dans l'hépatopancréas au départ. Des essais de floculation et de coagulation et de précipitation ont permis de concentrer la collagénase dans une fraction aqueuse. Un procédé de précipitation au sulfate d'ammonium a été retenu.

Ce procédé comporte une première étape de précipitation, qui élimine la majorité des lipides présents dans l'extrait et une partie des protéines autres que la collagénase. Cette première étape implique néanmoins une perte significative de collagénase. La deuxième étape de précipitation permet ensuite de produire une fraction riche en collagénase et contenant peu de lipides. Ce procédé a été développé à l'échelle laboratoire. Il n'a pas été possible de le mettre à l'échelle semi-pilote au cours du projet actuel. Néanmoins, les extraits produits ont pu être utilisés pour caractériser leur activité afin d'explorer les marchés potentiels.

Caractérisation de l'activité de la collagénase de crabe des neiges

L'activité de la collagénase de crabe des neiges a été comparée à celle des collagénases commerciales. Les extraits de collagénase de crabe des neiges ne se distinguent pas des collagénases commerciales quant à leur activité totale ou à leur capacité à demeurer active à basse température. Elles se distinguent cependant des collagénases commerciales par leur capacité à demeurer active en absence d'ions métalliques. Elles pourraient donc être utilisées pour des applications où la présence d'ions n'est pas possible ou pas souhaitable. L'activité des collagénases a été évaluée sur des cellules de la peau pour explorer la possibilité de les utiliser pour des applications dermatologiques. À forte dose, les collagénases peuvent induire une toxicité cellulaire; cet aspect a donc été évalué. La collagénase de crabe des neiges ne peut pas être utilisée à plus forte dose que les collagénases présentes actuellement sur les marchés. Des essais de cicatrisation des plaies n'ont pas permis de démontrer une activité intéressante pour la collagénase de crabe des neiges ou pour les collagénases commerciales.

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET/OU SUIVI À DONNER

La difficulté de séparer les lipides des protéines implique une perte importante de collagénase. Des applications de haute valeur ajoutée devraient donc être visées pour une commercialisation viable de collagénase de crabe des neiges avec un haut degré de pureté. Les propriétés étudiées lors du projet actuel n'ont pas permis de mettre en évidence des particularités de la collagénase de crabe des neiges lui permettant de se démarquer des produits actuellement sur le marché. Afin de pouvoir percer des marchés de niche comme le marché dermatologique de la

débridation de plaies après une blessure, des études démontrant une efficacité supérieure de la collagénase de crabes des neiges devraient être effectuées.

Certains marchés ne nécessitent cependant pas une haute pureté de la collagénase. Des applications dans le domaine de l'alimentation animale pourraient par exemple être explorées. Les propriétés de la collagénase d'hydrolyser les protéines pourraient être mises à profit dans des applications pour améliorer la digestibilité des aliments et améliorer l'efficacité de l'absorption par les animaux des rations qu'ils consomment. La présence de lipides dans un tel extrait pourrait avoir une valeur alimentaire ajoutée. Un dernier test de bioactivité sera effectué par un partenaire scientifique de ce projet pour explorer les possibilités d'utilisation en alimentation animale.

POINT DE CONTACT POUR INFORMATION

Nom de la responsable du projet : Marie-Gil Fortin
Tél. : 418 368-6371, poste 1665
Courriel : marie-gil.fortin@merinov.ca

REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada.