



**HAL**  
open science

# Etude d'un procédé en vue de valoriser une protéine végétale à haute valeur technologique à partir des jus végétaux

Maria Angelica Usta

## ► To cite this version:

Maria Angelica Usta. Etude d'un procédé en vue de valoriser une protéine végétale à haute valeur technologique à partir des jus végétaux. Génie des procédés. INSA de Toulouse, 2018. Français. NNT : 2018ISAT0041 . tel-04416363

**HAL Id: tel-04416363**

**<https://theses.hal.science/tel-04416363>**

Submitted on 25 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de  
Toulouse

---

Présentée et soutenue par

**Maria USTA**

Le 11 décembre 2018

**Étude d'un procédé en vue de valoriser une protéine végétale à  
haute valeur technologique à partir des jus végétaux.**

---

Ecole doctorale : **MEGEP - Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés**

Spécialité : **Génie des Procédés et de l'Environnement**

Unité de recherche :

**LISBP - Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés**

Thèse dirigée par

**Maria Aurora FERNANDEZ et Stephane MATHE**

Jury

**Mme Laurence MUHR, Rapporteur**

**M. Philippe MICHAUD, Rapporteur**

**Mme Maria-Inés Ré, Examinatrice**

**M. Thierry VERONESE, Examineur**

**Mme Maria Aurora FERNANDEZ, Directrice de thèse**

**M. Stéphane MATHÉ, Co-directeur de thèse**



# Remerciements

Ce travail réalisé dans le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP), au sein de l'équipe de recherche Séparation Oxydation et Procédés Hybrides de l'Environnement, s'insère dans le cadre du projet RUBIS. Mes premiers remerciements vont aux partenaires du projet pour m'avoir choisie pour la réalisation de cette thèse, mais aussi pour leur collaboration tout au long de ces années. Ce projet a eu lieu grâce au cofinancement de la Région Occitanie, je les remercie donc d'avoir permis que ce travail prenne vie, puis de l'avoir suivi au cours de sa réalisation.

Je tiens absolument à remercier mes directeurs de thèse Maria Aurora Fernandez et Stéphane Mathé. Stéphane je te remercie sincèrement pour ton encadrement, ton inconditionnalité et tes conseils très opportuns et précieux. Ton implication altruiste et généreuse a représenté un fort ciment pour la réalisation de ce travail. Maria, mes remerciements ne seront jamais suffisants pour exprimer tout ce que tu as fait pour moi pendant toutes ces années de thèse. Tu m'as accordé ta confiance et tu as toujours su m'accompagner et m'encourager pour que tout se passe de la meilleure manière. Tu représentes plus qu'une directrice de thèse pour moi et ça a été un privilège de te rencontrer tant sur le plan professionnel que personnel. Je ne souhaite que continuer à travailler avec vous deux.

Je voudrais exprimer ma gratitude aux membres du jury. Tout d'abord Mme Laurance Muhr et M. Philippe Michaud qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit. Je vous remercie pour l'échange que nous avons eu, l'intérêt que vous avez témoigné à l'égard de ce travail, ainsi que pour vos commentaires avisés. De même, je remercie Maria Inés Ré et Thierry Véronèse pour avoir examiné mon travail et pour la qualité de leurs remarques mais aussi pour toutes les discussions très enrichissantes que nous avons eues.

Je souhaite remercier Stéphane Ballas de m'avoir partagé ses connaissances dans le milieu agricole, sa disponibilité et sa bonne humeur durant toutes ces années. Je remercie également Stéphanie Laborie et Chrystelle Guigui pour leur collaboration et l'encadrement dans le domaine des séparations membranaires. Stéphanie je te remercie énormément pour avoir partagé avec moi tes connaissances ainsi que pour tes apports et corrections qui m'ont été très utiles.

Je voudrais remercier toutes les personnes de l'équipe technique de l'EAD10 grâce à qui ce travail a pu être matérialisé. Je remercie tout particulièrement Manon Montaner avec qui j'ai eu la chance de travailler au jour le jour, notamment pour la construction du pilote; Manon tu m'as appris énormément de choses et c'était un grand plaisir de travailler à tes côtés. À Bernard Reboul qui nous a énormément aidé lors de la production des jus végétaux et qui s'est montré disponible et bienveillant. Je remercie également Colette Krasicki d'avoir toujours été là pour me donner plus qu'un coup de main et qui a su me soulager d'une partie de la charge de travail à plusieurs reprises. Je remercie également Aurore Didi qui m'a grandement aidé pour les expériences de la dernière ligne droite, et pour avoir été si attentionnée envers moi. Mes remerciements sont aussi adressés au personnel technique des équipes EAD7 et EAD9 :

Nathalie, José, Claude, Manzur et Simon qui m'ont assistée au fil des ans dans des domaines divers et variés (expériences, formations). Je tiens à remercier mes deux stagiaires Mathilde et Adrian pour leur importante contribution et participation aux expériences.

De façon plus générale, j'aimerais remercier l'ensemble des enseignants-chercheurs du Hall-GPE : Jean-Stéphane, Dominique, Aras, Ligia, Pascal, Jérôme, Alain, Gilles, Corine, Mickael pour les échanges, les discussions et leur bonne humeur.

Je remercie chaleureusement mes collègues de bureau Noémie, Nga et Paul pour tous les moments vécus, les conseils, la bonne ambiance, la patience, les fous rires et de temps en temps quelques larmes, j'ai été très heureuse de passer ces années avec vous. Naïla, on a partagé le bureau du début à la fin, je voulais te remercier spécialement pour ton inconditionnalité et pour toutes les occasions où je t'ai sollicitée, tu as toujours été disponible pour m'écouter et me donner un bon conseil.

Merci également à Marine, ma collègue de « direction de thèse » pour ton aide et ta patience extrême lors de nombreuses occasions où tu devais ajuster ton planning à mes besoins, ainsi que pour toutes les petites attentions. Merci aux autres doctorants et post-doctorants avec qui j'ai pu sympathiser et passer des moments agréables au labo ou en dehors : Claire, Mathias, Allan, Ana, David, Max, Elsa, Daniel, Flavie, Mathilde, Qiuming, Dylan, Vincent...

À ma petite famille toulousaine (Marce, Angela, Mariana, Hilary M., Arnulfo, JuanPa, Anita, Pipe, Cami, Ivan, Ramiro, Daniel, Leito) je vous remercie de tout mon cœur, la solidité et l'affection des liens qui existent entre nous ont fait que je puisse sentir que cette chaleur colombienne est toujours là.

Un grand merci à Tia Cé et à Hilary S., les premières nounous de Tiago : plusieurs pages de ce manuscrit ont été produites grâce au temps que vous avez consacré *al chiquitín*.

À ma chère maman et à mon frère aimé j'ai juste à vous dire que grâce à vous je suis qui je suis. Malgré la distance qui nous sépare, votre soutien et votre réconfort seront toujours indispensables dans ma vie. Brigitte et Serge, désormais vous êtes devenus partie de ma famille, je ne pourrai jamais vous remercier suffisamment pour l'inestimable aide et les encouragements que vous m'avez apportés aux moments où j'en avais le plus besoin.

Je ne pourrai finir ces remerciements sans citer la personne qui, depuis trois ans, partage mon cœur et grâce à qui ma vie est de plus en plus heureuse. Rémi, tu m'as soutenue pendant les moments les plus difficiles et tu t'es donné tout entier pour que cette thèse puisse se faire de la meilleure façon possible. Ta présence dans ma vie fait de moi une personne meilleure et j'espère que Tiago aura la chance d'hériter de toutes tes qualités.

*A ti Tiago, te agradezco por haberme escogido como tu mamá, por haber sido el bebé más maravilloso en esos momentos tan difíciles y por haber tenido la paciencia de esperarme para que compartiéramos juntos lo que hoy estamos viviendo. Te dedico este trabajo y mi vida entera.*

# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I État de l'art</b>	<b>5</b>
1 La protéine Rubisco . . . . .	5
1.1 Présentation de la Rubisco . . . . .	5
1.2 Structure et propriétés physico-chimiques de la Rubisco . . . . .	9
1.3 Principales propriétés . . . . .	11
1.3.1 Propriétés physico-chimiques . . . . .	11
1.3.2 Propriétés fonctionnelles . . . . .	13
1.4 Procédés industriels pour la purification de la Rubisco à partir d'extraits de plantes . . . . .	15
2 Historique des procédés . . . . .	17
2.1 Premiers procédés : obtention de concentrés de protéines solubles d'origine végétale . . . . .	18
2.2 Cristallisation comme technique de purification, préparation d'une fraction protéique, Fraction I . . . . .	21
2.3 Production de concentrats de protéines foliaires à partir de la technique précipitation/coagulation et de l'ultrafiltration . . . . .	22
2.4 Procédés de purification par chromatographie d'exclusion stérique SEC . . . . .	23
2.5 Purification de la Rubisco par chromatographie d'échange d'ions . . . . .	25
2.6 Dernières études : propositions à l'échelle industrielle . . . . .	29
2.6.1 Procédé VIRIDIS (LEVESQUE et RAMBOURG 2002) . . . . .	29
2.6.2 Procédé NIZO (VAN DE VELDE et al. 2011b) . . . . .	30
2.6.3 Procédé VALAGRO (PICCIRILLI 2012) . . . . .	32
2.6.4 Procédé TNO (DE JONG et al. 2015) . . . . .	35
3 Conclusion du chapitre . . . . .	41
<b>II Matières premières et caractérisation des jus végétaux</b>	<b>43</b>
1 Introduction . . . . .	43
2 Matières premières . . . . .	44
2.1 La luzerne, matière première de référence . . . . .	45
2.2 Autres sources végétales . . . . .	48
2.3 Évolution de la teneur en Rubisco lors du cycle végétal . . . . .	48
2.4 Prétraitement de la plante . . . . .	50
3 Production des jus végétaux . . . . .	51

3.1	Technologies de production des jus végétaux . . . . .	52
3.1.1	Extrusion bi-vis . . . . .	52
3.1.2	Presse à vis . . . . .	52
3.2	Principaux facteurs externes au procédé . . . . .	55
3.2.1	Date de la récolte (conditions météorologiques précédant la récolte)	55
3.2.2	Matière sèche de la plante . . . . .	55
3.2.3	Stade de développement de la plante . . . . .	55
3.2.4	Ratio feuille/tiges . . . . .	56
3.3	Conditions opératoires utilisées . . . . .	56
3.3.1	Lots de matières premières traités . . . . .	56
3.3.2	Protocoles expérimentaux . . . . .	56
3.3.2.i	Extrudeuse bi-vis . . . . .	56
3.3.2.ii	Presse à vis . . . . .	58
3.3.2.iii	Synthèse des conditions opératoires . . . . .	58
3.3.3	Résultats et discussion . . . . .	58
3.3.3.i	Influence des facteurs externes . . . . .	60
3.3.3.ii	Influence du prétraitement de la plante et des conditions opératoires . . . . .	61
3.3.4	Conclusion . . . . .	61
4	Dosage de la Rubisco . . . . .	62
4.1	Introduction . . . . .	62
4.2	Purification de Rubisco par Chromatographie préparative d'exclusion de taille . . . . .	65
4.2.1	Matériel et méthodes . . . . .	66
4.2.2	Résultats et discussion . . . . .	66
4.3	Dosage de la Rubisco par HPLC-SEC . . . . .	67
4.3.1	Matériel et méthodes . . . . .	69
4.3.2	Analyse qualitative. Détermination du volume d'élution de la Rubisco	70
4.3.2.i	Analyse d'échantillons commerciaux de Rubisco d'épinards	70
4.3.2.ii	Analyse des fractions obtenues par traitement SEC d'un jus de luzerne reconstitué . . . . .	72
4.3.3	Analyse quantitative. Courbe de calibration de la Rubisco . . . . .	75
4.3.4	Validation des techniques analytiques mises au point . . . . .	76
4.3.4.i	Détermination de la teneur en Matière sèche . . . . .	76
4.3.4.ii	Détermination de l'azote total par la méthode de Kjeldahl	77
4.3.4.iii	Comparaison des résultats des différentes méthodes . . . . .	78
4.4	Dosage de la Rubisco par BLI . . . . .	78
4.4.1	Introduction . . . . .	78
4.4.2	Publication . . . . .	79
4.4.2.i	Introduction . . . . .	80
4.4.2.ii	Materials and methods . . . . .	81
4.4.2.iii	Results and discussion . . . . .	83
4.4.2.iv	Conclusions and perspectives . . . . .	87
4.4.3	Synthèse des résultats et discussion . . . . .	87

4.5	Conclusion . . . . .	88
5	Caractérisation et conservation des jus végétaux . . . . .	89
5.1	Introduction . . . . .	89
5.2	Caractérisation physico-chimique des jus . . . . .	90
5.2.1	Paramètres physico-chimiques globaux . . . . .	90
5.2.1.i	pH, conductivité . . . . .	90
5.2.1.ii	Matière en suspension et matière sèche (MS%) . . . . .	90
5.2.1.iii	Teneur en protéine par la méthode de Kjeldahl . . . . .	90
5.2.1.iv	Polyphénols . . . . .	91
5.2.2	Teneur en Rubisco et détermination de son caractère ionique . . . . .	91
5.2.3	Résultats et discussion . . . . .	92
5.2.3.i	Lot de gousses de haricots verts . . . . .	93
5.2.3.ii	Lot de sorgho fourrager . . . . .	93
5.2.3.iii	Lot de ray-grass . . . . .	93
5.2.3.iv	Lot de trèfle violet . . . . .	95
5.2.3.v	Lot Luzerne_3 . . . . .	95
5.2.4	Préconisations sur le choix de matières premières végétales . . . . .	97
5.3	Conservation des jus . . . . .	97
5.3.1	Paramètres influençant la stabilité de la Rubisco dans les jus . . . . .	98
5.3.1.i	Température de production et de conservation des jus . . . . .	98
5.3.1.ii	pH . . . . .	99
5.3.1.iii	Utilisation d'additifs (inhibiteurs de protéases, agents réducteurs) . . . . .	104
5.3.2	Conservation des jus par congélation . . . . .	104
5.3.3	Séchage par atomisation . . . . .	108
5.4	Conclusion . . . . .	112
6	Conclusion du chapitre . . . . .	113

### **III Procédé de purification de la Rubisco 115**

1	Introduction . . . . .	115
2	Extraction de la Rubisco à partir des jus végétaux clarifiés par CEI . . . . .	117
2.1	Principe . . . . .	117
2.1.1	Les résines d'échange d'ions . . . . .	117
2.1.2	Mise en œuvre du procédé . . . . .	119
2.1.3	Démarche expérimentale . . . . .	120
2.1.3.i	La sélection de la résine . . . . .	120
2.1.3.ii	Le changement d'échelle . . . . .	122
2.2	Étude des différentes résines pour la rétention de la Rubisco à partir de jus végétaux . . . . .	122
2.2.1	Sélection de la résine . . . . .	122
2.2.2	Résines présélectionnées . . . . .	123
2.2.3	Étude préliminaire en mode batch pour la sélection de la résine . . . . .	124
2.2.3.i	Matériel et méthodes . . . . .	124
2.2.3.ii	Résultats et discussion . . . . .	127
2.2.4	Expériences en colonne en lit fixe . . . . .	130



2.2.4.i	Matériel et méthodes . . . . .	130
2.2.4.ii	Résultats et discussion . . . . .	132
2.2.5	Présentation de la résine retenue . . . . .	136
2.3	Expériences de changement d'échelle . . . . .	137
2.3.1	Échelle Pilote . . . . .	139
2.3.1.i	HEPT et facteur d'asymétrie . . . . .	140
2.3.1.ii	Distribution de temps de séjour . . . . .	143
2.3.2	Conditions opératoires des expériences de changement d'échelle . . . . .	145
2.3.3	Résultats et discussion . . . . .	147
2.4	Conclusions . . . . .	157
3	Purification et conditionnement . . . . .	159
3.1	Introduction . . . . .	159
3.2	Objectif . . . . .	160
3.3	Principe . . . . .	161
3.3.1	Procédés de séparation membranaire . . . . .	161
3.3.2	Grandeurs caractéristiques . . . . .	161
3.3.2.i	Pression Trans-Membranaire . . . . .	162
3.3.2.ii	Densité de flux (J) . . . . .	162
3.3.2.iii	Perméabilité hydraulique (Lp) et résistance hydraulique (Rh) . . . . .	162
3.3.2.iv	Sélectivité : taux de rejet ou de rétention (TR) et taux de perte (TP%) . . . . .	163
3.3.2.v	Phénomènes limitants en ultrafiltration . . . . .	164
3.3.3	Modes de filtration . . . . .	166
3.3.3.i	Mode de fonctionnement frontal . . . . .	166
3.3.3.ii	Mode de fonctionnement tangentiel . . . . .	166
3.3.4	Mode de configuration Diafiltration (DF) . . . . .	167
3.4	Démarche expérimentale . . . . .	167
3.5	Présélection des membranes . . . . .	168
3.6	Expériences d'ultrafiltration/diafiltration à échelle laboratoire . . . . .	169
3.6.1	Matériels et méthodes . . . . .	170
3.6.1.i	Dispositif expérimental : Description et aspects génériques . . . . .	170
3.6.1.ii	Caractérisation de la membrane : détermination expérimentale de la perméabilité à l'eau pure . . . . .	171
3.6.1.iii	Détermination de la densité de flux (J) et de la perméabilité (Lp) pour des solutions de Rubisco à PTM constante . . . . .	173
3.6.2	Résultats et discussion . . . . .	175
3.6.2.i	Caractérisation des membranes : Détermination de la perméabilité à l'eau pure . . . . .	175
3.6.2.ii	Résultats de diafiltration de la Rubisco en mode frontal . . . . .	176
3.7	Conclusion . . . . .	186
	<b>Conclusion et perspectives</b> . . . . .	<b>189</b>
	<b>Bibliographie</b> . . . . .	<b>193</b>

# Table des figures

1	Schéma de la filière de production de Rubisco étudiée dans le cadre de cette thèse.	2
I.1	Structure de la Rubisco (BHAT et al. 2017)	10
I.2	Feuille de route de l'usine pilote du procédé « Pro-Xan process » (SPENCER et al. 1971)	19
I.3	Diagramme de flux du procédé « Pro-Xan II process » (EDWARDS et al. 1975)	20
I.4	Diagramme du procédé de purification de la Rubisco par 3 techniques différentes (SUAREZ et al. 2011)	27
I.5	Schéma du procédé industriel de production de Rubisco à partir de jus de luzerne, élaboré à partir du brevet de LEVESQUE et RAMBOURG (2002)	31
I.6	Schéma du procédé de production d'un isolat de Rubisco à partir de feuilles d'épinards basé sur le brevet de VAN DE VELDE et al. (2011b)	33
I.7	Schéma du procédé d'obtention d'un extrait protéique de luzerne et d'autres coproduits basé sur le brevet PICCIRILLI (2012)	34
I.8	Schéma du procédé de production de la Rubisco à partir de feuilles de betterave basé sur le brevet de DE JONG et al. (2015)	36
I.9	Profils chromatographiques des 3 fractions après élution de la résine durant la phase d'adsorption hydrophobe. (A) Fraction 4 avec un pic de Rubisco à 12,5 ml. (B) Fraction 9 contenant des polyphénols peu retenus par la résine. (C) Fraction 25 contenant les polyphénols les plus retenus par la résine et d'autres composés de plus petite taille. Source : DE JONG et al. (2015)	39
I.10	Profils chromatographiques des deux jus végétaux obtenus par chromatographie d'exclusion (Superdex 200). (A) Jus obtenu à la sortie de l'homogénéisateur à vis. (B) Jus obtenu à la sortie de l'unité de microfiltration. Pic de Rubisco élué à 12,5 ml. Source : DE JONG et al. (2015)	40
II.1	Schéma du procédé de déshydratation de la luzerne. Source <a href="http://www.desialis.com">www.desialis.com</a>	47
II.2	Dessin de la presse	53
II.3	Schéma de la presse avec ses différents composants	54
II.4	Influence de la taille de l'échantillon sur la chromatographie préparative (a) Echantillon de petite taille (chromatographie analytique) (b) Taille d'échantillon optimisée par rapport à la capacité maximale (c) Taille d'échantillon trop importante. (JANSON 2012)	65

II.5	Suivi de l'absorbance en fonction du volume d'éluant pour la séparation de la Rubisco contenue dans des jus atomisés et reconstitués par SEC dans une colonne HiPrep™16/60 Sephacryl®S-300. (A) Volume d'échantillon alimenté 5 mL. (B) Volume d'échantillons alimenté 10 mL . . . . .	67
II.6	Chromatogramme obtenu par analyse HPLC-SEC du standard commercial de Rubisco d'épinard partiellement purifiée (Sigma-Aldrich). F1 est la fraction ayant un MW près de 570 kDa et la fraction de F2 de MW entre 60 et 6 kDa (KERFAI et al. 2011b) . . . . .	68
II.7	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des 2 standards commerciaux de Rubisco d'épinard. La zone délimitée par les lignes verticales pointillées correspond à la zone de masses molaires utilisables dans l'équation II.1 . . . .	71
II.8	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des 2 premiers pics séparés par SEC, ainsi que du jus de luzerne alimenté (dilué 5 fois) . . . . .	72
II.9	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC avec détection à 280 et 340 nm de la fraction SEC éluée à 62 mL (considérée être de la Rubisco purifiée) et du même jus reconstitué (dilué 5 fois) . . . . .	73
II.10	Analyse par SDS-PAGE 15% des fractions du jus de luzerne séparées lors du traitement par SEC d'un jus de luzerne atomisé et reconstitué. Ligne 1 : marqueurs MW ; lignes 2 : échantillons de Rubisco d'épinards commerciale (Sigma-Aldrich) ; lignes 3 : fraction SEC éluée à 62 mL ; lignes 4 : fraction SEC éluée à 45 mL. GSR : grande sous-unité de la Rubisco, PSR : petite sous-unité de la Rubisco . . . . .	74
II.11	Droite d'étalonnage pour l'analyse de la concentration de Rubisco en solution par HPLC-SEC à partir des surfaces de pics élués à 9,03 mL . . . . .	76
II.12	Global presentation of biolayer interferometry technique. Adapted from fortebio.com and from DAYNE (2012) . . . . .	81
II.13	Signals for buffer solutions (4 curves)(A). Signals for standard solutions of 1 g/L in Pall PBS buffer pH 7.4 (B), in PBS 1 pH 7.44 (C), in PBS 2 pH 6.8 (D), and in PBS 3 pH 6.2 (E). All the results for standard of 1 g/L include 4 curves for 4 replicates . . . . .	85
II.14	Calibration curve for buffer solution PBS 1. Each concentration has been triplicated . . . . .	86
II.15	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC de différents lots de jus produits après centrifugation. Le jus du lot Luzerne_3 a été dilué deux fois avant analyse, les jus provenant des autres plantes sont analysés sans dilution . . . . .	94
II.16	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des jus produits à partir des différents lots de luzerne et après centrifugation. Les différents jus ont été dilués deux fois avant analyse HPLC-SEC . . . . .	96
II.17	Photographies des jus produits lors de la réalisation de ce travail. . . . .	98
II.18	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus du lot Luzerne_1 stocké à 4°C pendant 8 jours. . . . .	100
II.19	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus produit à partir du lot Luzerne_5 après sa production (Jus départ), puis après ajustement du pH à 7 et stockage à 4°C pendant 7 jours. . . . .	102

II.20	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus produit à partir du lot Luzerne_5 après sa production (jus départ), puis après ajustement du pH à 8 et stockage à 4°C pendant 7 jours. . . . .	103
II.21	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus du lot Luzerne_1 frais (au moment de la production) et après décongélation selon les trois protocoles. . . . .	106
II.22	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus du lot Luzerne_1 frais (au moment de la production), décongelé en four micro-ondes et conservé à 4°C durant 4 jours. (AD : Après décongélation) . . . . .	107
II.23	Perte de Rubisco monomère dans des jus produits avec le lot Luzerne_1 conservés à 4°C, sans congélation (●), et après congélation/décongélation (▲). . . . .	108
II.24	Comparaison des chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC à partir du jus frais et du jus atomisé et reconstitué, produits avec le lot Luzerne_5 . . . . .	111
II.25	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC avec détection à 280 nm et 340 nm du jus frais (dilué 8 fois) et du jus atomisé et reconstitué (dilué 8 fois) produits à partir du lot Luzerne_7 . . . . .	112
III.1	Schémas de développement d'un procédé de chromatographie préparative (RATHORE et VELAYUDHAN 2003). . . . .	121
III.2	Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des fractions d'élution obtenues avec les résines présélectionnées. . . . .	129
III.3	Schéma de l'équipement utilisé pour l'étude de la récupération de la Rubisco par chromatographie d'échange d'ions en lit fixe à l'échelle laboratoire. . . . .	131
III.4	Courbes de percées de la Rubisco déterminées expérimentalement dans des colonnes à l'échelle laboratoire avec les résines HyperCel Star AX (HCelAX), Capto Q ImpRes (CQImpRes), Q sepharose FF (QsepFF) et ANX Sepharose 4FF (ANXsep4FF). . . . .	134
III.5	Courbes d'élution : concentration en Rubisco des éluats (g/L) en fonction du volume d'éluant passé (mL), sur les supports HyperCel Star AX (HCelAX), Capto Q ImpRes (CQImpRes), Q sepharose FF (QsepFF) et ANX sepharose 4FF (ANXsep4FF) en colonne à échelle laboratoire. . . . .	135
III.6	Courbe de titration de la résine ANX sepharose 4FF (HS) de pH 3 à 12, avec une solution de 0,1 mol/L de NaOH; Source LAGERLUND et al. 1998 . . . . .	138
III.7	Schéma de l'installation pilote de chromatographie d'échange d'ions . . . . .	141
III.8	Évolution de la conductivité en sortie de la colonne Resolute FM 140 en réponse à une perturbation impulsion de NaCl 2 mol/L. . . . .	142
III.9	Courbes perturbation de la DTS obtenues à partir de l'expérience 2 . . . . .	144
III.10	Comparaison des courbes de distribution de temps de séjour du lit fixe. Résultats expérimentaux (●) de l'expérience 2 et valeurs théoriques (-) selon le modèle des mélangeurs en cascade (J=47) . . . . .	146
III.11	Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 1_16 . . . . .	148
III.12	Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 1_50 . . . . .	148
III.13	Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 2_50 . . . . .	149
III.14	Courbe de percée (colonne non saturée) et courbe d'élution de l'expérience 4_50	149
III.15	Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 5_50 . . . . .	149

III.16	Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 3_140 . . . . .	150
III.17	Courbe de percée (non saturée) et courbe d'élution de l'expérience 5_140 . . .	150
III.18	Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 6_140 . . . . .	151
III.19	Évolution de la pression en entrée de la colonne lors de l'expérience 3_140. Sur l'échelle du temps, les phases d'équilibration et le départ de la charge sont indiquées . . . . .	151
III.20	Évolution de la pression à l'entrée de la colonne lors des différentes étapes dans l'expérience 5_140. L'élution se faisant en sens descendant, la pression en bas de la colonne reste faible . . . . .	152
III.21	Évolution du pH en haut et en bas de la colonne lors de l'expérience 5_140 (A) et 6_140 (B) . . . . .	153
III.22	Chromatogrammes HPLC-SEC des échantillons obtenus lors de la charge (A) et lors de l'élution (B) dans l'expérience 6_140 et comparaison avec celui du jus d'alimentation. Les solutions ont été diluées 5 fois pour analyse HPLC-SEC	156
III.23	Chromatogramme HPLC-SEC des échantillons obtenus lors de l'élution dans l'expérience 4_50 et comparaison avec celui du jus d'alimentation. Les solutions ont été diluées 10 fois pour analyse HPLC-SEC . . . . .	157
III.24	Exemple du chromatogramme d'un échantillon mesuré à 280 nm et à 340 nm. Le pic 2 est fortement représentatif des composés de type polyphénols. . . . .	158
III.25	Effet du colmatage sur la variation du flux du perméat à une valeur de PTM constante . . . . .	165
III.26	Evolution de $J_{LIM}$ comme un effet du colmatage sur la variation du flux en fonction de PTM . . . . .	165
III.27	Représentation graphique du mode de filtration frontale (Source : ESPINASSE 2003 . . . . .	166
III.28	Représentation graphique du mode de filtration tangentiel (Source : ESPINASSE 2003 . . . . .	167
III.29	Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la diafiltration de la Rubisco dans une cellule AMICON. Source : MONNOT 2015 . . . . .	171
III.30	Flux de perméat (J) de l'eau pure en fonction de PTM . . . . .	172
III.31	Chromatogrammes de la solution de Rubisco initiale et des différents prélèvements du perméat obtenu lors de l'expérience 2_10. Chaque prélèvement est associé à un nombre de volumes de cellule ( $Nb\ V_{cel} = V_{perméat\ passé}/V_{cellule}$ )	177
III.32	Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 1_10 . . . . .	178
III.33	Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 2_10 . . . . .	178
III.34	Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 6_10 . . . . .	179

III.35	Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 7_10 . . . . .	179
III.36	Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 3_400 . . . . .	180
III.37	Variation du flux en fonction du nombre de Vcel de perméat passés, pour des expériences réalisées avec deux membranes différentes (PTM = 0,7 bar) . . . .	183
III.38	Variation de la densité de flux en fonction du nombre de Vcel de perméat passés, pour des expériences réalisés à des valeurs de PTM différentes. (A) Expériences en cellule de 10 mL. (B) Expériences en cellule de 50 mL. . . . .	184
III.39	Effet de variation de la PTM sur la densité de flux (J). (*)TADDEI et al. 1986	185
III.40	Variation de la densité de flux en fonction du nombre de Vcel de perméat passés, pour des expériences réalisées avec des solutions de Rubisco de différentes concentrations. (A) Expériences en cellule de 10 mL. (B) Expériences en cellule de 400 mL (PTM = 0,7 bar) . . . . .	185



# Liste des tableaux

I.1	Teneur en acides aminés essentiels de la Rubisco et autres protéines animales de référence (g acide aminé/ 100 g protéine). Comparaison avec les besoins des enfants entre 2 et 5 ans. . . . .	7
II.1	Principales espèces fourragères cultivées en France (source : HUYGHE (2005)) .	45
II.2	Descriptif sommaire des principales caractéristiques des matières premières utilisées dans ce travail. . . . .	49
II.3	Correspondance entre la fréquence et la vitesse de rotation de la vis de la presse à vis inox à obturateur hydraulique et mécanique . . . . .	54
II.4	Observations réalisées concernant les paramètres externes au procédé au moment de la réception des lots. . . . .	57
II.5	Synthèse de conditions d'obtention des jus végétaux pour les différents lots de plantes . . . . .	59
II.6	Résultats expérimentaux de production de jus . . . . .	59
II.7	Conditions opératoires utilisées lors de l'analyse HPLC-SEC pour le dosage de protéines . . . . .	69
II.8	Marqueurs pour l'étalonnage de la colonne HPLC-SEC . . . . .	70
II.9	Teneurs en protéine des solutions de Rubisco purifiées déterminées par 3 méthodes et comparaison avec l'analyse HPLC-SEC . . . . .	78
II.10	SAX biosensor on-line immobilization protocol (* values determined after optimization of the method) . . . . .	83
II.11	Experimental conditions for analytical method validation . . . . .	83
II.12	Buffer solutions used. For each buffer solution, a specific calibration curve has been established . . . . .	83
II.13	Maximal binding and binding rates obtained with standard solutions of Rubisco at 1g/L in different PBS buffer solutions. Asterisk (*) means a replicate obtained with a biosensor regenerated four times. . . . .	85
II.14	Binding rates in different PBS buffer solutions obtained with standard solutions of Rubisco at 1g/L at different times from the solution preparation. Each value is the mean of three replicates . . . . .	86
II.15	Calibration curves equations for each buffer solution. Rubisco concentration recalculated in standards solutions (theoretical concentration 1 g Rubisco/L). . . . .	87
II.16	Rubisco quantitation in an unknown sample. All the measures were triplicated . . . . .	87
II.17	Caractéristiques physico-chimiques des jus végétaux issus de différents lots de plantes traités . . . . .	92



II.18	Teneur en Rubisco monomère (pic à 9,03 mL) et pertes sur 8 jours de conservation à 4°C pour le jus produit à partir du lot Luzerne_1 . . . . .	99
II.19	Influence des conditions de pH sur la concentration en Rubisco sous la forme monomère du jus produit à partir du lot Luzerne_5. (N.M. = Non mesuré) . .	104
II.20	Influence des conditions de décongélation sur la concentration en Rubisco sous la forme monomère du jus produit à partir du lot Luzerne_1 . . . . .	105
II.21	Suivi de la teneur en Rubisco monomère du jus produit à partir du lot Luzerne_1 décongelé suivant le protocole en four micro-ondes et stocké à 4°C . .	105
II.22	Conditions opératoires et résultats obtenus dans les expériences de séchage par atomisation des jus végétaux . . . . .	110
III.1	Caractéristiques des résines présélectionnées (Sources : Handbook Ion Exchange Chromatography Principles and Methods 11000421, GE HealthCare, LS. ; Chromatography media selection guide USD2714, Pall Corporation) . . . . .	125
III.2	Récapitulatif des principaux avantages des supports Q Hyper Z, Q ceramic hyper D, HyperCel Star AX, Capto Q, Capto Q ImpRes, Q sepharose FF et ANX sepharose 4FF. . . . .	126
III.3	Conditions opératoires des essais en mode batch pour les résines étudiées . . .	127
III.4	Résultats expérimentaux de rétention de la Rubisco en mode batch sur les résines présélectionnées. . . . .	128
III.5	Résumé des conditions opératoires durant l'équilibration, la charge et l'élution des expériences en colonne à l'échelle laboratoire pour les résines étudiées. . .	133
III.6	Résultats expérimentaux obtenus pour la rétention de Rubisco lors des expériences préliminaires en colonne en lit fixe avec les résines HyperCel Star AX, Capto Q ImpRes, Q Sepharose FF et ANX Sepharose 4FF. . . . .	135
III.7	Principales caractéristiques du lit fixe, conditions opératoires et paramètres du système étudié. . . . .	140
III.8	Conditions opératoires utilisées dans les expériences de traçage . . . . .	140
III.9	Résultats expérimentaux et calculs de détermination de HEPT/ $d_p$ et As . . .	143
III.10	Caractéristiques des lits fixes après package de la résine ANX Sepharose 4FF pour les colonnes XK 16/20, XK 50/20 et RESOLUTE FM 140 . . . . .	146
III.11	Conditions d'équilibration, de charge et d'élution utilisées dans les tests de changement d'échelle. L'élution a toujours été effectuée avec une solution de NaCl 0,5 mol/L à pH 6,3 . . . . .	147
III.12	Résultats expérimentaux de charge et d'élution de la Rubisco à différentes échelles	154
III.13	Estimation du facteur de rétention k de la Rubisco (hypothèse posée sur la valeur de la porosité externe $\varepsilon$ du lit) . . . . .	155
III.14	Caractéristiques des membranes présélectionnées pour les expériences de diafiltration de la Rubisco (Source : AUDINOS 2000) . . . . .	169
III.15	Principaux avantages et inconvénients des membranes présélectionnées pour les expériences de diafiltration de la Rubisco (Source : REMIGY et DESCLAUX 2007)	170
III.16	Caractéristiques des cellules AMICON utilisées pour le dessalement et la purification des solutions de Rubisco par ultrafiltration-diafiltration . . . . .	173
III.17	Résumé des conditions opératoires pour les expériences de diafiltration des solutions de Rubisco, réalisées dans des cellules AMICON . . . . .	174

III.18	Valeurs de perméabilité à l'eau pure à 20°C . . . . .	175
III.19	Concentrations en Rubisco initiales (Co) et finales (CR) et taux de perte (TP)	181
III.20	Densités de flux (J) en L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> et perméabilité Lp, ramenées à 20°C pour les quatorze expériences de diafiltration de la Rubisco, réalisées en mode frontal.	182



# Glossaire

**BLI** Bio-Layer Interferometry.

**CEI** Chromatographie d'échange d'ions.

**DF** Diafiltration.

**DTS** Distribution de temps de séjour.

**FPLC** Fast Protein Liquid Chromatography.

**HEPT** Hauteur Équivalente à un Plateau Théorique.

**HPLC** High Pressure Liquid Chromatography.

**HS** High Sub.

**INSA** Institut National des Sciences Appliquées.

**LCP** Leaf Protein Concentrate.

**LISBP** Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés.

**MS** Matière Sèche.

**MW** Masse molaire.

**PAGE** Polyacrylamide gel electrophoresis.

**PBS** Phosphate Buffered Saline.

**PEG** Polyéthylène glycol.

**PES** Polyethersulfone.

**PTM** Pression Trans-Membranaire.

**PVPP** Polyvinylpolypyrrolidone.

**SDS** Sodium dodecyl sulfate.

**SEC** Size Exclusion Chromatography.

**TP** Taux de perte.

**TR** Taux de rétention.

**UF** Ultrafiltration.



# Introduction

En septembre 2015, l'Assemblée générale des Nations Unies a adopté les 17 Objectifs du Développement Durable (ODD)<sup>1</sup>, assortis de 169 cibles à mettre en œuvre à l'horizon 2030. Parmi, eux, les objectif 2 (ODD02) et 12 (ODD12) abordent particulièrement les sujets de la promotion d'une agriculture durable et l'établissement de modes de consommation et de production qui permettent de protéger les écosystèmes dans l'intérêt de toutes les sociétés et des générations futures

Plus précisément, dans ces objectifs sont visés :

- Assurer la viabilité des systèmes de production alimentaire et mettre en œuvre des pratiques agricoles résilientes qui permettent d'accroître la productivité et la production et contribuent à la préservation des écosystèmes ;
- Réduire les pertes de produits alimentaires tout au long des chaînes de production et d'approvisionnement, y compris les pertes après récolte ;
- Instaurer une gestion écologiquement rationnelle des produits chimiques et de tous les déchets tout au long de leur cycle de vie, et réduire considérablement leur déversement dans l'air, l'eau et le sol, afin de minimiser leurs effets négatifs sur la santé et l'environnement.

En consonance avec ces objectifs, un changement de pratiques alimentaires généré en grande partie par un rythme croissant de la population se met en place depuis ces dernières décennies. En effet, les politiques de santé publique, des recommandations spécifiques pour certaines catégories de population, la substitution d'une base d'aliments traditionnels par des nouveaux aliments ou nouveaux ingrédients, représentent quelques propulseurs de ces nouvelles pratiques.

Outre la composante nutritionnelle, la demande sociétale actuelle vise aussi le remplacement progressif des protéines (qu'elles soient d'origine animale ou végétale) utilisées en tant qu'ingrédients alimentaires fonctionnels (soja, lait, œuf . . .), caractérisées par un fort caractère allergène. Pour faire face à ces attentes, les protéines foliaires, et en particulier la Rubisco, se présentent comme une alternative intéressante. En effet, la Rubisco peut très bien répondre aux besoins de propriétés fonctionnelles (pouvoirs émulsifiant, moussant, gélifiant) tout en étant considérée comme la protéine non allergène de référence. Ses applications peuvent ainsi viser des secteurs d'activités divers incluant l'agro-alimentaire, la cosmétique ou la pharmacie.

La Rubisco, de son nom complet ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase, est une protéine très répandue dans le végétal, largement étudiée en raison de son rôle biologique. En effet, en tant qu'enzyme sa fonction principale chez la plante est celle de permettre la fixation du dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> dans la biomasse végétale pendant le Cycle de Calvin, lors de la photosynthèse. D'un point de vue nutritionnel la Rubisco contient un amino-gramme équivalent à celui des protéines du lait ou de l'œuf, ce qui la positionne avantageusement devant les autres protéines d'origine végétale. De plus, différentes études ont mis en évidence

---

1. <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/fr/>

les propriétés fonctionnelles de la Rubisco telles que son pouvoir émulsifiant, moussant et gélifiant, ce qui uni à une bonne solubilité a éveillé un fort intérêt pour son usage dans de nouvelles applications à haute valeur ajoutée. Dans ce contexte, la mise en place des procédés permettant la séparation et la purification de la Rubisco représente un enjeu économique et sociétal évident.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse de doctorat. Elle a été réalisée dans le cadre du projet Collaboration Laboratoires-Entreprises (CLE) RUBIS de la Région Occitanie. Les partenaires du projet sont le groupe coopératif Vivadour et sa filiale Ovalie Innovation, le centre de recherche RAPSODEE de l'Institut Mines-Télécom à Albi (IMT Albi), ainsi que le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de l'Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Toulouse, et plus particulièrement l'équipe EAD10. Dans le cadre de ce projet, les principales missions de chaque partenaire étaient :

- LISBP : l'étude d'une filière de production de solutions de Rubisco à partir des plantes sélectionnées, et la production de protéine pour sa caractérisation fonctionnelle, qui font l'objet de ce travail,
- RAPSODEE : l'étude sur la caractérisation fonctionnelle de la protéine, en lien notamment avec la mise en forme de la poudre de Rubisco par atomisation,
- VIVADOUR / Ovalie Innovation : la contribution à la sélection des matières premières végétales et les études concernant l'intérêt économique et sociétal de la protéine, et son caractère allergène.

Dans le cadre de ce travail, le procédé étudié comporte trois opérations principales : le pressage de la plante pour la production des jus, l'extraction de la protéine des jus par séparation sur résine d'échange d'ions et la purification et le conditionnement des solutions par ultrafiltration en mode diafiltration, d'après le schéma de la figure 1. La réalisation de ces objectifs a nécessité bien évidemment la mise au point des méthodes de caractérisation et de mesure de la protéine en solution, de conservation des jus produits saisonnièrement, etc... Le projet a aussi permis la production de quantités suffisantes de protéines pour la validation de ses propriétés fonctionnelles, bien qu'en moindre quantité par rapport à celle qui était prévue au départ du projet.

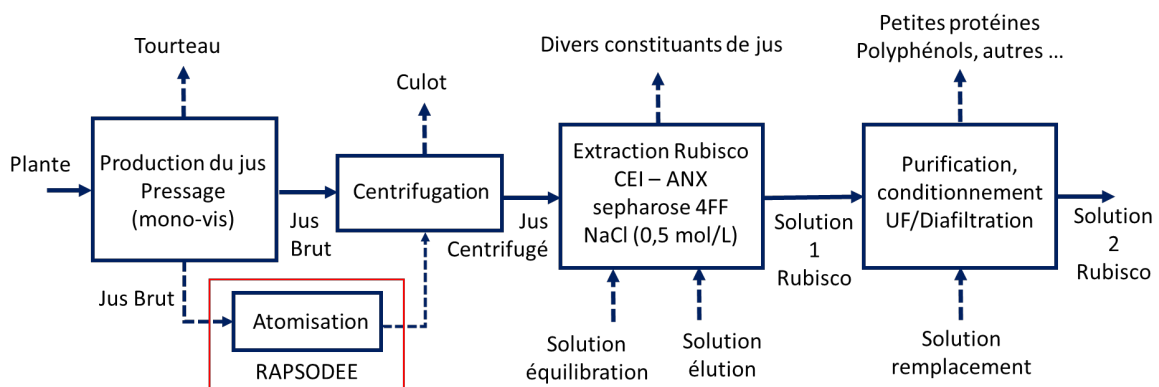


FIGURE 1 – Schéma de la filière de production de Rubisco étudiée dans le cadre de cette thèse.

En accord avec les objectifs d'une agriculture durable, et avec la valeur économique et sociale de la protéine, le procédé préconisé se veut le plus respectueux possible de l'environnement, et peut être conçu comme faisant partie des filières valorisant intégralement, en tant que matière et en tant qu'énergie, les matières premières. Cet aspect n'a pas été intégré ici, mais avait été abordé dans une étude préliminaire réalisée au LISBP, dans le cadre du Projet ANR Produluz (2007-2011).

Enfin, cette thèse est présentée en trois chapitres. Le premier chapitre est un état de l'art qui a pour objectif de mieux connaître la protéine et les procédés proposés à ce jour pour sa production industrielle. Les principales problématiques à résoudre seront alors dégagées. Le deuxième chapitre aborde la première étape du procédé, c'est-à-dire la production des jus, leur caractérisation et leur conservation. Les méthodes analytiques sont aussi présentées. Enfin, dans le troisième chapitre les opérations de séparation permettant l'obtention des solutions de protéine sont présentées et discutées.

L'ensemble du travail a été réalisé avec des milieux réels et à différentes échelles. Ainsi, tous les objectifs scientifiques initialement proposés n'ont pas été sans doute résolus, et les résultats sont parfois considérés comme préliminaires ou manquent d'optimisation. Cependant, l'ensemble de la filière a montré sa faisabilité et de nombreuses perspectives sont proposées pour son optimisation et développement futur.





# État de l'art

## Sommaire

1	La protéine Rubisco . . . . .	<b>5</b>
1.1	Présentation de la Rubisco . . . . .	5
1.2	Structure et propriétés physico-chimiques de la Rubisco . . . . .	9
1.3	Principales propriétés . . . . .	11
1.4	Procédés industriels pour la purification de la Rubisco à partir d'extraits de plantes . . . . .	15
2	Historique des procédés . . . . .	<b>17</b>
2.1	Premiers procédés : obtention de concentrés de protéines solubles d'origine végétale . . . . .	18
2.2	Cristallisation comme technique de purification, préparation d'une fraction protéique, Fraction I . . . . .	21
2.3	Production de concentrats de protéines foliaires à partir de la technique précipitation/coagulation et de l'ultrafiltration . . . . .	22
2.4	Procédés de purification par chromatographie d'exclusion stérique SEC . . . . .	23
2.5	Purification de la Rubisco par chromatographie d'échange d'ions . . . . .	25
2.6	Dernières études : propositions à l'échelle industrielle . . . . .	29
3	Conclusion du chapitre . . . . .	<b>41</b>

## 1 La protéine Rubisco

### 1.1 Présentation de la Rubisco

La Rubisco (ou ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase) est l'enzyme qui catalyse le cycle de Calvin (fixation du  $\text{CO}_2$ ) lors de la photosynthèse. Elle est ainsi présente dans la plupart des organismes autotrophes qu'il s'agisse des procaryotes ou d'organismes plus développés comme les algues ou les plantes supérieures. Chez les eucaryotes, la Rubisco est située dans les chloroplastes, organite présent dans le cytoplasme des organismes photosynthétiques et qui contient la chlorophylle et d'autres molécules nécessaires à la fonction photosynthétique. Cependant, l'action enzymatique de la Rubisco est réputée être relativement peu efficace (ANDERSSON et BACKLUND 2008), et à ce titre, elle est considérée comme la protéine la plus abondante dans la biomasse végétale. Il a été prouvé que la Rubisco peut

représenter jusqu'à 75% de la totalité des protéines foliaires (les feuilles des plantes étant le lieu principal de localisation des chloroplastes) hydrosolubles chez les plantes supérieures ou à l'intérieur des micro-organismes (DOUILLARD et DE MATHAN 1994).

Les facteurs de variation de la teneur en Rubisco des feuilles chez la plante sont nombreux, liés au génotype mais aussi au stade de développement, à la nutrition azotée, à l'éclairement, à la température de développement ou à l'état sanitaire de la plante (SAUGIER 1983). Ces différents éléments font ou ont fait l'objet de nombreux travaux scientifiques puisque la photosynthèse reste le mécanisme principal qui permet de nourrir l'ensemble de la planète et de maintenir au même temps les niveaux d'oxygène et de CO<sub>2</sub> adéquats dans l'air.

Parmi eux, un facteur très important est le mécanisme de fixation du CO<sub>2</sub> lors de la photosynthèse. Parmi les trois mécanismes possibles (dits en C3, en C4 ou CAM, pour Crassulacean Acid Metabolism)<sup>1</sup>, le C3 (formation d'une molécule C3, le 3-phosphoglycérate) est celui catalysé par la Rubisco, le plus fréquent au monde mais aussi le moins efficace puisque la fonction carboxylase de la Rubisco est relativement peu efficace comparée à la fonction oxydase (fixation du O<sub>2</sub> ou photorespiration) avec laquelle elle est en compétition. Ainsi, les plantes dites en C3 (comme la luzerne, le tabac, le riz ou le soja) concentrent la Rubisco dans leurs feuilles afin de maximiser ce mécanisme et favoriser autant que possible leur croissance.

Dans les plantes dites en C4 comme le maïs ou le sorgho, au mécanisme classique en C3 se superpose un deuxième mécanisme dit en C4 (pour formation d'un C4, le malate), par l'action de l'enzyme phosphoénolpyruvate carboxylase, dont l'efficacité est supérieure à celle de la Rubisco. Cette fixation primaire permet à la plante de disposer d'une source complémentaire de CO<sub>2</sub> pour l'incorporer au cycle de Calvin. Dans les mêmes conditions d'ensoleillement et de teneur en CO<sub>2</sub> atmosphérique, la photosynthèse des plantes dites C4 est limitée presque uniquement par l'activité biochimique de la feuille, et peut avoir lieu de manière efficace même à faible teneur en CO<sub>2</sub>. Les plantes C4 contiennent aussi de la Rubisco, puisqu'elles doivent de toute façon fixer le CO<sub>2</sub> lors du cycle de Calvin, mais elle est différemment distribuée. Par contre, le mécanisme en C4 est plus coûteux énergétiquement et les plantes C4 se trouvent naturellement dans des zones chaudes où les plantes C3 ne peuvent pas se développer.

Enfin, le mécanisme CAM<sup>2</sup> ne concerne que les plantes grasses, dont l'économie de l'eau est essentielle. Leur mécanisme de fixation du CO<sub>2</sub> est de type C4 et a lieu uniquement durant la nuit. Des concentrations importantes de malate sont alors stockées dans les cellules. Pendant le jour, la lumière permet le développement du cycle de Calvin par l'intermédiaire de la Rubisco.

Quel que soit le mécanisme de fixation du CO<sub>2</sub>, les plantes vertes ont donc toutes de la Rubisco. Néanmoins, la teneur et la localisation dans la feuille peut changer considérablement et être plus ou moins dépendante des facteurs externes.

---

1. Site Web RNBIO. *La photosynthèse en C4*. Site des Ressources Numériques en Biologie [https://rnbio.upmc.fr/physio\\_veg\\_photosynthese\\_22\\_C4\\_1](https://rnbio.upmc.fr/physio_veg_photosynthese_22_C4_1), consulté le 2018-07-15.

2. Site Web RNBIO. *La photosynthèse des plantes CAM*. Site des Ressources Numériques en Biologie [https://rnbio.upmc.fr/physio\\_veg\\_photosynthese\\_23\\_CAM\\_1](https://rnbio.upmc.fr/physio_veg_photosynthese_23_CAM_1), consulté le 2018-07-15.

En plus de son importance du point de vue biologique, la Rubisco est aussi réputée pour ses qualités nutritionnelles. Dans la table I.1, la composition en acides aminés de la Rubisco est comparée avec celle de l'œuf qui est la protéine de référence, et aux recommandations de la FAO pour la correcte croissance des enfants en bas âge (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture) (STEINKE et al. 1980 ; FAO/WHO/UNU 1985 ; DOUILLARD 1996 ; RACKIS et al. 1961).

Tableau I.1 – Teneur en acides aminés essentiels de la Rubisco et autres protéines animales de référence (g acide aminé/ 100 g protéine). Comparaison avec les besoins des enfants entre 2 et 5 ans.

<b>Acides aminés essentiels</b>	<b>Children<sup>a</sup> (2-5 yrs)</b>	<b>Oeuf<sup>b</sup></b>	<b>Casein<sup>c</sup></b>	<b>Rubisco<sup>d</sup></b>	<b>Farine de soja<sup>e</sup></b>
Arginine	-	6,1	3,7	9,1	8,4
Histidine	1,9	2,5	3,2	3,9	2,5
Isoleucine	2,8	4,8	5,4	4,9	5,1
Leucine	6,6	8,1	9,5	9,3	7,7
Lysine	5,8	6,7	8,5	6,5	6,9
Methionine	2,5	3,4	3,5	1,9	1,6
Cystine	2,5	2,7	3,5	1,5	1,6
Phénylalanine	6,3	6,5	11,1	7	5,0
Threonine	3,4	5,1	4,2	5,3	4,3
Tyrosine	3,4	4,1	4,2	5,8	3,9
Tryptophan	1,1	1,7	1,4	2,7	1,3
Valine	3,5	5,6	6,3	6,7	5,4

(a) Source : FAO/WHO/UNU (1985) ; (b) Source : FAO/WHO/UNU (1985) ; (c) Source : STEINKE et al. (1980) ; (d) Source : DOUILLARD (1996) ; (e) Source : RACKIS et al. (1961)

Ces propriétés nutritionnelles, et le faible ou nul pouvoir allergène reconnu à cette protéine, ont motivé à la fin des années 90 des travaux de recherche visant à produire un concentré protéique à usage alimentaire. Certains de ces travaux ont abouti, notamment en France, à des brevets dont l'objectif est en général la production des protéines hydrophiles (LEVESQUE et RAMBOURG 2002). Cependant, la teneur relativement faible à laquelle la Rubisco est récupérée dans les jus végétaux, rend difficile l'exploitation de cette protéine pour en faire la base de nouveaux aliments.

Enfin, la Rubisco est aussi investiguée pour ses propriétés fonctionnelles comparables voire supérieures aux produits de référence. Ces propriétés permettent d'envisager l'usage de la

Rubisco en tant qu'ingrédient dans des formulations aux applications industrielles diverses dont l'alimentation, les adhésifs, la cosmétique ou la pharmacie (KAPEL 2005 ; VAN DE VELDE et al. 2011a ; UDENIGWE et al. 2017). De par leur importance dans ce travail, ces propriétés seront examinées de manière plus détaillée dans la suite de ce chapitre.

Comme pour la plupart des protéines, les diverses méthodologies proposées jusqu'à présent ont permis l'obtention de produits de différentes qualités en fonction principalement du degré de pureté attendu pour les applications envisagées. Parmi les différents types de produits finaux de purification de la Rubisco, on trouve :

### **Les concentrés de protéines foliaires**

Les concentrés de protéines foliaires (en anglais Leaf Protein Concentrate (LCP)) sont les premiers produits obtenus à partir du fractionnement des extraits de cultures fourragères. Les LCP présentent une haute teneur en protéines, mais sont riches en autres composés tels que les polyphénols, les pigments et les lipides. Les protéines qui constituent ces extraits sont composées d'un mélange des fractions protéiques vertes et blanches présentes dans les chloroplastes de la feuille. La teneur en Rubisco, associée à la teneur en protéines blanches présentes dans le concentrat, est très variable et dépend des méthodes d'extraction et de séparation utilisées. En général, la production de LCP permet de récupérer entre 50 et 70% de la teneur totale en protéines présentes dans les feuilles.

### **Les concentrés de protéines blanches**

Les concentrés de protéines blanches (appelées aussi protéines solubles) ont pour composé majoritaire la Rubisco. En général la teneur en protéines est de l'ordre de 60 à 80%. Malgré la haute teneur en protéine, les concentrés de protéines solubles sont très riches en polyphénols et en autres composés considérés antinutritionnels (FIRDAOUS et al. 2017). Plusieurs travaux se sont intéressés à la production de concentrés de protéines blanches à partir de la luzerne, en raison de leur haute teneur en protéines et de leur potentiel à être utilisés dans le secteur de l'alimentation humaine (DE FREMERY et al. 1973 ; KNUCKLES et al. 1975 ; IBARRA-HERRERA et al. 2011).

### **L'isolat de Rubisco (« Fraction I »)**

Dans l'isolat de Rubisco (aussi appelé « Fraction I »), la fraction protéique ne contient pas de composés tels que les acides nucléiques, lipides, sucres, mais des petites fractions d'autres protéines ou macromolécules peuvent être présentes. La teneur en protéine se situe entre 85% et 95%. L'isolat est obtenu après séparation de la fraction protéique soluble en différentes fractions, en fonction de leurs masses molaires ; la masse moléculaire de la première fraction est d'environ 600 kDa, ce qui est très proche de la masse molaire de la Rubisco. L'appellation « Fraction I » a été donnée lors des premiers travaux d'extraction de la Rubisco, considérant cette fraction comme une fraction homogène de protéine (SINGER et al. 1952). Le nom Rubisco

n'a été attribué qu'en 1979 par le biochimiste David Eisenberg, quelques années après la découverte de la fonction catalytique oxygénase de l'enzyme (WILDMAN 2001). Plusieurs auteurs utilisent la dénomination « Fraction I » pour identifier la fraction protéique soluble contenant majoritairement de la Rubisco (KISHIMA et al. 1987 ; MAKONI et al. 1993)

## La Rubisco purifiée

La Rubisco purifiée est considérée libre d'autres macromolécules, mais des composés tels que des sels, de l'eau ou d'autres petites molécules peuvent être présents. En général il s'agit de molécules ayant une taille inférieure à 1 kDa et qui assurent la stabilité et/ou la solubilité de la Rubisco. La teneur en protéine peut aller de 95% à 99%. La Rubisco purifiée peut être obtenue à partir d'une large variété de plantes mais aussi d'autres organismes tels que les archées, les bactéries et les algues (HEDA et MADIGAN 1989 ; GALMÉS et al. 2005 ; YOUNG et al. 2017). La Rubisco purifiée est généralement produite à une échelle laboratoire dans un but de recherche lié à ses fonctionnalités biologiques.

L'obtention de la protéine à différents niveaux de pureté a permis d'étudier les caractéristiques et le comportement de l'enzyme du point de vue physico-chimique et biologique, mais aussi d'évaluer d'autres propriétés de la molécule telles que ses propriétés alimentaires et ses propriétés fonctionnelles.

## 1.2 Structure et propriétés physico-chimiques de la Rubisco

La Rubisco est une protéine globulaire multimérique. Elle est généralement composée de deux types de sous-unités protéiques codées par deux gènes différents, des grandes sous-unités (notées L pour large) et des plus petites (notées S pour small) à raison de huit sous-unités de chaque type par Rubisco complète, L8S8, chez les végétaux supérieurs (ANDERSSON et BACKLUND 2008). Cette structure confère un caractère tridimensionnel à la molécule comme le montre la figure I.1. Sa structure possède une forme sphérique, avec des valeurs de rayon trouvées selon plusieurs auteurs entre 47 Å et 75 Å suivant l'origine de la molécule et la technique de détermination utilisée. D'après GATENBY et ELLIS (1990) la forme finale de la molécule ressemblerait à un cylindre avec un diamètre d'environ 110 Å et une hauteur de 100 Å.

Sa masse molaire est déterminée par la somme des masses molaires de ses sous-unités. Les grandes sous-unités ont chacune une masse molaire de 56 kDa tandis que les petites sous-unités ont chacune une masse molaire de 14 kDa. Ainsi, pour la forme L8S8, la plus commune de la molécule et celle avec la masse molaire la plus élevée, cette dernière est de 560 kDa (DOUILLARD et DE MATHAN 1994). Il a été démontré que la structure en sous-unités de la Rubisco provenant des différents types de plantes, présente une importante stabilité, due au nombre de ponts de contact entre les sous-unités. D'un point de vue structurel les autres formes de la molécule dépendent de la présence ou non des petites sous-unités. Les sites actifs de la Rubisco sont habituellement situés sur les grandes sous-unités.

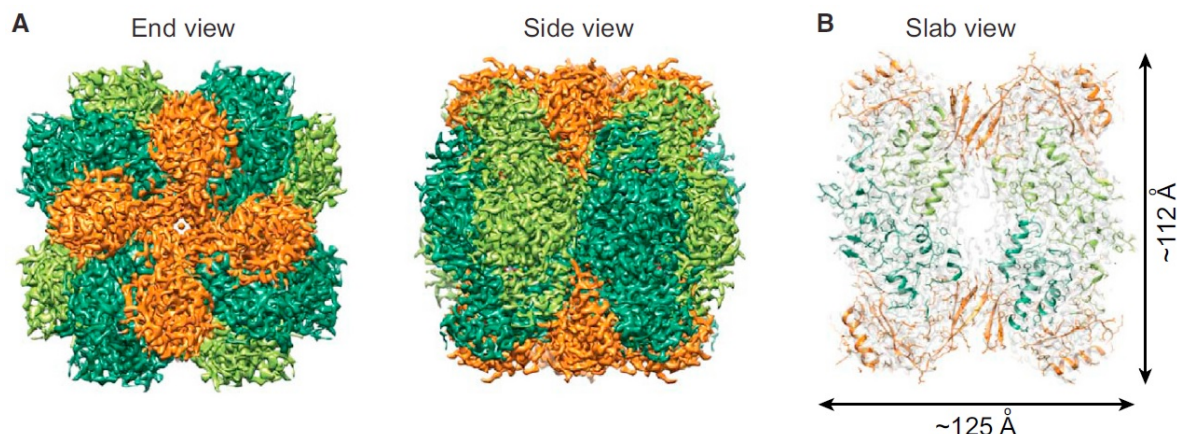


FIGURE I.1 – Structure de la Rubisco (BHAT et al. 2017)

Divers travaux ont été effectués sur la structure de la Rubisco et sur sa fonctionnalité du point de vue biologique. TOMIMATSU (1980) a basé ses recherches sur les propriétés macromoléculaires de la protéine comme sa stabilité et sa conformation, ainsi que les interactions des sous-unités, sous l'effet de paramètres tels que le pH du milieu. Dans cette étude, des mesures réalisées par diffusion de la lumière montrent l'effet du pH (dans un intervalle de pH de 3,4 à 7,5) sur la conformation de l'enzyme, ce qui peut modifier la forme de la molécule. Par exemple à un pH proche de 3,5 la molécule peut adopter une conformation « allongée », due à un dépliage presque complet de l'enzyme, sans que pour autant il y ait une dissociation de ses sous-unités, grâce à sa masse moléculaire élevée.

Dans des recherches faites plus récemment, ANDERSSON et BACKLUND (2008), affirment qu'à cause de la taille et de la complexité de la Rubisco, on ne connaît pas encore les résidus qui peuvent améliorer l'efficacité catalytique de la carboxylation.

D'autres travaux se sont intéressés aux fonctionnalités biologiques de la Rubisco et à ses applications dans ce domaine. Un travail réalisé par KELLOGG et JULIANO (1997) étudie les mécanismes interactionnels qui interviennent durant la fixation du dioxyde de carbone et les effets de modification de la protéine, ainsi que les implications d'une utilisation de cette molécule dans des études d'évolution moléculaire et d'adaptation.

Afin de mieux comprendre le comportement de la Rubisco et de pouvoir la caractériser, la protéine doit être extraite du milieu naturel où elle se trouve, c'est-à-dire de la plante. C'est ainsi que la détermination de ses différentes propriétés va être liée au degré de purification obtenu lors de la séparation des autres composés présents dans la matrice d'où elle provient.

## 1.3 Principales propriétés

### 1.3.1 Propriétés physico-chimiques

Plusieurs auteurs ont étudié en détail les propriétés physico-chimiques de la Rubisco (WANG et KINSELLA 1976 ; BAHR et al. 1977 ; TOMIMATSU 1980 ; DOUILLARD et DE MATHAN 1994 ; LIBOUGA et al. 1996, LAMSAL et KOEGEL 2007). L'étude de ces propriétés a permis non seulement de mieux comprendre le comportement de la protéine mais aussi d'identifier les différentes technologies nécessaires pour la purifier dans sa forme native.

#### Point Isoélectrique

Divers auteurs ont mesuré et trouvé des valeurs différentes pour le point isoélectrique de la Rubisco (BAHR et al. 1977 ; DOUILLARD et SONGRILLAY KONGPHET 1990). Ces différences peuvent s'expliquer par diverses raisons. D'une part, la méthode employée pour la mesure peut avoir une influence sur la composition du milieu dans lequel se trouve la protéine, ce qui affecte la valeur du pI. D'autre part, la plante dont est extraite la Rubisco peut également avoir une influence, puisque BAHR et al. (1977) ont estimé le pI à environ 4,5 pour la Rubisco issue du tabac, de l'épinard, du maïs et du coton ; alors que dans le cas de la luzerne une valeur de 6,0 a été reportée par DOUILLARD et SONGRILLAY KONGPHET (1990). Enfin, la conformation de la molécule influe également, puisque le pI d'une molécule non-dénaturée est en dehors de la gamme des pIs de ses sous-unités (DOUILLARD et DE MATHAN 1994).

#### Température de dénaturation

La température de dénaturation de la Rubisco a été mesurée par la méthode de calorimétrie différentielle à balayage. TOMIMATSU (1980) a trouvé qu'à un pH de 7,5 la température de dénaturation d'une solution purifiée de Rubisco de luzerne déterminée à une vitesse de chauffe de 10°C/min est de 76°C. La présence d'un seul pic endothermique dans le profil calorimétrique suggère que les températures de dénaturation des 2 sous-unités sont presque identiques. Plus récemment des tests dans des conditions similaires ont été réalisés afin de caractériser un isolat de Rubisco d'épinard (MARTIN et al. 2014). Les auteurs ont trouvé que pour une solution ajustée à pH 7 la température de dénaturation de la Rubisco déterminée à 2°C/min est de 65°C. Ces valeurs expliquent que la Rubisco de la luzerne soit considérée comme une des plus thermostables, cependant il est probable que le dernier résultat soit plus juste, car il a été obtenu avec une vitesse de chauffe plus petite. D'autres raisons qui expliquent ces différences sont la présence de  $Mg^{2+}$  et  $CO_2$  et le pH du milieu, c'est-à-dire sa composition (DOUILLARD et DE MATHAN 1994).

#### Solubilité

De manière générale des études comparatives ont prouvé que dans des conditions de températures modérées (25°C) la solubilité de la Rubisco est minimale pour des valeurs de pH



entre 3 et 5 et maximale pour des valeurs supérieures à 7 (LU et KINSELLA 1972; VAN DE VELDE et al. 2011a). En effet, des tests de solubilité en fonction du pH ont démontré que moins de 10% de l'azote était soluble entre un pH de 3 et 4, alors que la solubilité augmente graduellement à partir d'un pH de 4 jusqu'à 9. À un pH de 9 presque 50% des protéines cytoplasmiques restent solubles et au-delà de cette valeur la solubilité décroît. Une étude réalisée par WANG et KINSELLA (1976) a mis en évidence que l'extraction de la Rubisco en présence de solvants comme l'acétone peut diminuer fortement la solubilité de la protéine.

## **Agrégation**

Plusieurs auteurs se sont penchés sur la capacité de la Rubisco à former des oligomères (capacité d'agrégation) et sur l'analyse des différents facteurs à l'origine de ce phénomène. Une étude réalisée par DOUILLARD (1986) a démontré que les agrégats de Rubisco de la luzerne se dissocient, sous des conditions dénaturantes, dans des sous-unités ayant les mêmes masses moléculaires que celles de la Rubisco.

KLEINKOPF et al. (1970) ont mis en évidence la formation d'oligomères à partir de la Rubisco d'orge, après stockage à 0°C pendant plusieurs mois. De plus, une étude réalisée par LUO et al. (2000) à partir de la Rubisco de *Rhodospirillum rubrum* a démontré que la température est un facteur important sur le repliement de la molécule et il a été remarqué que des hautes températures entraînent une agrégation irréversible de la Rubisco. Dans ce cas, le phénomène d'agrégation est décrit comme la conséquence de l'interaction hydrophobe irrégulière entre les molécules de Rubisco sur les surfaces exposées.

Le phénomène d'agrégation de la Rubisco chez les algues a été également étudié in vivo par KNOPF et SHAPIRA (2005), qui ont démontré la formation sélective d'unités à haute densité de particules de Rubisco, en réponse au stress oxydatif. Les grandes sous-unités ayant tendance à s'agréger, ils attribuent la formation des agrégats de Rubisco à l'élimination des petites sous-unités pendant le stress oxydatif avec la fragmentation des grandes sous-unités, permettant la formation des ponts-disulfure intra-protéine.

SUAREZ RUIZ et al. (2018) ont travaillé dans des systèmes aqueux à deux phases pour la purification de la protéine et ont mis en évidence l'influence de l'utilisation des solvants ioniques sur la stabilité de la protéine. Selon les auteurs, la Rubisco est plus susceptible de former des agrégats en présence de liquides ioniques que les autres protéines en raison de ses sous-unités, de sa taille et de sa complexité.

## **Autres propriétés**

D'autres propriétés physico-chimiques de la Rubisco qui ont fait l'objet de nombreuses recherches sont l'activité enzymatique ou sa capacité de cristallisation (HANSEN et al. 1999; CHAKRABARTI et al. 2002; DOUILLARD 1986; WILDMAN et KWANYUEN 1981).

De manière générale les études citées précédemment attribuent des propriétés physico-chimiques très variables à la Rubisco. Ces différences s'expliquent entre autres par l'hétéro-

généité naturelle liée à la variabilité génétique de la structure (DOUILLARD et DE MATHAN 1994).

### 1.3.2 Propriétés fonctionnelles

Les propriétés fonctionnelles d'une protéine déterminent son comportement lors des interactions avec son environnement, et donc au cours des transformations technologiques. Ces propriétés résultent des interactions moléculaires avec les autres molécules présentes dans le système, comme celles de l'eau, et sont fortement dépendantes des conditions comme le pH ou la température. Parmi les propriétés fonctionnelles on retrouve :

- les propriétés fonctionnelles dites d'hydratation : la solubilité et le gonflement, représentatives des interactions entre la protéine et l'eau, essentielles lors de sa mise en solution ;
- les propriétés fonctionnelles dites de structuration : le pouvoir gélifiant, l'agglomération et la précipitation, représentatives des interactions protéine-protéine, responsables parfois des problèmes de stabilité des protéines ;
- les propriétés fonctionnelles dites de surface : le pouvoir émulsifiant et le pouvoir moussant, représentatives des interactions aux interfaces, souvent recherchées dans le produit final.

La possibilité d'utiliser ces propriétés fonctionnelles dans certains secteurs d'activité, comme l'alimentaire, la cosmétique ou la pharmacie représentent des enjeux industriels majeurs. Concernant par exemple le secteur alimentaire, depuis les années 2000, de nombreux travaux (GUPTA et MURALIDHARA 2001 ; MURRAY 2002 ; KRALOVA et SJOBLOM 2009 ; DICKINSON 2012 ; ANIHOVI et al. 2012) ont pointé le besoin d'approfondir l'étude sur les propriétés et le comportement des protéines dans les systèmes alimentaires. Le but est notamment de développer des applications nouvelles et d'optimiser les procédés déjà existants, voire de répondre aux problématiques environnementales et de santé (allergénicité, toxicité...), et dans lesquels les interfaces jouent des rôles majeurs. Ces questionnements se sont posés indépendamment de l'origine des protéines. Ainsi, SELMANE (2010) a étudié l'extraction et la valorisation des protéines d'origine animale alternatives à celles du lait ou de l'œuf, en tant qu'ingrédient fonctionnel pour l'industrie alimentaire.

La Rubisco est réputée pour avoir des propriétés fonctionnelles intéressantes (VAN DE VELDE et al. 2011a). Ainsi, dans le cadre de ce projet, certaines propriétés fonctionnelles ont été choisies comme référence pour définir la nature du produit à obtenir. Il s'agit des propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes, auxquelles il faut ajouter la solubilité puisque ces propriétés s'expriment à partir des solutions aqueuses de Rubisco. Un intérêt particulier a donc été porté à ces propriétés qui ont guidé l'étude du procédé à chaque étape de la séparation.

La mise au point de méthodes de caractérisation des propriétés fonctionnelles et les déterminations sur les échantillons de protéine produits ont été réalisés dans le cadre de ce projet par notre partenaire scientifique du laboratoire Rapsodee – IMT Albi-Carmaux. Elles feront ici l'objet d'une présentation succincte dont l'objectif est de permettre de valider a posteriori les choix des conditions de travail étudiées dans le procédé.

La détermination de ces propriétés fonctionnelles est en général fortement dépendante de la concentration de protéine en solution et peut être réalisée à deux niveaux :

- la détermination d'une propriété physico-chimique directement liée à la propriété fonctionnelle recherchée (tension superficielle, potentiel zêta, ...), permettant de prédire a priori le comportement de la protéine vis-à-vis de la fonctionnalité recherchée ;
- la détermination directe de la propriété fonctionnelle dans le cadre de son utilisation (indice de crémage, volume de mousse, stabilité de la mousse ...).

Même si les travaux ne sont pas très nombreux, les propriétés fonctionnelles de la Rubisco ont fait l'objet d'études, parfois relativement anciennes (WANG et KINSELLA 1976 ; DOUILLARD et DE MATHAN 1994 ; LIBOUGA et al. 1996 ; LAMSAL et KOEGEL 2007 ; VAN DE VELDE et al. 2011a). Par contre, dans la littérature il n'est pas toujours spécifié la pureté de la protéine étudiée et fréquemment les travaux concernent un mélange des protéines hydrophiles plutôt que la protéine pure. Les comparaisons de ces propriétés sont aussi abondantes dans la littérature, que ce soit avec des produits de référence, ou avec les propriétés d'autres protéines végétales de référence, telles que celles du soja, du blé ou du petit pois (KNUCKLES et al. 1982 ; MARTIN et al. 2014).

L'étude comparative réalisée par KNUCKLES et al. (1982) montre que l'activité émulsifiante et la stabilité des émulsions des LCP de luzerne sont très proches de celles du soja, avec une capacité émulsifiante testée sur des huiles alimentaires qui est supérieure pour les LCP. LAMSAL et KOEGEL (2007) ont trouvé que la capacité émulsifiante de plusieurs fractions de protéines de luzerne préparées via différentes méthodes est toujours supérieure à celle de la protéine de l'œuf, bien que la stabilité des émulsions obtenues soit très similaire.

Des études plus récentes (VAN DE VELDE et al. 2011a) révèlent une capacité moussante plus élevée obtenue à partir d'un isolat de Rubisco d'épinard, que celles obtenues avec les protéines de soja et de blé. Dans la même étude il a également été mis en évidence que la Rubisco possède des capacités gélifiantes similaires à celle du soja pour des concentrations 12 fois inférieures (w/w%). Le remarquable pouvoir gélifiant de la Rubisco comparé à celui d'autres protéines a été confirmé par MARTIN et al. (2014) lors de tests comparatifs réalisés avec la protéine du blé et de l'œuf.

Bien qu'ils n'aient pas fait l'objet de mon travail, les pouvoirs moussant, émulsifiant et gélifiant de la protéine de Rubisco produite dans le cadre de ce projet ont été mesurés et comparés avec des produits de référence par un des partenaires du projet (IMT Albi-Carmaux – Laboratoire Rapsodee). D'une manière générale, il a été montré par les études réalisées que la protéine produite a des propriétés fonctionnelles au moins aussi intéressantes que les produits classiquement utilisés et dans certains cas, que ses propriétés sont supérieures (DE RESENDE 2017).

## 1.4 Procédés industriels pour la purification de la Rubisco à partir d'extraits de plantes

Comme évoqué précédemment, l'intérêt commercial des protéines végétales, telles que la Rubisco, a amené les chercheurs depuis plusieurs décennies à travailler sur le développement d'un procédé destiné à sa purification et à sa valorisation. Au fil du temps, de nombreux procédés de production de la Rubisco ont été proposés, basés sur diverses techniques de séparation, et permettant l'obtention de produits de qualité/pureté différentes, destinés à des applications dans des domaines spécifiques (cf. chapitre I paragraphe 2).

À ce jour, il n'existe toujours aucun procédé qui permette la production de la Rubisco à une échelle industrielle et malgré ses propriétés fonctionnelles, elle n'a jamais été utilisée dans les marchés ciblés faute d'une filière de production adaptée et rentable. Les problèmes rencontrés par les différents acteurs qui ont essayé de mettre en place une méthode industrielle, sont liés à plusieurs facteurs qui jusqu'à présent ont affecté la faisabilité du procédé.

Un des premiers facteurs est lié à une purification insuffisante de la Rubisco à la fin du procédé. En effet, comme évoqué précédemment, les matières végétales contiennent un nombre considérable de protéines, ainsi que des pigments, des composés phénoliques, des lipides et des protéases. Bien que tous les composés présents dans la plante n'aient pas d'effets négatifs sur la purification de la Rubisco, certains comme les pigments et les polyphénols peuvent être à l'origine d'une mauvaise qualité du produit final, associée à une coloration, à des odeurs et/ou à des goûts indésirables. De plus, certains composés comme les polyphénols ou les protéases sont responsables aussi d'une perte de la solubilité de la Rubisco tout au long du procédé. La présence de ces composés compromet gravement l'utilisation de la Rubisco dans ses applications en tant qu'ingrédient fonctionnel dans le secteur de l'alimentation.

Il a été aussi démontré que les polyphénols peuvent réagir avec les acides aminés de la protéine, ce qui entraîne la formation de complexes polymériques (PAPADOPOULOU et A. 2004), qui peuvent changer la valeur nutritionnelle de la Rubisco et provoquer des problèmes de digérabilité (RAMBOURG et MONTIES 1983). Parmi les composés phénoliques les plus courants dans les matières végétales on retrouve les phénols polymériques, les tannins, les polymères de l'acide gallique ou des flavonoïdes dont la réactivité avec la protéine a été étudiée (JERVIS et PIERPOINT 1989).

Les polyphénols peuvent interagir avec les protéines par des liaisons covalentes et non-covalentes (SPENCER et al. 1988; PIERPOINT 1983). Dans le cas de liaisons non-covalentes, plusieurs types de forces ont été identifiés : des forces hydrophobes, ioniques ou des liaisons hydrogènes, souvent réversibles. Pour leur part, les interactions covalentes ont lieu en raison de l'oxydation des polyphénols. L'oxydation peut être enzymatique (due à la présence de polyphenoloxydases PPO) ou non-enzymatique (due à la présence de métaux ou de composés alcalins) (JERVIS et PIERPOINT 1989). Les interactions covalentes étant considérées irréversibles, les conséquences sont une inactivation de la protéine et sa précipitation.

Le deuxième inconvénient rencontré dans ce type de procédés est la difficulté de maintenir la stabilité de la protéine dans sa forme native, face aux conditions non-adéquates des traite-

ments qu'elle subit, ce qui donne un produit final de faible qualité et/ou avec de faibles taux de rendement. Par exemple, durant la récupération de la protéine à partir de la plante, il est courant d'utiliser des produits chimiques tels que des acides ou des bases fortes à des concentrations élevées, modifiant le pH de la Rubisco à des valeurs trop faibles (entre 3 et 5) ou trop élevées (supérieur à 8) (TAN 1982; JOHAL 1982; MERODIO et SABATER 1988; LEVESQUE et RAMBOURG 2002). Aussi certaines méthodes de purification s'appuient sur la précipitation ou la coagulation de la Rubisco en utilisant des solvants organiques (par exemple le Polyéthylène glycol (PEG)) et/ou des agents acidifiants (JOHAL 1982; GALMÉS et al. 2005; SUAREZ et al. 2011). Ces différentes situations entraînent la dénaturation/agrégation de la protéine, donc une perte de solubilité et/ou de ses propriétés fonctionnelles. De plus, dans certains procédés, une étape supplémentaire est nécessaire pour remettre la Rubisco en solution.

En plus d'une dégradation par ajout de réactifs, les traitements thermiques auxquels les extraits de Rubisco sont soumis pendant leur purification peuvent aussi dégrader rapidement la protéine. DE JONG et al. (2015) ont identifié une perte d'environ 48% de teneur en Rubisco dans des extraits végétaux ayant subi un traitement thermique à des conditions relativement douces (50°C). En effet, SALVUCCI et al. (2001) ont démontré que la dénaturation des protéines enzymatiques entraîne une exposition des domaines hydrophobes de la protéine, ce qui peut favoriser d'une part la formation d'agrégats et d'autre part la formation des liaisons protéine-phénols.

Un troisième inconvénient rencontré est la difficulté d'avoir un procédé qui soit à la fois simple et rentable à l'échelle industrielle. Certains procédés qui ont été proposés se sont révélés efficaces pour la purification de la Rubisco, mais les coûts associés à la consommation énergétique ainsi qu'à la consommation des réactifs nécessaires, sont trop élevés pour une utilisation à grande échelle et avec un impact environnemental très important (FIRDAOUS et al. 2017).

En plus de ces inconvénients généraux, d'autres inconvénients sont variables et liés aux conditions spécifiques de chaque procédé. Par exemple, pour certains types de matière végétale de départ, un inconvénient qui peut se présenter est la difficulté d'avoir un taux de récupération de la protéine en quantités conséquentes pendant la phase de production des jus végétaux. Selon DE JONG et al. (2015), un problème rencontré lors de la purification de la Rubisco est la perte de quantités significatives liées à l'association de la protéine avec les membranes thylakoïdes. Cette association est influencée par les types de sels employés pendant les différentes étapes de séparation, leur concentration et/ou les valeurs de pH des solvants utilisés pour l'extraction.

Par ailleurs, des procédés basés sur la technique de cristallisation ont démontré leur efficacité dans la purification de la Rubisco à partir de la feuille du tabac, mais une moindre efficacité pour les autres matières végétales (WILDMAN et KWANYUEN 1982; JOHAL 1982).

Basés sur le concept de la bio-raffinerie, les procédés permettant la purification des protéines végétales reposent sur le principe du fractionnement d'une biomasse végétale afin de valoriser de manière individuelle chaque produit ou fraction transformé. Dans le cas des protéines végétales quelques considérations doivent être prises en compte, parmi elles peuvent

être citées la teneur minimale exigée dans les biomasses de départ, le degré de pureté souhaité, la conservation de propriétés spécifiques comme l'activité biologique, le temps et le coût de purification (GONZÁLEZ-PÉREZ et ARELLANO 2009).

D'une manière générale les principales étapes pouvant intervenir dans un procédé de purification de protéines végétales, sont les suivantes :

1. destruction de tissus ou organelles où se trouve enfermée la protéine ;
2. préparation d'un extrait qui contient la protéine sous une forme soluble ou sous une autre forme accessible (précipitâts, coagulâts). Cette étape est déterminante pour la suite du procédé car c'est le premier facteur qui affectera son rendement ;
3. une étape de clarification ou séparation avec des techniques relativement simples comme la centrifugation, la décantation ou la séparation membranaire ;
4. une ou plusieurs étapes de purification proprement dites selon le degré de pureté recherché ;
5. dans certains cas, une étape de concentration peut s'avérer nécessaire avant ou après l'étape (ou les étapes) de purification ;
6. selon le type de produit souhaité la dernière phase peut être une étape de séchage pour obtenir un produit solide.

Les extraits contenant un concentré de protéine sont souvent quantifiés par la méthode de détermination de l'azote total ou méthode Kjeldahl, qui permet la détermination de l'azote organique d'un échantillon dans lequel on déduit la quantité de protéine grâce à une relation préétablie entre la quantité d'azote et celle de protéines. D'autres techniques utilisées avec les mêmes fins sont la méthode de Lowry ou la méthode de Bradford (Bleu de Coomassie). Pour la quantification spécifique de la Rubisco dans des échantillons « purifiés », les techniques couramment utilisées sont la spectrophotométrie en mesurant l'absorbance de la solution à 280 nm suivie d'une caractérisation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de docécylsulfate de sodium ou Sodium dodecyl sulfate (SDS)-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). L'électrophorèse permet de confirmer la présence des deux sous-unités de la Rubisco. Compte tenu de la masse moléculaire de la Rubisco, la chromatographie par exclusion de taille, en anglais Size Exclusion Chromatography (SEC), est une technique de plus en plus utilisée car elle permet la quantification de la protéine dans un milieu complexe et dans sa forme native. Cet aspect sera abordé plus en détails dans le paragraphe 4 du chapitre II.

## 2 Historique des procédés

Les procédés de production de la Rubisco sont apparus simultanément à sa découverte au milieu du XX<sup>e</sup> siècle. Le potentiel d'utilisation des protéines foliaires a amené plusieurs acteurs à mettre en place des méthodes de purification basées sur des techniques différentes, afin d'obtenir un produit final répondant à certains critères selon les applications et les marchés visés. L'évolution dans le temps de ces méthodes de purification est principalement liée à l'évolution des critères demandés et des technologies disponibles.

Pendant les premières décennies, les procédés mis en place portaient un intérêt pour la récupération de différentes fractions présentes dans la plante et constituées par des composés valorisables. La plupart de ces fractions sont des mélanges de composés présentant un intérêt nutritionnel; certains de ces mélanges sont très riches en protéines. Ces premiers travaux cherchaient donc à produire, entre autres, des concentrats de protéines foliaires, destinés essentiellement à l'alimentation animale, l'exemple le plus représentatif est le procédé PRO-XAN (SPENCER et al. 1971).

Depuis les années 80, des études menées se sont intéressées en plus de ces propriétés nutritionnelles, aux propriétés fonctionnelles de la Rubisco, ce qui a permis de considérer la protéine comme un ingrédient intégrable dans l'alimentation humaine, nécessitant alors des qualités de produit différentes de celles des produits obtenus jusqu'à présent (BARBEAU et KINSELLA 1988).

Outre les applications dans l'alimentation, la Rubisco a éveillé aussi un intérêt particulier de par ses propriétés biologiques, en tant qu'enzyme, ce qui a permis le développement de nombreuses méthodes de purification de la protéine cherchant à conserver sa fonctionnalité. Bien que ces méthodes aient été développées à une échelle laboratoire, leur considération s'avère fondamentale pour essayer de proposer des nouvelles alternatives aux techniques conventionnelles de séparation de protéines.

Nous présentons ici une synthèse bibliographique des principaux procédés existants à ce jour; les procédés sont présentés en fonction des techniques de purification employées et des thématiques d'intérêt, tout en essayant de les présenter par ordre chronologique.

## **2.1 Premiers procédés : obtention de concentrés de protéines solubles d'origine végétale**

Le premier brevet sur le fractionnement des protéines végétales à partir de la luzerne afin d'obtenir des produits avec de la valeur nutritionnelle date des années 50 (MILLER 1952). Cependant ce procédé n'a pas centré son intérêt sur la purification de protéines, mais plutôt sur l'obtention de mélanges riches en autres composés tels que des vitamines, des minéraux ou des pigments comme le carotène. Bien que l'objectif principal du procédé soit l'utilisation de ces fractions en tant que produits alimentaires, certaines des techniques employées (par exemple l'extraction liquide-liquide avec des solvants tels que l'éther de pétrole et le méthanol) sont considérées incompatibles avec l'alimentation en raison de la toxicité des solvants utilisés. De plus, les conditions extrêmes des multiples traitements que subissent ces fractions pendant les étapes de séparation/concentration (pH trop élevés, traitements thermiques à la température d'ébullition) affectent la valeur nutritionnelle des produits finaux.

Les premières études sur le développement industriel de séparation et de production de la Rubisco à différents niveaux de pureté ont principalement commencé dans les années 70 (HOLLO et al. 1971; BICKOFF et al. 1976; BRAY et HUMPHRIES 1978). Le but de ces études était de produire des fractions riches en protéines à partir de différentes matières foliaires, parmi lesquelles la luzerne présentait l'avantage d'être une des cultures fourragères les plus

abondantes. Les premiers travaux identifiés dans cette période avaient pour objectif la production de concentrés défibrés à haute valeur biologique avec des teneurs en protéines inférieures à 40%(w/w) (HOLLO et al. 1971). La coagulation thermique à des températures comprises entre 80 et 85°C était la technique initiale de séparation/purification ; les niveaux de concentration et de pureté finaux en protéines étaient obtenus par des étapes successives de fermentation aérobie/évaporation.

Un procédé basé sur des techniques similaires de coagulation thermique et de déshydratation a été proposé par SPENCER et al. (1971), permettant le traitement de la plante à une échelle pilote. Le but du procédé est de produire à partir du jus végétal de la luzerne, une fraction protéique riche en pigments xanthophylles ce qui a été à l'origine du nom du procédé : « Pro-Xan process ». Les principales étapes du procédé ainsi que le dimensionnement du pilote sont montrés dans le schéma de la figure I.2.

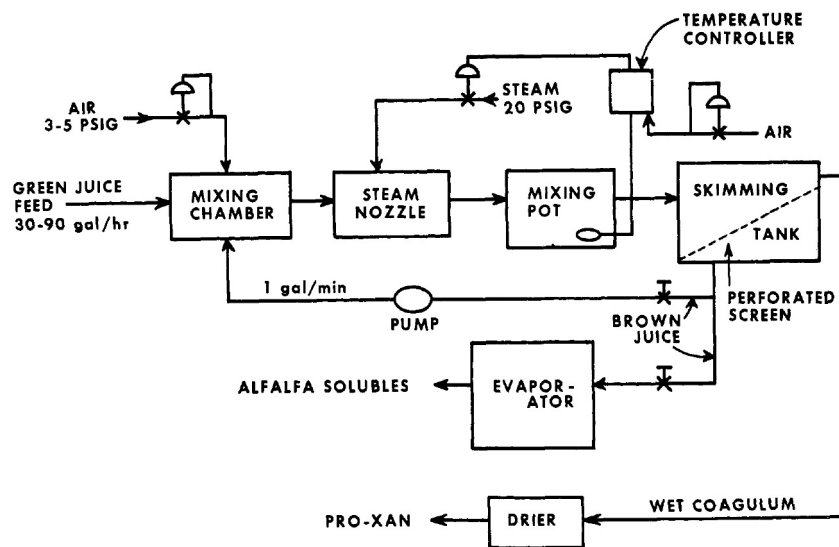


FIGURE I.2 – Feuille de route de l'usine pilote du procédé « Pro-Xan process » (SPENCER et al. 1971)

Des années plus tard, des modifications ont été introduites dans le procédé afin de produire à partir des jus végétaux, un concentrat des protéines blanches (sans chlorophylle) destiné à la consommation humaine appelé Welpro (white edible leaf protein) et un concentrat de protéines vertes nommé Pro-Xan II (EDWARDS et al. 1975). Un schéma du procédé contenant toutes les étapes, ainsi que les différents produits obtenus est présenté dans la figure I.3.

Durant les étapes du procédé, le fractionnement des protéines est réalisé tout d'abord par un traitement thermique à 60°C permettant la formation d'un agglomérat de protéines vertes qui est traité par la suite afin d'obtenir la fraction Pro-Xan II, et un deuxième traitement à 80°C où a lieu la coagulation/précipitation de protéines blanches. A chaque étape de fractionnement, la séparation des solides est faite par centrifugation. Le procédé introduit aussi l'utilisation d'agents réducteurs tel que le bisulfite afin d'éviter la coloration de la fraction de protéines blanches due à la présence des polyphénols.



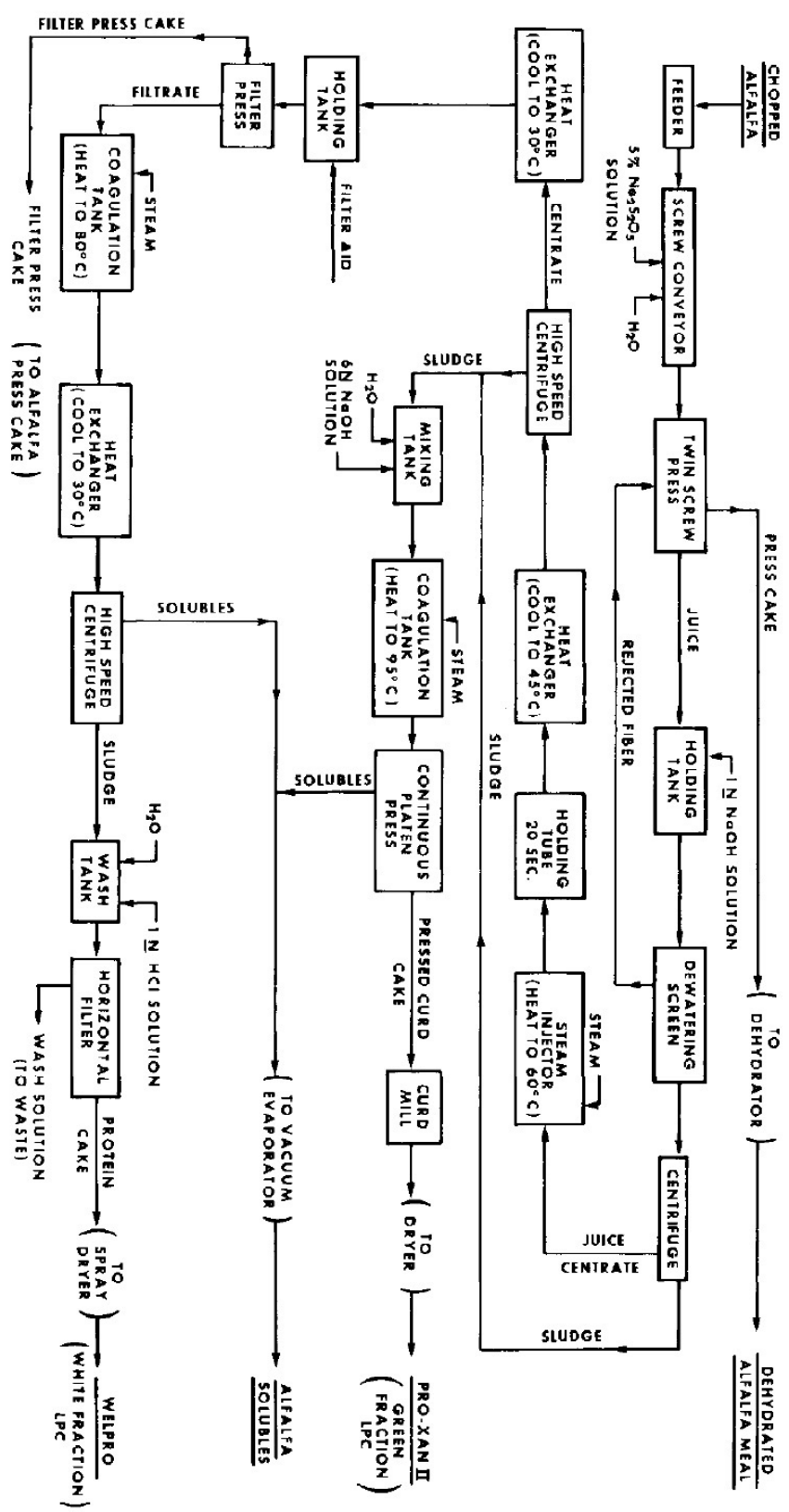


FIGURE I.3 - Diagramme de flux du procédé « Pro-Xan II process » (EDWARDS et al. 1975)

Quelques années plus tard, BICKOFF et al. (1976) ont breveté un procédé en vue d'une industrialisation pour obtenir une fraction concentrée de protéines solubles à partir de jus végétaux issus de plantes diverses, en particulier de la luzerne. L'extraction des jus végétaux était réalisée avec l'addition d'agents réducteurs afin d'éviter les interactions covalentes entre les composés phénoliques présents dans les extraits végétaux et les protéines. Parmi les premiers agents antioxydants identifiés comme pouvant être utilisés, on trouve les bisulfites. Dans ce procédé, la précipitation acide et la microfiltration étaient les principales opérations de purification et de concentration utilisées.

Par la suite, BRAY et HUMPHRIES (1978) ont proposé un procédé similaire dans lequel les traitements thermiques ont été remplacés par un fractionnement par solvants. En effet, la coagulation thermique était utilisée pour séparer les composés pigmentés et le matériel chloroplastique, afin d'obtenir un concentrat de protéines blanches. Le fractionnement par solvants proposé dans ce procédé, présentait l'avantage de ne pas requérir de chaleur, ce qui en plus d'un gain énergétique, permettait d'améliorer la qualité nutritionnelle du produit final obtenu. En effet, d'après les auteurs, des températures élevées pouvaient être la cause d'une dénaturation de la protéine, ainsi que de la perte de ses propriétés fonctionnelles, notamment de sa solubilité. Bien que les quantités de solvants nécessaires pour le fractionnement soient inférieures à celles utilisées dans le procédé d'extraction ou précipitation, il y a deux principaux inconvénients pour ce procédé : les coûts élevés des solvants ainsi que l'impossibilité de leur utilisation dans l'industrie alimentaire.

## **2.2 Cristallisation comme technique de purification, préparation d'une fraction protéique, Fraction I**

Des nouveaux procédés ont été brevetés au début des années 80, dans la recherche d'un produit avec une teneur en protéine plus importante et un degré de pureté plus élevé que ceux obtenus dans les années précédentes, afin d'être utilisé principalement en tant que supplément alimentaire. L'intérêt portait sur l'approfondissement dans la connaissance des procédés permettant l'obtention d'isolats de haute pureté de la Fraction I.

WILDMAN et KWANYUEN (1981) ont focalisé leurs études sur la compréhension des phénomènes de cristallisation de cette fraction, en identifiant des différences structurales liées notamment aux traitements subis par la molécule lors de sa purification. Un procédé visant la purification de la Rubisco à partir de tabac, d'épinard, de raygrass et de luzerne a été breveté (WILDMAN et KWANYUEN 1981). Après une extraction en présence d'un agent réducteur et une étape de séparation par coagulation thermique (50°C), la formation des cristaux concentrés en Rubisco s'effectue grâce au contrôle de la température du milieu pendant plusieurs heures.

Le procédé a par la suite été amélioré en intégrant avant la cristallisation, une étape de précipitation acide ajustée en fonction de l'âge de la plante et une étape finale de dessalement après remise en solution des cristaux (WILDMAN et KWANYUEN 1982). Cependant, ce procédé ne fonctionne qu'à partir de feuilles de tabac. En effet il a été démontré que pour toutes les

autres plantes, à l'exception du tabac, la formation des cristaux n'avait pas lieu dans ces conditions. De plus ce procédé rendait possible la cristallisation de la Rubisco uniquement sur des plantes de tabac âgées de 3 à 4 mois.

D'après les études réalisées par JOHAL (1982) la faible compréhension des phénomènes qui interviennent dans la cristallisation et l'influence de la nature et de la structure de la protéine selon son origine, rendaient cette technique de purification très complexe. L'utilisation d'un agent précipitant s'avérait nécessaire pour améliorer la formation de cristaux ainsi que le rendement de l'opération. Dans ces expériences, en plus du contrôle du pH et de la température (pH basique à 4°C), les extraits subissent une étape de précipitation avec du PEG-6000 et du chlorure de magnésium en quantités voisines de 13%(w/w) mais qui peuvent varier selon le type de plante ou son âge. Il a été prouvé, par exemple, que dans le cas des extraits de luzerne ou de ray-grass, plusieurs ajouts supplémentaires de PEG étaient nécessaires pour déclencher la phase de cristallisation, ceci augmentant la durée de l'opération. Dans un essai d'amélioration du procédé (JOHAL 1983), parmi plusieurs modifications, la cristallisation était suivie d'une étape de post-purification avec une résine échangeuse d'ions en présence d'un ion métallique divalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ).

Malgré leurs efforts pour proposer un procédé basé sur la cristallisation de la Rubisco applicable sur des feuilles provenant de différents types de plantes (avec la même structure L8S8), la possibilité de standardiser cette méthode de purification s'est avérée impossible. En effet les différences entre le comportement de la molécule du tabac et celui des autres espèces, n'ont pas permis d'obtenir des isolats de Rubisco à partir des autres plantes (DE JONG et al. 2015). WILDMAN et KWANYUEN (1982) ont poursuivi leurs recherches sur le phénomène de cristallisation (notamment la forme des cristaux selon les conditions opératoires), mais leurs résultats n'ont pas pu expliquer la non-cristallisation de la Rubisco provenant des autres plantes que le tabac.

### **2.3 Production de concentrats de protéines foliaires à partir de la technique précipitation/coagulation et de l'ultrafiltration**

Pendant la période des années 80 et 90 les procédés qui ont présenté le meilleur rendement pour la récupération de protéines végétales utilisaient des techniques relativement bien connues comme la coagulation/précipitation et la séparation membranaire.

Dans les années 80 la production à échelle industrielle des LCP de la luzerne s'est intensifiée dans différents pays d'Europe comme aux Etats Unis. Afin de développer cette production dans des pays tropicaux où la luzerne n'est pas une culture courante, TELEK (1983) propose une méthode pour obtenir des concentrats de protéines blanches, à différentes échelles, à partir d'une large variété de plantes tropicales. Ce procédé relativement simple se base sur la séparation consécutive des différentes fractions par coagulation thermique. Dans le cas de protéines blanches la fraction liquide est traitée à 64°C puis centrifugée, lavée et séchée. L'étude porte un fort intérêt sur la mise à l'échelle industrielle du procédé ainsi que sur l'évaluation nutritionnelle du produit obtenu et sur l'analyse des coûts en prenant en compte

notamment les aspects énergétiques. L'étude réalisée à l'échelle pilote donne des résultats de rendement de production de LCP très proches du procédé d'obtention de LCP à partir de la luzerne.

Un autre procédé simple de production de LCP issus de la betterave et qui comporte un nombre réduit d'étapes, basé uniquement sur le contrôle du pH (précipitation acide) et la vitesse de centrifugation a été proposé par MERODIO et SABATER (1988). Ce procédé permet de récupérer jusqu'à 50% des protéines blanches disponibles dans les extraits avec des teneurs de 580 g de protéines totales par kilogramme de concentrat, mais il n'a été expérimenté qu'à l'échelle laboratoire.

D'autres procédés de précipitation par traitement thermique ont été testés, toujours dans le but de diminuer les effets de dénaturation de la protéine. HERNANDEZ et al. (1998) ont utilisé comme technique de coagulation la congélation des jus végétaux de luzerne par deux modes différents : une congélation classique à  $-25^{\circ}\text{C}$  et une congélation rapide avec de l'azote liquide. La caractérisation des concentrés obtenus par les deux méthodes montre des différences significatives en termes de teneurs en matière sèche et en protéines, ce qui leur permet d'affirmer que le mode de congélation peut avoir une influence sur la coagulation. Cependant dans les deux cas la composition chimique des concentrés reste très proche de celle des concentrés de protéines foliaires obtenus par coagulation thermique. Ceci permet d'affirmer que du point de vue de la consommation énergétique ce procédé serait plus avantageux que les traitements de coagulation thermique classiques.

KOSCHUH et al. (2004) ont réalisé à l'échelle pilote une étude comparative entre la coagulation thermique et l'ultrafiltration, deux techniques très utilisées dans la production de LCP. L'étude a été effectuée avec des extraits provenant du ray-grass et de la luzerne. L'ultrafiltration des extraits végétaux a été réalisée dans une unité pilote en mode tangentiel, avec des membranes céramiques de  $0,35\text{ m}^2$  de surface et avec deux seuils de coupure testés (15 et 50 kDa). En général, la durée des expériences est de 3 h, après lesquelles les retentas obtenus présentent des concentrations de protéines totales 5 à 12 fois plus élevées par rapport à la teneur initiale dans les extraits non traités. Les produits finaux ont ensuite été analysés par SDS-PAGE afin de vérifier la présence des sous-unités de la Rubisco.

Comme il a été déjà cité précédemment, un des inconvénients de la coagulation thermique est la perte de solubilité des protéines liée à leur dénaturation quand elles sont exposées à des températures élevées, de l'ordre de  $95^{\circ}\text{C}$ .

## 2.4 Procédés de purification par chromatographie d'exclusion stérique SEC

En se basant sur le principe de la séparation par exclusion stérique (SEC) et grâce à sa masse moléculaire élevée (environ 560 kDa) la Rubisco peut être séparée efficacement des autres composés solubles présents dans les extraits végétaux, ces derniers ayant des masses moléculaires plus faibles. Cette technique n'entraînant pas d'interactions entre les différents composés et les supports chromatographiques, les conditions de purification (force ionique, pH, nature de la phase mobile) peuvent être variées pour convenir aux différents types de

milieux (note technique *Size Exclusion Chromatography : Principles and Methods* 2014).

Il est important de signaler que dans le cas de molécules de grande taille (comme la Rubisco), le degré de pureté est directement lié au nombre d'étapes préliminaires appliquées sur les milieux bruts. Les premiers travaux qui utilisent la technique de SEC en tant qu'étape principale de purification, fondaient leurs recherches sur le principe de fractionnement d'extraits végétaux issus de diverses plantes, pour obtenir des produits de différentes qualités riches en protéines et autres nutriments (SARKAR et al. 1975 ; TAN 1982). Une des premières études utilisant l'exclusion moléculaire comme technique de séparation sur des extraits de luzerne, se basait sur le fractionnement des protéines solubles, visant l'obtention de trois fractions différentes (SARKAR et al. 1975). L'extrait de feuilles traité à pH basique et en présence de métabisulfite de sodium, est précipité avec du sulfate de sodium à différentes concentrations, afin de produire les différentes fractions protéiques. La première fraction (Fraction I), obtenue par élution dans une colonne Sepharose 6B, contenait encore d'autres protéines, indiquant un degré de pureté peu élevé. Des résultats très similaires sont obtenus par TAN (1982) en utilisant le même type de gel sur des extraits de feuilles de haricots ailés (*psophocarpus tetragonolobus*).

Dans d'autres études réalisées à partir de différentes espèces de tabac, le gel Sephadex G-25 a été utilisé après clarification et séparation du matériel particulaire afin d'éliminer les composés phénoliques encore présents dans les fractions protéiques (CHAN et al. 1972 ; KUNG 1976). Les limites d'exclusion de la Sephadex G-25, permettent l'élimination des sels et des petites molécules ayant une masse molaire inférieure à 5 kDa. Après plusieurs étapes de précipitation, dissolution et filtration, le produit final correspond à environ 1 mg de fraction I (forme cristalline) provenant d'un gramme de feuilles fraîches de tabac.

Dans une étude comparative KNUCKLES et al. (1982) ont évalué l'efficacité de plusieurs gels (Pharmacia Inc. Et Bio Rad Laboratories) sur la purification d'extraits de luzerne, avant et après concentration par ultrafiltration. Le but était de produire un concentré de protéines, libres de chlorophylle, et séparé des composés non protéiques. Les gels présentant les meilleures performances, à savoir Sephadex G-50 et Bio-Gel P10, avec des limites d'exclusion de 10 et 20 kDa respectivement, ont permis d'obtenir des concentrats avec des teneurs en protéines totales de l'ordre de 82% (w/w) (déterminées par la méthode de Kjeldahl). Cette technique a été utilisée comme une alternative à l'étape de coagulation thermique afin d'améliorer la solubilité des protéines. Cependant, du fait que les volumes de charge sont limités à 35% du volume total de la colonne chromatographique, le rendement du procédé à une échelle plus importante que l'échelle analytique, doit être amélioré en augmentant la teneur en protéine initiale dans les extraits.

De la Rubisco hautement purifiée par exclusion moléculaire a été aussi produite pour des applications telles que la génération d'anticorps et la détermination de ses propriétés catalytiques (GROSS 2003 ; UEMURA et al. 1996). Les exigences pour ce type d'usages ont impliqué l'utilisation de gels avec une résolution plus élevée et de meilleure sélectivité, ce qui en revanche limite considérablement l'échelle de production de la protéine. Il est important aussi de souligner que pour ces applications, les conditions de traitement et de purification doivent prendre en compte la conservation de l'activité enzymatique de la Rubisco.

Bien que la technique de purification par SEC permette d'obtenir des résultats très satisfaisants (pureté de la Rubisco dans le produit final) les procédés présentés précédemment ne s'appliquent qu'à une échelle laboratoire en colonne analytique ou en colonne préparative. Les coûts élevés de médias, ainsi que les quantités limitées des extraits qui peuvent être traitées par cycle de séparation empêchent l'utilisation de cette technique pour des productions à plus grande échelle.

## 2.5 Purification de la Rubisco par chromatographie d'échange d'ions

En plus de ses propriétés nutritionnelles et fonctionnelles, la Rubisco présente un grand intérêt en tant qu'enzyme par son implication dans les différents cycles de la plante, sa capacité de captation du  $\text{CO}_2$  et sa fonctionnalité dans les processus de photosynthèse et de photorespiration.

De nombreuses études ont été dédiées spécifiquement à la compréhension du comportement de la molécule afin d'essayer d'améliorer son activité chez différentes espèces/variétés de plantes. Ces types d'applications impliquent un degré de purification très élevé et la préservation de l'activité biologique de la Rubisco.

Dans cette idée, SALVUCCI et al. (1986) proposent une méthode pour purifier la Rubisco à l'échelle analytique, en combinant la technique d'isolation d'organelles de la plante (chloroplastes) avec la chromatographie en phase liquide rapide de protéine (ou en anglais Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)) par échange d'ions. Cette méthode se présente comme une alternative aux procédés classiques tels que la précipitation en présence de sels ou de solvants, qui en plus d'être très longs, peuvent s'avérer inadaptés pour la conservation de l'activité enzymatique du produit final.

Les auteurs affirment qu'afin d'obtenir un isolat de Rubisco possédant une haute activité spécifique, il est nécessaire de réduire tous les effets qui peuvent provoquer la protéolyse de la molécule. Les étapes d'extraction en présence d'additifs et de séparation des chloroplastes extraits, sont effectuées dans des conditions très douces de température et de vitesse de centrifugation. Le fractionnement des protéines a lieu grâce à un système rapide de chromatographie liquide avec une résine d'échange anionique Mono-Q. Finalement une étape de dessalement est réalisée par chromatographie de gel.

D'autres travaux se sont intéressés à la compréhension des mécanismes ayant un effet sur le comportement enzymatique de la Rubisco, dans diverses espèces de « plantes en C3 ». Ce type de plantes, dont font partie la plupart des végétaux, est caractérisé par un mécanisme de photosynthèse où les molécules qui se synthétisent lors de la première étape du cycle de Calvin, sont des acides organiques à 3 atomes de carbone (acide 3-phosphoglycérique) ou le sel de ces acides (3-phosphoglycérate) selon ZELITCH (1973).

Pour cela, des essais de purification de la Rubisco ont été réalisés sur différentes espèces afin d'évaluer l'activité catalytique de l'enzyme et son facteur de spécificité. Ceci permet une mesure des capacités relatives de la Rubisco pour catalyser la carboxylation et l'oxygénation

du Ribulose 1,5-biphosphate (BOTA et al. 2002; GALMÉS et al. 2005).

Le protocole développé par BOTA et al. (2002) sur des feuilles de vigne (*vitis vinifera*), comporte une étape d'extraction en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol comme agent réducteur, ou optionnellement du Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) en présence de PEG. Après séparation des phases, les protéines sont fractionnées par des précipitations successives avec différentes concentrations de PEG et d'ions magnésium. Les phases solides sont solubilisées dans un tampon ajusté à pH 8 composé principalement de chlorure de magnésium, d'éthylène diamine tétra-Acétique EDTA, d'hydrogénocarbonate de sodium et d'hydrogénophosphate de potassium. Après centrifugation, la fraction contenant la Rubisco alimente une colonne de Q Sepharose FF (1.6 x 80 cm) et l'élution s'effectue avec une solution de chlorure de sodium avec un gradient de concentration de 0 à 0,75 M. La solution de Rubisco est ensuite dessalée dans une colonne de Sepharose G-25.

Bien que les résultats de ce procédé n'aient pas été satisfaisants dans le cas particulier de la vigne, le même protocole a été adapté afin de mesurer l'activité enzymatique de la Rubisco présente dans 24 espèces différentes de plantes (GALMÉS et al. 2005). Le but était de déterminer la relation entre différents facteurs de type génétique.

Des travaux dans le domaine des biotechnologies et de l'ingénierie moléculaire ont été aussi réalisés, dans le but d'améliorer l'assimilation de CO<sub>2</sub> dans les plantes C3. Pour cela des molécules « hybrides » de Rubisco ont été produites, constituées à partir des grandes sous-unités de Rubisco de tournesol et des petites sous-unités provenant de la Rubisco du tabac (SHARWOOD et al. 2008). La molécule est purifiée dans une micro-colonne de Q-sepharose FF (5mL) et les fractions éluées sont concentrées par dialyse. Les fractions collectées sont celles qui présentent les valeurs maximales d'activité enzymatique.

De la Rubisco pure a été isolée à partir de maïs (*Zea mays*) et de miscanthus (*M. giganteus*), afin d'évaluer l'effet de la température sur la teneur en enzyme et sur son activité enzymatique, pendant la croissance de la plante (WANG et al. 2008). Le matériel foliaire est lavé plusieurs fois afin d'éliminer les cellules mésophiles pouvant contaminer l'extrait. L'extraction est réalisée à pH 8 et en présence du PVPP (1.5% w/w) comme agent réducteur. Après séparation des phases, la fraction riche en protéines est précipitée avec une solution de sulfate d'ammonium à 35% et remise en suspension dans une solution tampon à pH 8. La solution est chargée dans une colonne de 30 mL de Q-sepharose FF préalablement équilibrée avec une solution tampon et l'élution est réalisée en présence du même tampon et d'un gradient de chlorure de sodium de 0 à 0,5 M. Les fractions contenant la Rubisco concentrée sont rassemblées et dessalées par séparation membranaire avec Microcon YM-100. La tolérance à faibles températures est ainsi évaluée sur différentes espèces de maïs, en prenant en compte la détermination des propriétés catalytiques comme facteur de mesure.

Plus récemment plusieurs auteurs se sont intéressés à l'amélioration des propriétés catalytiques de l'enzyme in-vivo sur diverses variétés de plantes (CARMO-SILVA et SALVUCCI 2011; SUAREZ et al. 2011). Le but est d'évaluer les propriétés de la molécule isolée pour introduire ainsi des modifications qui permettront d'influencer son activité dans la plante. Un protocole pour isoler la Rubisco à partir des extraits de diverses plantes est proposé par CARMO-SILVA

et SALVUCCI (2011). Après extraction en présence de PVPP à pH 7,6 et une précipitation avec du sulfate d'ammonium à 57% la fraction protéique contenant la Rubisco est remise en solution. La purification de la molécule est réalisée sur plusieurs étapes comprenant une première étape de séparation par centrifugation zonale en raison d'un gradient de saccharose allant de 0,2 à 0,8 M (migration par densité). Dans une deuxième étape de purification, la solution est alimentée dans une colonne Hi-trap Q sepharose de 10-15 mL, et la Rubisco est éluée par une solution de chlorure de potassium avec un gradient de concentration. La fraction contenant la Rubisco purifiée est obtenue avec une concentration de KCl de 0,35 M. Finalement la Rubisco est précipitée en présence de sulfate de sodium à 60%, centrifugée et stockée sous forme de perles gelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'évolution de la purification de la Rubisco est suivie par SDS-PAGE.

Compte tenu de la large utilisation du support Q sepharose dans la purification de la Rubisco pour ces types d'applications, la chromatographie d'échange d'ions, couplée avec d'autres traitements, apparaît comme une technologie appropriée, notamment quand il s'agit de conserver les différentes propriétés de la protéine.

SUAREZ et al. (2011) ont focalisé leur travaux sur le développement d'un outil à petite échelle permettant la purification de la Rubisco, dans le but d'en étudier sa structure et ses processus régulateurs, et d'améliorer ainsi la performance catalytique de l'enzyme. Ils se sont intéressés, entre autres aspects, à l'influence que peut avoir l'utilisation de techniques classiques comme les étapes de pré-purification. Pour cela une méthode automatisée de purification par échange d'anions à haut débit est proposée, permettant de suivre la teneur de la Rubisco en temps réel. Grâce à une configuration de flux multi-seringues, le système permet aussi de vérifier l'efficacité de la méthode (purification, récupération) en fonction du traitement préliminaire employé. Parmi les différentes possibilités, les techniques comparées dans cette étude sont le fractionnement par ajout de sulfate d'ammonium, la précipitation avec du PEG et la centrifugation zonale avec un gradient de saccharose. L'étape finale de purification a lieu dans une micro-colonne de Q-Sepharose FF en présence d'un tampon à pH 8 contenant du chlorure de magnésium, de l'hydrogénocarbonate de sodium et de l'hydrogénophosphate de potassium afin de maintenir l'activation de la Rubisco et de l'EDTA pour réduire l'activité des protéases. La figure I.4 représente un schéma global du procédé (SUAREZ et al. 2011).

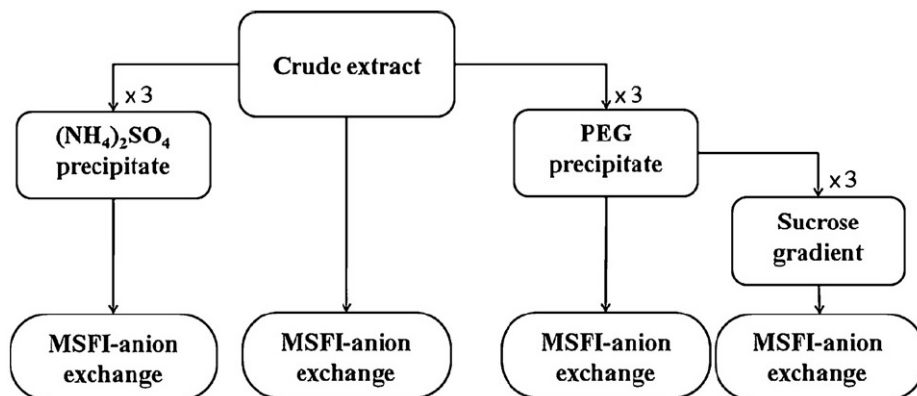


FIGURE I.4 – Diagramme du procédé de purification de la Rubisco par 3 techniques différentes (SUAREZ et al. 2011)



Selon les auteurs, des recherches faites préalablement avaient permis d'évaluer le rôle du support chromatographique et de cette manière de justifier le choix des résines du type Q-Sepharose. Ces travaux démontrent que la nature de la matrice du support peut avoir une influence sur les conditions hydrodynamiques lors de l'échange d'ions. Il a été trouvé, par exemple, que les matrices hydrophobes telles que le poly-styrene divinylbenzene (PS-DVB) présentaient, dans le cas de la Rubisco, un coefficient de partage faible comme conséquence d'une cinétique lente de transfert entre la protéine (présente dans un milieu aqueux) et le support. En revanche, les supports à base de polysaccharides réticulés, tels que l'agarose se sont révélés très performants, ce qui s'observe avec l'obtention des pics d'élution plus étroits quand les conditions de force ioniques sont satisfaites.

Les rendements de purification obtenus avec les différentes méthodes de pré-purification appliquées avant l'étape chromatographique se trouvent dans une gamme de 72 à 96%, dont le meilleur résultat correspond au traitement effectué par précipitation avec du PEG suivi d'un gradient de saccharose. Toutefois, la méthode a donné un faible taux de récupération de la protéine (20%), et la durée du traitement est très longue.

Comme évoqué précédemment, MARTIN et al. (2014) se sont intéressés au fort potentiel de la Rubisco en tant qu'ingrédient fonctionnel, particulièrement à sa capacité gélifiante comparée à celle d'autres protéines. Pour cela, de la Rubisco dans sa forme native a été extraite et purifiée à l'échelle laboratoire à partir de feuilles d'épinard, pour ensuite être utilisée dans la préparation et la caractérisation de gels.

Les auteurs soulignent l'importance d'avoir une méthode de purification de la protéine qui permette l'élimination totale des composés indésirables (polyphénols, chlorophylle) et en même temps l'application de conditions douces qui préservent la fonctionnalité de la Rubisco purifiée. La méthode qui a été développée inclut principalement deux étapes chromatographiques : la Chromatographie d'échange d'ions (CEI) et la SEC.

La plante est pressée avec un extrudeur pour produire un jus qui est ensuite mélangé avec du PVPP et 0,1%(w/v) de métabisulfite de sodium et stocké à 4°C. Afin d'éliminer la chlorophylle le jus est chauffé à 50°C pendant 30 minutes et ensuite refroidi à 4°C. Le précipitât formé est séparé par centrifugation et la phase liquide (appelée « jus clair ») est filtrée à 0,45 µm. Juste avant la charge dans la colonne échangeuse d'ions le jus est dilué avec de l'eau ultra pure afin de réduire sa conductivité à 6,5 mS/cm. Pour la chromatographie d'échange d'ions, la résine utilisée est la Q Sepharose FF paquée dans un lit de colonne de 1,4 L et équilibré avec une solution tampon Tris/HCl 20 mM à pH 8. Après élution, la solution contenant la Rubisco est dessalée dans une colonne Sephadex G75 et la fraction produite contient 12,4 g/L de protéine. Pour les tests de gélation la solution est concentrée par diafiltration/ultrafiltration avec une membrane de 3 kDa.

Le rendement final de récupération de la Rubisco est de 10 g/kg de plante, avec une pureté estimée à 95%. L'absence de signal d'absorbance à 340 nm indique la non-présence de polyphénols dans le produit final.

Dans la même étude d'autres protéines végétales telles que celles des petits pois séchés, du

lupin (*lupinus angustifolius*) et du soja ont été aussi extraites afin de comparer leurs propriétés avec celle de la Rubisco.

## 2.6 Dernières études : propositions à l'échelle industrielle

Depuis les années 2000, plusieurs brevets ont encore été publiés, présentant des approches différentes et dans l'objectif d'obtenir des produits avec des propriétés et qualités distinctes. Parmi eux, les procédés décrits par la suite sont assez représentatifs des méthodologies et techniques utilisées jusqu'à aujourd'hui.

### 2.6.1 Procédé VIRIDIS (Levesque et Rambourg 2002)

La figure I.5 représente un schéma global du procédé et permet de distinguer les trois voies de la valorisation de l'invention.

Le but de ce procédé est la récupération des produits ayant un fort intérêt dans l'alimentation humaine. L'avantage principal des différentes méthodes utilisées relève de la possibilité d'obtenir plusieurs fractions pouvant être valorisées, à partir de la matière foliaire traitée.

Les principales fractions sont :

1. une crème protéique purifiée atomisée ;
2. un concentrat riche en protéines insolubles, vitamines et oligo-éléments ;
3. un extrait de composés phénoliques.

Après pressage de la plante le jus végétal est récupéré et traité pour produire d'une part un jus brun et d'autre part une fraction riche en insolubles.

Le jus brun récupéré, très riche en protéines cytoplasmiques mais aussi en polyphénols, est fractionné grâce à une résine absorbante (deuxième mode de purification décrit dans le brevet). L'utilisation de cette résine permet de retenir les composés phénoliques produisant un jus brun décoloré. Il représente la fraction de principal intérêt car elle contient les protéines cytoplasmiques dont la Rubisco. Cette fraction est traitée par précipitation acide en présence d'un acide fort tel que l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique ou l'acide phosphorique, afin de rendre la Rubisco insoluble. Le traitement de ce précipitât consiste principalement en une succession d'étapes de concentration afin de produire une crème protéique brute avec des faibles teneurs en eau, pour ensuite passer à une dernière phase de purification par microfiltration dont le but est d'éliminer les impuretés solubles et de produire une crème protéique purifiée. Le produit final est pasteurisé et séché par atomisation.

La fraction d'insolubles obtenue lors du pressage de la plante est composée d'autres protéines (protéines « vertes »), de vitamines, de pigments et d'oligoéléments. Afin de valoriser ces coproduits cette fraction est traitée pour éliminer les composés solubles encore présents, puis elle est séparée par décantation et la phase solide est séchée en lit fluidisé.

Le procédé cherche également à valoriser d'autres coproduits en particulier les polyphénols

retenus dans la résine. Pour cela, la solution de polyphénols est éluée et concentrée grâce à une étape d'évaporation sous vide, suivie d'un séchage par atomisation.

La qualité du produit final est évaluée principalement en fonction de sa composition en acides-aminés. En effet, l'objectif étant d'obtenir une fraction protéique, la teneur en acides-aminés essentiels est comparée à celle d'autres produits très utilisés dans l'industrie alimentaire comme le soja et la caséine. De plus, le brevet met en évidence le fort potentiel de la Rubisco dans l'industrie alimentaire, grâce à ses propriétés fonctionnelles telles que ses capacités émulsifiante et moussante.

## 2.6.2 Procédé NIZO (Van De Velde et al. 2011b)

Un diagramme complet du procédé est schématisé dans la figure I.6.

Ce procédé se présente comme une alternative aux procédés déjà existants qui utilisent des techniques conventionnelles telles que la précipitation acide ou avec des solvants, afin de séparer la fraction protéique contenant la Rubisco, des autres composés non désirés. Selon les auteurs, les principaux inconvénients de ces méthodes sont d'une part la non-élimination totale de la chlorophylle qui donne des propriétés organoleptiques indésirables au produit final et d'autre part la nécessité de remettre en suspension les précipitats de protéines, ce qui conduit à une perte de solubilité ou à la formation des agrégats.

L'objectif principal de leur invention est de produire un isolat hautement purifié de protéines blanches avec une élimination totale de la chlorophylle à partir des plantes comme l'épinard, la betterave ou les feuilles de carottes. Selon les auteurs, pour atteindre cet objectif, entre 40 et 80% de matière sèche de la plante doit provenir des feuilles et de ce pourcentage environ 20% doit être de la Rubisco.

Les premières phases du procédé consistent en une extraction en présence d'une solution tampon afin de maintenir le pH de l'extrait entre une valeur de 6,8 et 8,5, pour ensuite procéder à une étape de traitement thermique réalisé entre 50 et 80°C, durant une période relativement courte (maximum 30 min) afin de faciliter la coagulation d'autres protéines différentes de la Rubisco. Il est signalé que pendant cette période, le pH de la solution doit être maintenu à une valeur supérieure à celle du pI de la Rubisco, afin d'éviter sa précipitation. Dans le cas de l'extrait d'épinard le pH est maintenu à une valeur supérieure à 5.

Afin d'éliminer la chlorophylle et d'autres pigments de type caroténoïdes, les auteurs proposent (comme une alternative aux techniques de précipitation acide ou avec des solvants) une étape d'absorption en employant comme support le charbon actif. Le rôle du charbon actif est d'absorber les pigments présents dans le jus, principalement la chlorophylle.

Dans ce but les auteurs signalent que l'utilisation de charbon actif peut s'avérer très convenable grâce à une grande surface spécifique (supérieure à 500 m<sup>2</sup>/g). En plus de la surface du matériel, d'autres propriétés telles que la distribution de sa porosité (mésopores et micropores) et sa capacité d'absorption, sont aussi mesurées. Selon le procédé le charbon est ajouté au jus dans une concentration de 0,01% à 15% (w/w).

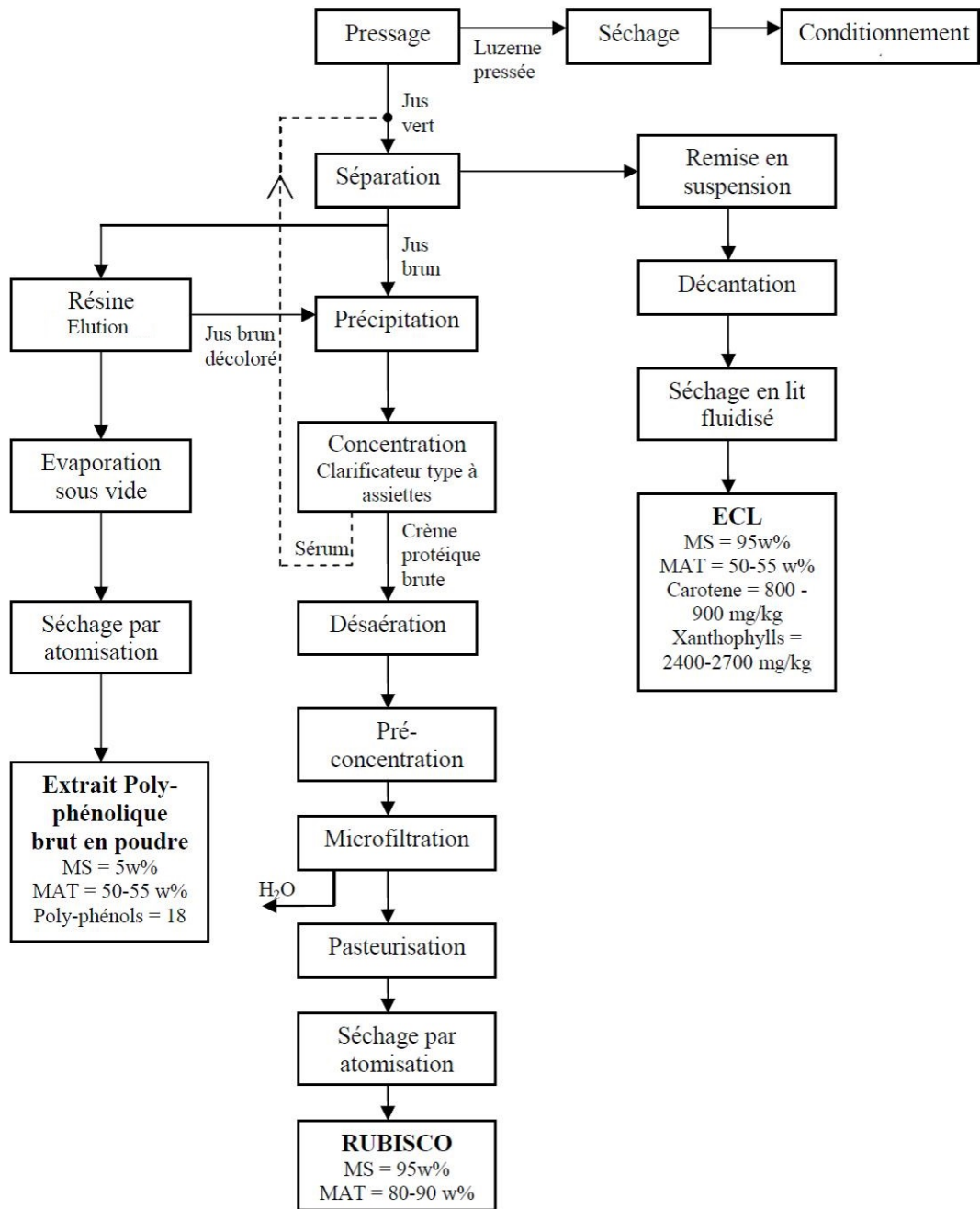


FIGURE I.5 – Schéma du procédé industriel de production de Rubisco à partir de jus de luzerne, élaboré à partir du brevet de LEVESQUE et RAMBOURG (2002)

Pour évaluer les résultats du procédé, les auteurs ont estimé que le rapport entre la teneur en chlorophylle et celle en Rubisco dans le produit final, pourrait être 400 fois plus faible que le même rapport déterminé dans le jus de départ.

A l'issue de ce procédé le produit final présente entre 85 et 94% de teneur en matière sèche. La teneur en Rubisco est comprise entre 60% et 70%; toutefois 30% à 90% de la Rubisco obtenue correspondrait à la protéine non-dénaturée. En moyenne, 40% de la composition du solide correspond à d'autres protéines.

Les inventeurs indiquent que pour un fonctionnement du procédé à grande échelle il serait envisageable, en mode Batch, de traiter jusqu'à 1000 kg de plante par cycle, et en mode continu, jusqu'à 200 kilogrammes de plante par heure.

### **2.6.3 Procédé VALAGRO (Piccirilli 2012)**

Dans la même optique que les travaux précédents, la société Valagro Carbone Renouvelable a déposé en 2012 un brevet présenté comme une alternative aux procédés de production de concentrats protéiques conventionnels. Le but est d'obtenir un extrait de protéines à partir de la luzerne, destiné principalement à l'alimentation animale, avec des teneurs moindres en composés antinutritionnels et en pigments et avec une réduction de la consommation énergétique de production. Le procédé a également pour objectif la séparation de composés autres que les protéines, présents dans la plante et qui représentent d'autres voies de valorisation. Le schéma présenté dans la figure I.7 montre un résumé de toutes les étapes du brevet en incluant les différentes voies de valorisation des coproduits.

Parmi les différentes phases qui constituent la méthode de purification, deux étapes sont considérées comme l'apport principal de l'invention : une première étape appelée « défilage » du matériel foliaire qui selon l'auteur, favorise l'accessibilité aux composés tels que les protéines, et une deuxième étape d'hydrolyse enzymatique permettant simultanément l'élimination de différentes substances comme les celluloses et la chlorophylle.

L'étape de défilage est réalisée à l'aide d'une extrudeuse, afin de préparer la matière première pour une meilleure action des enzymes, qui interviendront dans l'étape suivante. D'après l'auteur cette opération permettrait d'obtenir des extraits avec des teneurs élevées en protéines et en autres coproduits qui pourraient être valorisés.

Une autre variante proposée dans le procédé réside principalement dans l'utilisation des enzymes du type protéase durant l'étape de l'hydrolyse enzymatique. De ce fait, le produit final provenant de la fraction protéique, après les différentes phases de fractionnement et de séparation, serait constitué d'un concentrat de macropéptides, dont la masse moléculaire irait de 1 à 25 kDa.

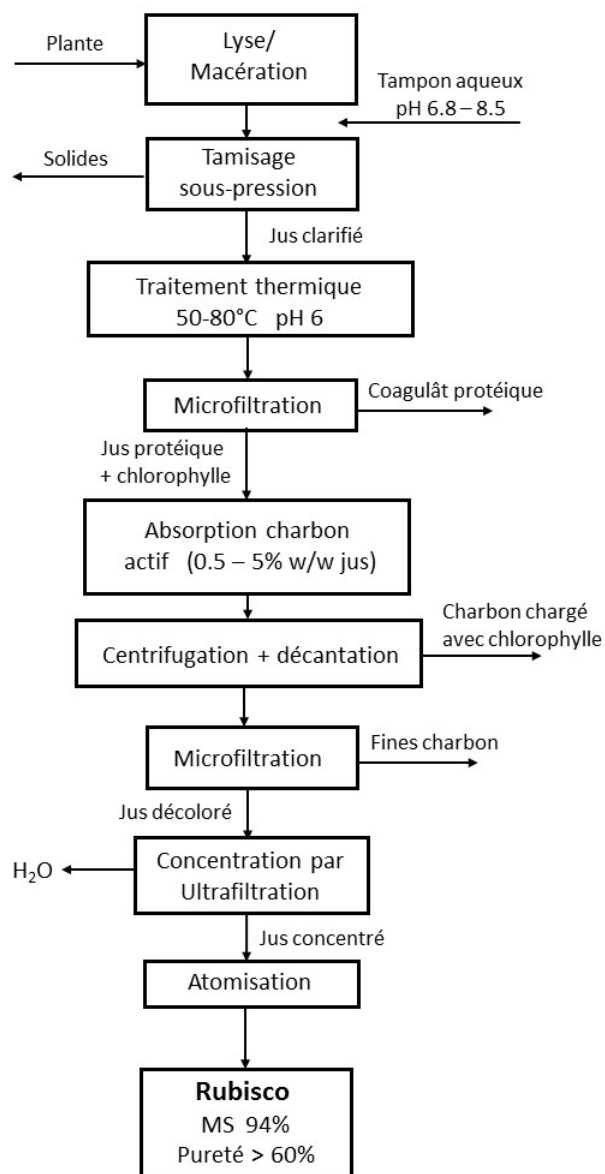


FIGURE I.6 – Schéma du procédé de production d'un isolat de Rubisco à partir de feuilles d'épinards basé sur le brevet de VAN DE VELDE et al. (2011b)

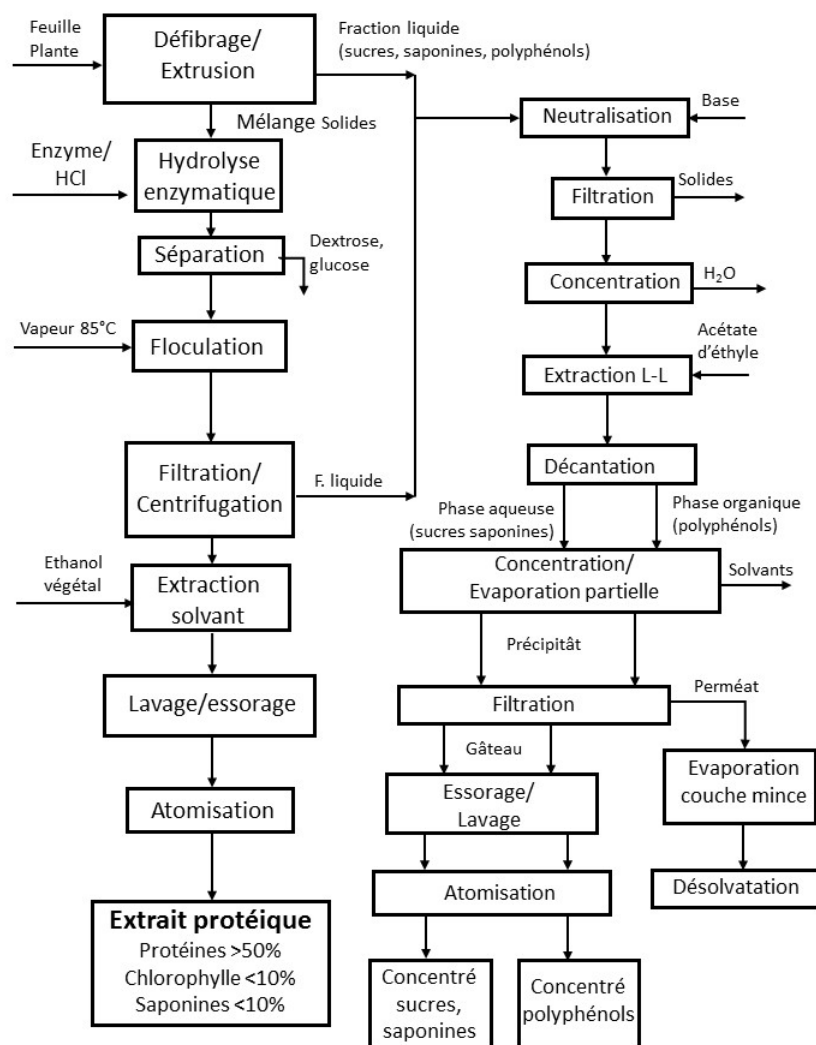


FIGURE I.7 – Schéma du procédé d’obtention d’un extrait protéique de luzerne et d’autres coproduits basé sur le brevet PICCIRILLI (2012)

#### 2.6.4 Procédé TNO (De Jong et al. 2015)

Un travail plus récent mené par la société néerlandaise TNO a fait l'objet d'un dépôt de brevet publié en 2015. Dans ce brevet, les auteurs y expriment la non-existence, au moment de leurs travaux, d'une méthode de production de la Rubisco applicable à une échelle industrielle qui puisse être à la fois rentable d'un point de vue économique et applicable à une large variété de plantes.

Le but de leur procédé est donc de produire, à une échelle industrielle, un isolat de Rubisco qui respecte une composition souhaitable pour des applications alimentaires, et qui en même temps garde ses propriétés fonctionnelles après toutes les étapes de purification. Pour cela, une des caractéristiques du procédé est la conservation de la protéine en solution, durant toutes les étapes de sa purification, jusqu'au séchage. Bien que le préambule du procédé ne précise pas l'origine de la matière première, la description de la méthode et les conditions opératoires ont été adaptées aux spécificités des feuilles de betterave.

La figure I.8 montre un schéma global du procédé avec 4 possibilités de successions d'étapes.

La production du jus végétal à partir des feuilles est réalisée dans une presse ou homogénéisateur à vis, en présence d'une solution tampon ajustée à pH 6 avec de l'hydrogénophosphate de sodium et contenant entre autres, un agent réducteur tel que le métabisulfite de sodium. Parmi les différentes spécificités de cette étape d'extraction, les auteurs signalent l'importance d'utiliser des quantités limitées d'agent antioxydant, d'une part pour faciliter son élimination lors des étapes postérieures et d'autre part pour améliorer l'efficacité de l'ion divalent qui interviendra plus tard, durant l'étape de floculation.

Par la suite, le jus subit une étape de précipitation à 50°C qui permet principalement l'élimination de membranes chloroplastiques riches en chlorophylle. Parmi les détails du procédé, dans les antécédents du brevet il est signalé qu'un des principaux inconvénients des méthodes déjà existantes est l'utilisation de conditions extrêmes de température, de pH ou de pression. De ce fait, il est précisé l'importance de réaliser cette étape pendant une période de courte durée (environ 20 min) et de la faire suivre par une étape de refroidissement rapide.

Selon les différentes voies que propose le procédé, l'étape de traitement thermique pourrait être complétée (figure I.8, voie 1) ou remplacée (figure I.8, voie 2) par une étape de floculation du jus en présence d'un sel formé d'un ion divalent tel que le chlorure de calcium ou le nitrate de calcium. Toutefois, dans la description du procédé, il est conseillé de réaliser ces deux étapes de manière consécutive, permettant ainsi une élimination des membranes chloroplastiques plus performante. Dans les deux cas, une fois que la formation du précipitât ou des précipitâts/flocs des membranes et chlorophylle a eu lieu, les deux phases solide et liquide sont séparées par une étape de décantation/centrifugation. Ceci afin de récupérer une fraction liquide composée principalement des protéines et des polyphénols de différentes tailles, et qui sera par la suite traitée afin d'éliminer les composés indésirables.

La première étape d'élimination de ces composés est une séparation par microfiltration.



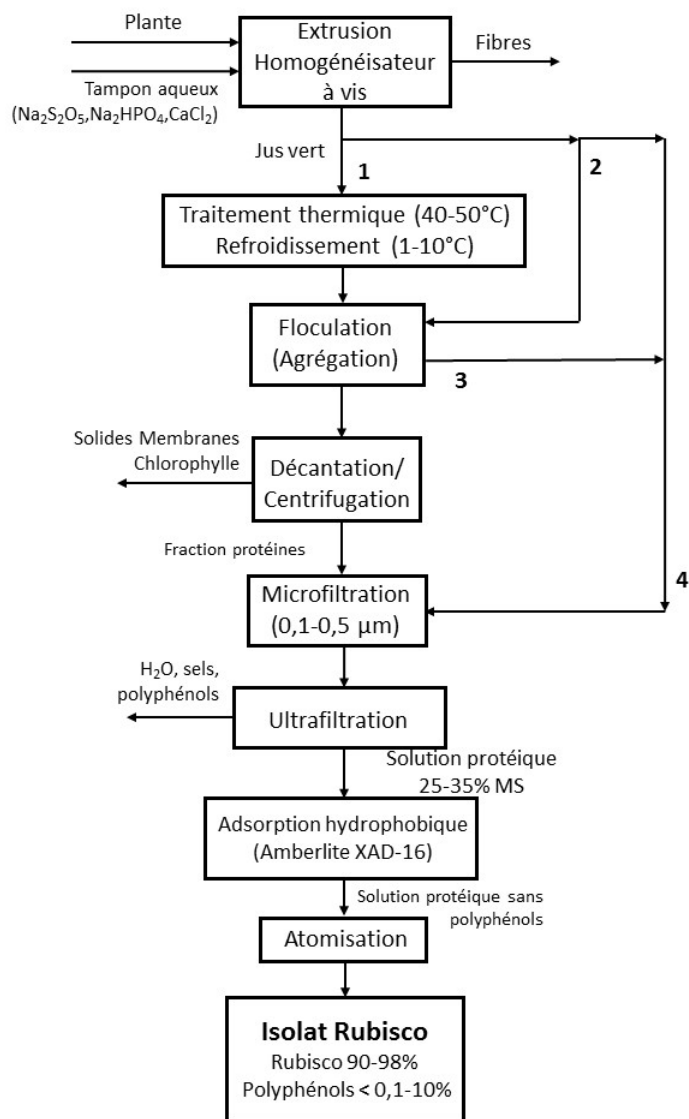


FIGURE I.8 – Schéma du procédé de production de la Rubisco à partir de feuilles de betterave basé sur le brevet de DE JONG et al. (2015)

Celle-ci est préconisée soit pour finir la séparation des membranes et des solides encore présents, formés lors de la précipitation (thermique et/ou par action de l'ion divalent, figure I.8 voies 1, 2 et 3), soit pour remplacer entièrement l'étape de séparation par décantation/centrifugation (voir figure I.8, voie 4). Les auteurs signalent que la microfiltration est aussi importante car elle permet de réduire le phénomène de colmatage lors de l'étape d'ultrafiltration.

La fraction qui est récupérée en sortie de l'unité de microfiltration devrait présenter de très faibles teneurs en chlorophylle et débris cellulaires (résidus de membranes); en revanche elle est très riche en composés solubles tels que les sels et notamment les polyphénols. L'élimination de ces composés est effectuée tout d'abord par une étape d'ultrafiltration.

D'après les auteurs le développement du procédé doit permettre de diminuer le temps total des opérations : idéalement le temps nécessaire pour arriver à cette étape d'ultrafiltration doit être de courte durée (2h). Ceci afin d'éviter de prolonger le contact entre les protéines et les composés phénoliques. Selon les estimations du procédé l'ultrafiltration permettrait de réduire de 25 à 75% la concentration initiale des polyphénols, et en même temps l'élimination d'additifs de petite taille comme le métabisulfite de sodium et les autres sels. Les membranes utilisées pendant cette phase peuvent avoir un seuil de coupure entre 20 et 50 kDa, cependant il est signalé que pour faciliter l'élimination de polyphénols de plus grande taille, l'utilisation de membranes de 100 kDa est recommandée. Les autres objectifs de cette étape sont de réduire la teneur en eau de la solution afin d'obtenir une fraction concentrée avec une teneur en protéines allant de 25 à 50%, ainsi que de faciliter le transport de la fraction protéique jusqu'aux installations de l'étape suivante.

À ce stade les composés phénoliques n'étant éliminés que partiellement, le procédé nécessite une autre étape de post-purification pour permettre l'élimination de la chlorophylle résiduelle et d'autres substances qui peuvent occasionner une odeur ou un goût indésirable. Pour cela, l'adsorption hydrophobe en colonne a été choisie comme technique finale de purification, étant donné que l'opération pourrait être réalisée dans un seul cycle de séparation : lors du passage de la solution à travers la colonne, les polyphénols et les autres composés différents de la Rubisco, seront plus ou moins retenus sur la résine en fonction de leur hydrophobicité, laissant passer une solution riche en protéine et en composés non-hydrophobes.

De manière générale, le type de matériel décrit dans le brevet correspond à des résines réticulées polymériques non-ionique, aromatique ou aliphatique. Une large gamme de produits est suggérée, exposant différents matériels adaptés pour ce type d'application; parmi eux la résine Amberlite XAD-16 est présentée comme celle qui permet d'avoir les meilleurs résultats. Il est aussi suggéré que des valeurs de pH de 6 à 8 pourraient permettre la rétention de deux tiers de la quantité des polyphénols présents encore dans la solution, ce qui donnerait idéalement une réduction totale comprise entre 95 et 98% par rapport à la teneur initiale dans le jus. La réduction de la teneur en polyphénols est déterminée par la comparaison des spectres obtenus à 280 nm, avant et après cette étape. Il est supposé que cette étape permettrait de réduire aussi la coloration de la solution, étant donné que parmi les différents composés éliminés, se trouvent les polyphénols donnant une coloration rouge et marron.

Selon les auteurs, un autre phénomène qui intervient dans la non-rétention de la Rubisco dans la colonne est l'exclusion stérique, liée à une taille de pores de la résine de l'ordre de 250 kDa, plus petite que la molécule de Rubisco. De ce fait certains polyphénols peuvent aussi être retenus dans la résine en raison de leur petite taille, bien que leur adsorption par des liaisons hydrophobes soit plutôt faible. Par conséquent, l'élution des polyphénols non adsorbés peut avoir lieu juste après la récupération des fractions contenant la Rubisco. La régénération de la résine est effectuée avec une solution alcoolique (50%) ce qui permettrait d'éluer les composés les plus hydrophobes.

La dernière étape du procédé est un séchage par atomisation. La lyophilisation est aussi considérée comme une technique alternative. A la fin de cette étape le solide récupéré est censé présenter une teneur en matière sèche de 80 à 95% et une teneur en protéine de l'ordre de 90%.

Le suivi du procédé est réalisé par l'analyse des fractions récupérées tout au long des différentes étapes de purification de la protéine. Les méthodes utilisées sont tout d'abord une analyse par chromatographie d'exclusion moléculaire avec une colonne Superdex 200 et détection à 280 nm et une deuxième analyse par spectrophotométrie en UV/visible. Les chromatogrammes des fractions présentées et comparées correspondent d'une part à des échantillons des jus végétaux produits après pressage et après microfiltration et d'autre part à 3 fractions récupérées à la sortie de la colonne d'adsorption hydrophobe, appelées « Fraction 4 » (voir figure I.9-A), « Fraction 9 » (voir figure I.9-B) et « Fraction 25 » (voir figure I.9-C). La « Fraction 4 » correspond à une fraction représentative de l'élution de la Rubisco, dont le pic est associé à un volume de sortie de 12.5 ml et les « Fractions 9 » et « Fraction 25 » correspondent à 2 moments différents d'élution des polyphénols.

La figure I.10 montre deux profils obtenus avec des jus produits à deux moments différents du procédé (figure I.10-A jus après pressage et figure I.10-B jus après microfiltration). Une comparaison des deux profils met en évidence la possibilité que les étapes qui suivent le pressage (principalement l'étape de traitement thermique) aient un impact considérable sur la teneur en Rubisco. En effet selon la détermination de la surface du pic de la Rubisco pour les deux profils, une réduction d'environ 48% est estimée en comparant l'aire de pic après microfiltration avec celle du jus de départ. Bien que les conditions de température et le temps de réchauffement aient été contrôlés, ce traitement peut occasionner une dénaturation et une précipitation de la Rubisco.

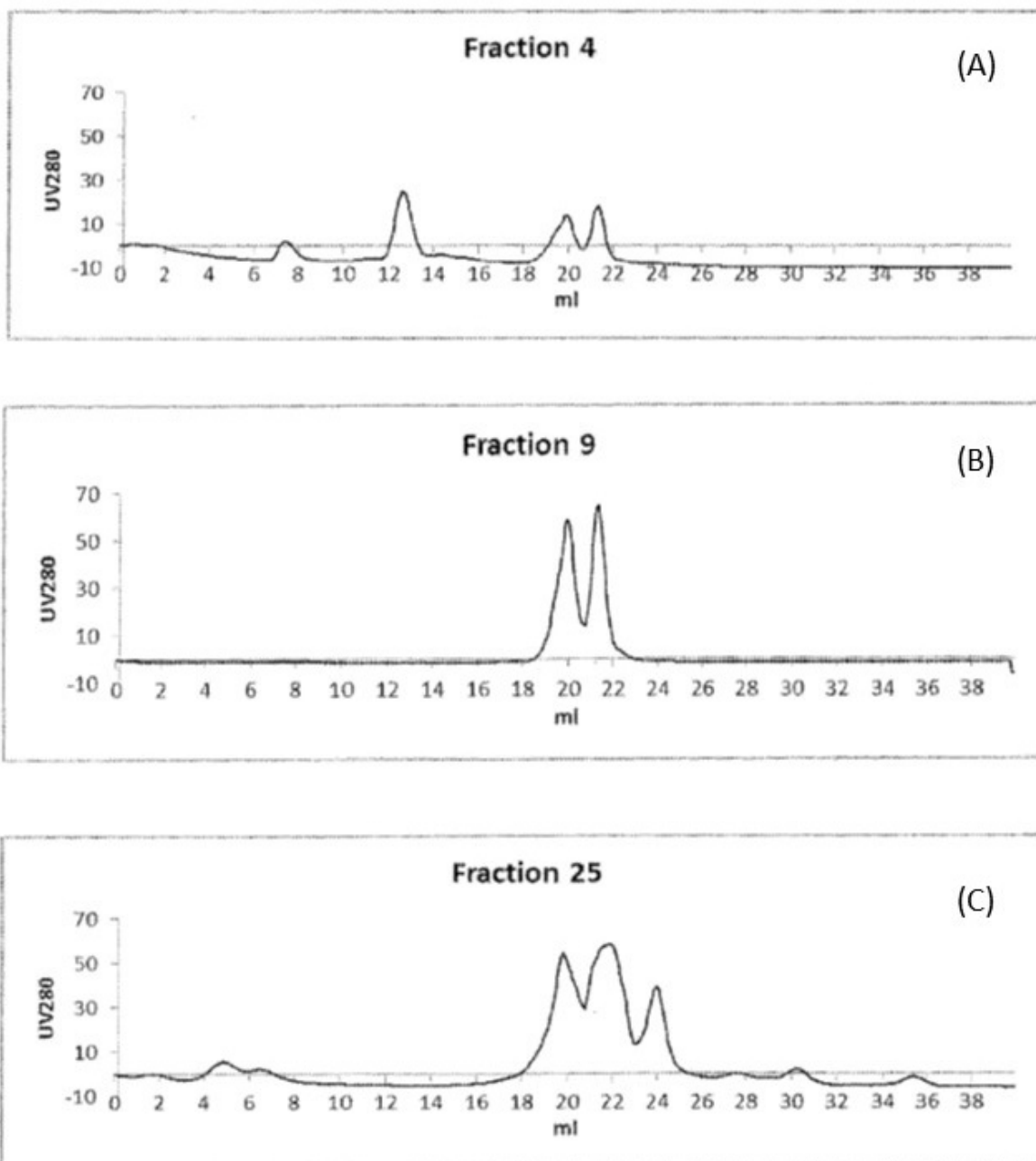


FIGURE I.9 – Profils chromatographiques des 3 fractions après élution de la résine durant la phase d’adsorption hydrophobe. (A) Fraction 4 avec un pic de Rubisco à 12,5 ml. (B) Fraction 9 contenant des polyphénols peu retenus par la résine. (C) Fraction 25 contenant les polyphénols les plus retenus par la résine et d’autres composés de plus petite taille. Source : DE JONG et al. (2015)

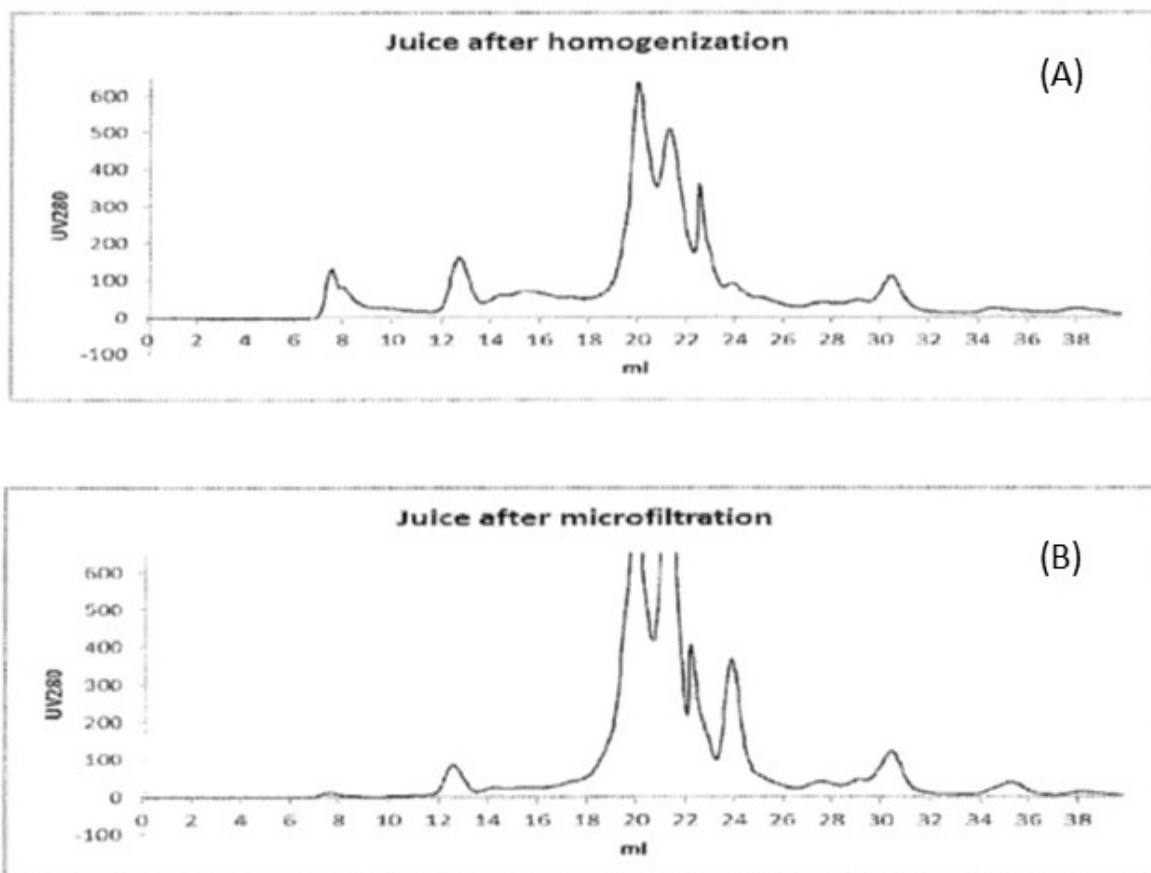


FIGURE I.10 – Profils chromatographiques des deux jus végétaux obtenus par chromatographie d'exclusion (Superdex 200). (A) Jus obtenu à la sortie de l'homogénéisateur à vis. (B) Jus obtenu à la sortie de l'unité de microfiltration. Pic de Rubisco élué à 12,5 ml. Source : DE JONG et al. (2015)

### 3 Conclusion du chapitre

La Rubisco représente la principale fraction protéique de la biomasse verte. Composé essentiel pour la fonction photosynthétique, à double fonction enzymatique carboxylase et oxydase, ce sont finalement ses propriétés nutritionnelles et fonctionnelles qui réveillent l'intérêt scientifique pour sa production industrielle depuis de nombreuses années.

Considérée comme une protéine de référence pour son caractère faiblement allergène, et dans un contexte de remplacement progressif des ressources non-renouvelables et de bioéconomie, la valorisation des protéines comme la Rubisco, paraît importante pour le développement de certaines filières agricoles. En effet, elle pourrait atteindre une valeur ajoutée relativement élevée dans certains secteurs d'activité comme la cosmétique, l'agroalimentaire voire la pharmacie.

Malgré cela, il n'y a pas à ce jour de procédé industriel permettant de la produire et cela pour différentes raisons :

- une teneur globale faible dans la plante, et fortement variable selon les espèces ;
- une complexité relativement importante de la plupart des procédés proposés ;
- une stabilité encore mal connue ;
- une difficulté à maîtriser la ressource dans le temps.

La possibilité de contourner ces difficultés, et la disponibilité de procédés robustes, réduits en nombre d'étapes, devraient permettre des avancées majeures pour répondre à ces enjeux.



# Matières premières et caractérisation des jus végétaux

---

## Sommaire

1	Introduction . . . . .	<b>43</b>
2	Matières premières . . . . .	<b>44</b>
2.1	La luzerne, matière première de référence . . . . .	45
2.2	Autres sources végétales . . . . .	48
2.3	Évolution de la teneur en Rubisco lors du cycle végétal . . . . .	48
2.4	Prétraitement de la plante . . . . .	50
3	Production des jus végétaux . . . . .	<b>51</b>
3.1	Technologies de production des jus végétaux . . . . .	52
3.2	Principaux facteurs externes au procédé . . . . .	55
3.3	Conditions opératoires utilisées . . . . .	56
4	Dosage de la Rubisco . . . . .	<b>62</b>
4.1	Introduction . . . . .	62
4.2	Purification de Rubisco par Chromatographie préparative d'exclusion de taille . . . . .	65
4.3	Dosage de la Rubisco par HPLC-SEC . . . . .	67
4.4	Dosage de la Rubisco par BLI . . . . .	78
4.5	Conclusion . . . . .	88
5	Caractérisation et conservation des jus végétaux . . . . .	<b>89</b>
5.1	Introduction . . . . .	89
5.2	Caractérisation physico-chimique des jus . . . . .	90
5.3	Conservation des jus . . . . .	97
5.4	Conclusion . . . . .	112
6	Conclusion du chapitre . . . . .	<b>113</b>

---

## 1 Introduction

La mise en place de nouvelles filières de production de protéines végétales est confrontée aux contraintes naturelles des matières premières utilisées notamment la disponibilité et la variation saisonnière. Ainsi, un des objectifs de cette étude est d'identifier des sources végétales



alternatives à celle identifiée initialement (à savoir la luzerne) et de vérifier la faisabilité du procédé de production de Rubisco étudié. Cela pourrait permettre, par exemple, d'assurer un approvisionnement plus régulier ou moins saisonnier, et de rendre le procédé plus indépendant de facteurs intrinsèques à une seule culture.

Dans ce chapitre quatre points principaux seront abordés : (1) la sélection des matières premières alternatives à la luzerne, (2) la production de jus végétaux à partir de différentes matières premières, (3) le dosage de la Rubisco, afin de déterminer leur teneur dans les différents milieux complexes auxquels nous serons confrontés durant l'étude, et (4) la caractérisation des jus produits, ainsi que leur conservation. Cela permettra de définir une stratégie de sélection et de traitement des matières premières pour leur utilisation dans le procédé.

Dans la première partie de ce chapitre, les matières premières sont sélectionnées et une analyse bibliographique sommaire de leurs principales caractéristiques est présentée. La production des jus végétaux et les rendements obtenus pour les différentes matières sont alors présentés et discutés. Le volume de jus produit par rapport à la masse de plante alimenté et des considérations qualitatives sur le déroulement de l'extraction sont considérés seuls dans un premier temps, mais cela permettra de valider la technologie et d'identifier les principales difficultés d'opération.

Afin de comparer les extraits végétaux produits, des méthodes analytiques ont dû être mises en place ou adaptées puis validées. Les techniques analytiques utilisées, leur application aux différents types d'échantillons et les limitations rencontrées sont développées dans la troisième partie de ce chapitre. L'analyse de l'ensemble des résultats a permis de choisir les matières premières à utiliser pour le reste de l'étude. Cette sélection est réalisée sur la base d'une optimisation multicritères qui prend en compte la source végétale (origine, périodes de production et rendement de production), la quantité de jus produite (par unité de matière sèche) ainsi que les caractéristiques du jus (teneur en Rubisco et paramètres physico-chimiques associés).

Divers paramètres ayant un impact sur la conservation de la Rubisco dès la récolte de la plante et tout au long de la manipulation des jus ont été identifiés. Ainsi, ce travail a nécessité l'identification d'une méthode de conservation des jus produits. Ce point fera l'objet de la dernière partie du chapitre.

## 2 Matières premières

Chaque lot des plantes présélectionnées doit suivre un traitement qui permet d'obtenir un extrait végétal, généralement appelé jus végétal. A cette fin, les caractéristiques essentielles des plantes permettant d'obtenir un jus végétal adapté au procédé, doivent être identifiées.

La Rubisco en tant que protéine foliaire est relativement abondante dans les espèces fourragères. Dans l'agriculture les fourrages ou plantes fourragères sont considérés comme une culture ou mélange de cultures destinées à nourrir les animaux d'élevage. Les surfaces

agricoles destinées à cet objectif sont appelées surfaces fourragères (DURU et al. 1988). La culture de celles-ci représente environ 45% de la surface agricole utile en France (HUYGHE 2005). Selon le classement établi par le ministère de l’agriculture, de l’agroalimentaire et de la forêt, les surfaces fourragères peuvent être divisées en trois groupes :

- les racines tuberculeuses fourragères, par exemple la betterave fourragère, le chou fourrager et le topinambour ;
- les fourrages annuels, par exemple le maïs fourrage, le maïs déshydraté, le ray-grass anglais et le sorgho fourrage ;
- les prairies non-permanentes, par exemple la luzerne, le trèfle violet, le sainfoin et le lotier.

Une des richesses de ces espèces, particulièrement du type légumineuses fourragères, est leur teneur importante en azote. Le tableau II.1 présente un résumé des principales grandeurs agronomiques telles que la surface cultivée, rendement (calculé en termes de Matière Sèche (MS)) et production, calculées pour l’année 2000 pour différentes espèces de cultures fourragères, ainsi que leur teneur en Matière Azotée Totale (MAT) associée.

Tableau II.1 – Principales espèces fourragères cultivées en France (source : HUYGHE (2005))

Cultures	Superficies (ha)	Rdt MS (kg/ha)	Production (Mt)	Teneur en MAT (%)	Total MAT produites (Mt)
Sorgho fourrage	1215	7700	0.01	7	ND
Ray-grass anglais	561630	8800	4.94	12	0.59
Luzerne	353827	9500	3.36	15	0.5
Trèfle violet	44503	8500	0.38	14	0.05
Maïs fourrager	1397919	130	18.17	7	1.27
Colza fourrager	234109	47	1.10	15	0.17
Choux fourrager	38663	47	0.18	10	0.02
Total fourrages	14902090	-	91.94	-	8.44

Au-delà de la teneur en azote, et donc en protéine et en Rubisco, la composition biochimique moyenne des plantes (notamment leur teneur en celluloses) va avoir un impact sur le procédé et doit donc être considérée. Par exemple, la teneur en cellulose va influencer la formation et les caractéristiques des tourteaux, et permettra d’atteindre la pression nécessaire à l’éclatement des cellules et à la libération de la Rubisco ; une teneur élevée en hémicelluloses (pouvant se retrouver dans les jus après leur production), peut interférer fortement avec l’étape de séparation de la Rubisco (WANG 2002 ; NIU et al. 2010). Des informations sur la composition biochimique des plantes utilisées dans ce travail sont présentées dans le tableau II.2 (JARRIGE et al. 1963).

## 2.1 La luzerne, matière première de référence

Du fait de leur valeur protéique, une des principales valeurs marchandes des fourrages est la production de produits déshydratés destinés à l’alimentation animale. En France, la luzerne

représente la principale culture destinée à cette filière. Selon le site officiel luzerne.org<sup>1</sup> en 2012, 70% de la luzerne déshydratée produite en France était destinée aux élevages français, et un peu moins d'un tiers est exportée. Bien que la production européenne de luzerne déshydratée dans les dernières années soit en hausse, avec des récoltes qui depuis 2009 reprennent une progression régulière de 3 à 4% par an, une problématique de cette filière concerne son écobilan, notamment le coût énergétique de l'évaporation de l'eau dans le fourrage frais.

En effet, le procédé de déshydratation de la luzerne (figure II.1), bien développé dans le nord de la France, conduit naturellement à la production d'un jus végétal riche en biomolécules d'intérêt telles que des polyphénols, des pigments ou des vitamines (source : luzerne.org<sup>2</sup>), mais surtout des protéines hydrophobes (COLAS 2012) et hydrophiles (KERFAI 2011). Plusieurs études se sont intéressées à l'amélioration de ce procédé de traitement de la biomasse végétale, que ce soit en réduisant les coûts énergétiques ou en valorisant les coproduits générés afin d'amoindrir les désavantages de ce procédé (ARLABOSSE et al. 2011 ; LEVESQUE et RAMBOURG 2002).

La valorisation de la fraction liquide produite par déshydratation mécanique en amont du séchage présente donc un potentiel intéressant dû notamment à sa teneur élevée en protéines solubles comme la Rubisco. Cependant, leur récupération présente un certain nombre de difficultés telles que leur faible concentration dans le jus, leur faible stabilité, les interférences auxquelles elles peuvent donner lieu dans les procédés de séparation.

De nombreuses études avaient déjà mis en évidence le fort potentiel que présente la luzerne comme une source particulièrement intéressante pour l'obtention de Rubisco (DOUILLARD et DE MATHAN 1994 ; LEVESQUE et RAMBOURG 2002 ; KAPEL et al. 2006 ; KERFAI et al. 2011b). Le choix de la luzerne comme matière première correspond au point de départ de notre étude, mais c'est aussi une référence qui a permis d'établir les éléments à prendre en compte dans l'évaluation d'autres matières.

En effet, la luzerne (plante C3) est connue pour être une plante riche en protéines, jusqu'à 30% de la matière sèche (ANDERSEN et KIEL 2000 ; SUYAMA et al. 2007 ; COLAS 2012), avec des valeurs moyennes entre 20 et 25%, dont presque la moitié sont des protéines hydrosolubles, principalement la Rubisco. La luzerne étant une légumineuse, elle est capable de fixer l'azote sans avoir besoin d'un apport supplémentaire (engrais). Ses besoins en eau sont aussi très limités et pour cette raison elle est considérée très intéressante d'un point de vue environnemental. Enfin, elle peut donner lieu à quatre ou cinq coupes dans l'année, de mars à octobre, la teneur en protéines augmentant au fur et à mesure des coupes à condition que celles-ci ne soient pas trop espacées dans le temps (BARBEAU et KINSELLA 1988).

---

1. Site Web LUZERNE.ORG. *Chiffres clés sur Luzerne.org*. <http://www.luzernes.org/?q=d%C3%A9couverte-de-la-luzerne/chiffres-clés>, consulté le 15-01-2018.

2. Site Web LUZERNE.ORG. *Luzerne et Nutrition : De nouveaux débouchés*. <http://www.luzernes.org/?q=luzerne-et-nutrition/de-nouveaux-d%C3%A9bouch%C3%A9s>, consulté le 08-01-2018.

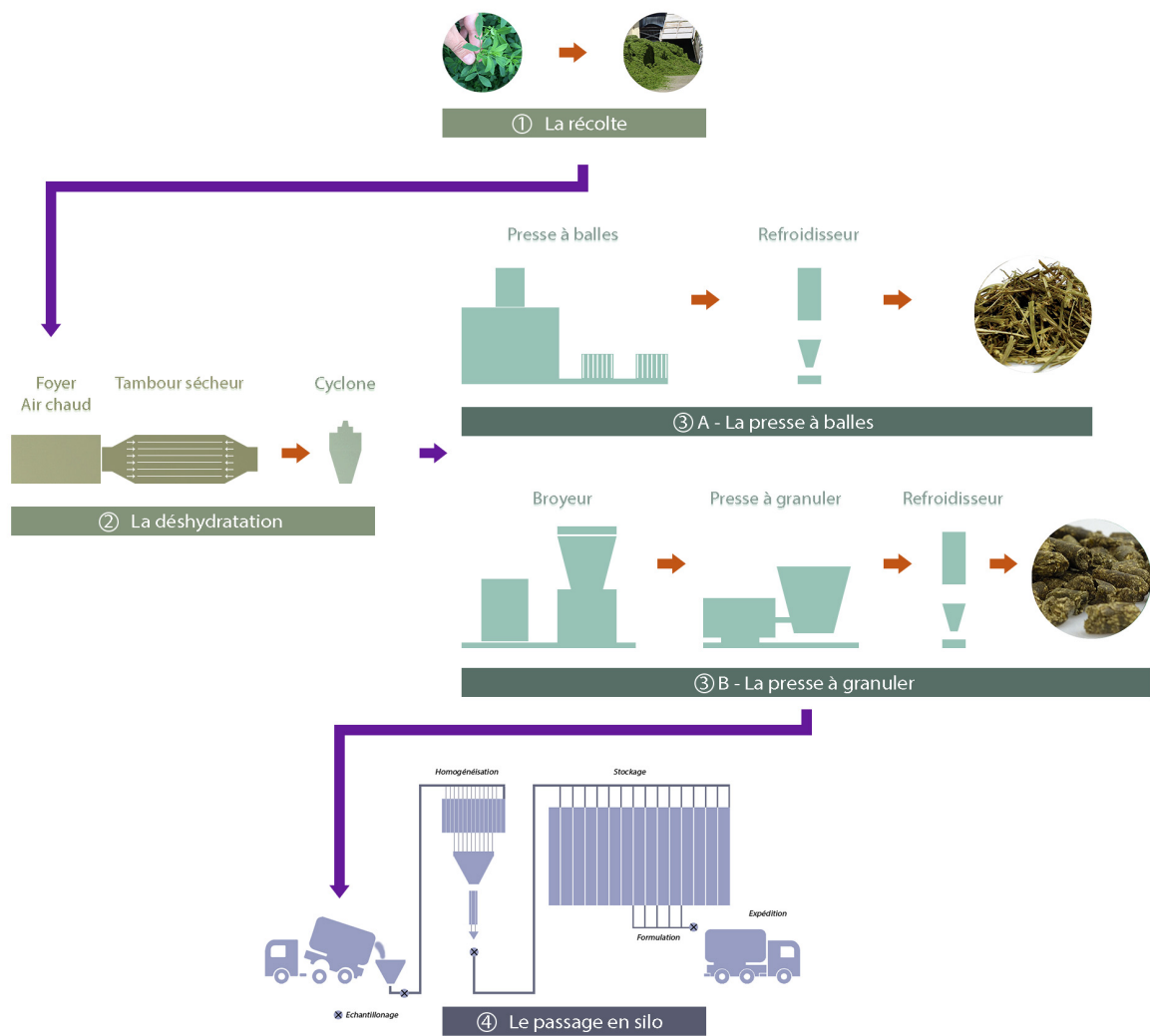


FIGURE II.1 – Schéma du procédé de déshydratation de la luzerne. Source [www.desialis.com](http://www.desialis.com)

## 2.2 Autres sources végétales

Au-delà de la luzerne, et en accord avec le partenaire industriel du projet, la coopérative agricole VIVADOUR, plusieurs matières premières végétales ont été présélectionnées comme potentielles sources de Rubisco pour la réalisation du projet, en fonction notamment de :

- leurs cycles de culture/production (dans le cas de sous-produits) ;
- leur teneur en Rubisco ;
- leurs caractéristiques physico-chimiques et biochimiques adaptées au procédé ;
- le contexte local (valorisation des cultures locales).

Par contre, la production des jus végétaux à partir de chaque matière première doit être suivie de tests et d'analyses qui permettront de valider l'utilisation de chaque source végétale ; pour cette raison le nombre de sources à tester a été limité. Parmi elles, se trouvent des inter-cultures ou des coproduits d'usine de transformation de légumes :

- le sorgho fourrager : plante C4, ratio feuille/plante élevé, teneur élevée en protéines ;
- le ray-grass anglais : plante C3, teneur élevée en Rubisco ;
- des résidus de gousses de haricots verts : sous-produit agroalimentaire, éventuellement valorisable ;
- le trèfle violet : plante C3, légumineuse utilisée en inter-culture, propriétés biochimiques proches de la luzerne et teneur relativement élevée en protéines.

Un bref descriptif des cultures de plantes présélectionnées est présenté dans le tableau II.2.

## 2.3 Évolution de la teneur en Rubisco lors du cycle végétal

Des études ont démontré que la teneur en Rubisco dans la plante est fortement liée à des facteurs tels que le stade développement, les conditions d'irrigation ou l'âge de la plante (repousses dans l'année, voire années depuis la sème pour les plantes vivaces) (AVILA OSPINA 2014 ; KHAEMBAH 2009 ; ARANJUELO et al. 2010 ; SUZUKI et al. 2001). Dans les plantes C3, les molécules de Rubisco peuvent se trouver dans les stromas de chloroplastes dans des concentrations atteignant jusqu'à 300 mg/mL (BARBEAU et KINSELLA 1988).

En effet, la Rubisco étant essentielle pour la fonction photosynthétique, et donc pour la croissance de la plante, il a été démontré que pendant son développement (plus précisément celui de la feuille), la teneur en protéines (principalement les protéines chloroplastiques) augmente pour servir de réserve lors de stades ultérieurs. Par exemple, dans le cas de graminées la teneur en protéines dans la feuille atteint sa valeur maximale durant la première étape de développement, appelée phase d'expansion au cours de laquelle la synthèse de protéines est très rapide (KHAEMBAH et al. 2014). La deuxième étape appelée étape de maturité correspond à une phase où le niveau de la protéine dans la feuille diminue au profit des autres organes de la plante, tels que les fleurs. Lors de la troisième étape, appelée phase de sénescence, la dégradation de la protéine a lieu en raison de la présence de protéases, mettant fin à la photosynthèse. En résumé, il a été démontré que la teneur en Rubisco dans la feuille est maximale pendant la phase d'expansion et minimale pendant la sénescence. Ainsi, la période de récolte ayant un impact direct sur la teneur en Rubisco dans les extraits qui seront produits (MAKINO

Tableau II.2 – Descriptif sommaire des principales caractéristiques des matières premières utilisées dans ce travail.

Matière première	Luzerne	Ray-Grass anglais	Trèfle violet	Sorgho fourrager	Haricots verts (résidus gosses)
Descriptif Plante	Légumineuse vivace d'origine méditerranéenne	Graminée, couleur vert foncé et brillant	Légumineuse	Graminée fourragère	Légumineuse annuelle (famille des Fabaceae)
Taille	Grande taille (50-100 cm)	Taille moyenne (40-80cm)	Taille moyenne, fortes racines	Grande taille (1 à 2 m)	Grande taille
Adaptabilité aux sols	Craint l'humidité excessive et les pH inférieurs à 6	Large gamme de variétés lui conférant une bonne adaptation climatique	Résistance au froid, adaptation aux sols acides (pH 5,5) et en général aux sols variés	Plante annuelle, résistante à la sécheresse	Très sensible au froid, préfère les sols neutres (pH idéal 6,5), mais s'adapte aux sols basiques
Composition biochimique moyenne de la plante	En % MS : Protéines 22 Celluloses 20 Hémicelluloses 12 Lignine 6,4	En % MS : Protéines Celluloses 17,1 Hémicelluloses 15,2 Lignine 2,4	En % MS : Protéines 219 Celluloses 14 Hémicelluloses 11 Lignine 4,5	En % MS3 : Protéines ND Celluloses 28.3 Hémicelluloses 22.8 Lignine 8.7	En % de plante : Protéines 4 : 1,85 % Celluloses ND Hémicelluloses ND Lignine ND
Avantages	Bonne croissance même en sécheresse. Bonne résistance au froid. Économie de fertilisation azotée. Des reliquats azotés pour la culture suivante (SB) Perte d'azote nitrrique limitée Effet positif sur la structure du sol Productivité élevée en été-automne. Repousse rapide après la coupe. Régularité de rendement	Forte valeur énergétique Installation facile, très bonne adaptation au pâturage	Rendement fourrager élevé. Bonnes valeurs énergétique et protéique (< à la luzerne), facile à ensiler. S'associe bien avec le ray-grass hybride.	Facilité pour l'ensilage, valeur alimentaire bonne pour les plantes jeunes en pâturage ou en affouragement en vert 120-150 g de M.A.D./kg de plante de MS	Rendement de 14 à 16 t/ha Peu de fertilisation azotée.
Inconvénients	Sa valeur énergétique est modeste Ne s'adapte pas à tous les pH de sol (SB)	Nécessité des apports de fertilisation, difficulté de fauche, très faible pousse en conditions de sécheresse, ne pousse pas si T > 25°C	Difficile à faner, faible pérennité, limitée souvent à une seule année de production. Sensibilité à la sécheresse	Sensible au froid	Nécessité d'irrigation

2003), afin d'atteindre les teneurs maximales de Rubisco, la coupe de la plante doit donc se faire pendant la phase d'expansion ou de croissance de la feuille, tandis qu'une récolte durant les phases de maturation ou de senescence doit être évitée.

Par ailleurs, une coupe tardive (c'est-à-dire dans les phases de maturité ou de senescence) pose deux problèmes supplémentaires :

- Lors de la production des jus végétaux une grande quantité de protéases est présente dans la plante et peut être libérée. La présence dans les jus des protéases contribue à rendre plus instable la Rubisco, dont la concentration est déjà moindre que celles qui peuvent être obtenues lorsque le jus est produit d'une plante en phase de croissance. L'utilisation de ces jus est ainsi fortement déconseillée.
- Avec la phase de maturité, les fractions cellulosique, hémicellulosique et la lignine de la plante augmentent (JARRIGE et al. 1963), tout comme le taux de matière sèche et cela a des conséquences sur l'opération de production des jus, comme il sera discuté prochainement.

Enfin, pour un grand nombre de légumineuses, la teneur en protéines de la plante augmente sur l'année avec le nombre de coupes (sauf en été) (source [lacooperationagricole.coop](http://lacooperationagricole.coop)<sup>3</sup>). À un stade de développement équivalent, la plante coupée en septembre/octobre serait ainsi plus riche en protéines que celle de la première coupe, réalisée généralement au printemps. On voit donc qu'une difficulté à surmonter sera de garantir une matière première de qualité suffisante et régulière pour alimenter le procédé de production de Rubisco.

## 2.4 Prétraitement de la plante

Le traitement de la matière première pour produire un jus végétal ne peut généralement pas se faire directement. La présence importante de tiges dans certaines plantes notamment, mais aussi le besoin d'arriver à imposer des pressions suffisantes à l'éclatement des chloroplastes pour libérer la Rubisco, font du prétraitement de la plante une étape incontournable. Cette étape a été réalisée pour le traitement de tous les lots des plantes, à l'exception des résidus de gousses de haricots, dont la taille moyenne était déjà inférieure à 2 cm.

Plusieurs façons de pré-traiter les matières premières ont été testées dans ce travail :

- découpage manuel de la plante en tronçons de 10-20 cm avec des ciseaux à poisons/sécateur ;
- pré-broyage sommaire à l'aide d'un broyeur électrique avec un système de coupe à entraînement automatique (AXT 25 TC ,Bosch). Dès sa réception la plante est broyée afin de réduire la taille des tiges à une longueur d'environ 10 cm ;
- pré-broyage à l'aide d'un coupe-bordure type rotofil (GL310, BLACK & DECKER), afin de réduire les tiges de la plante à une taille plus petite (entre 2 et 3 cm) et en même temps hacher les feuilles ;
- ensilage de la plante ou pré-coupe par un engin agricole au moment de la récolte, en tronçons de 5 à 15 cm.

---

3. Site Web LA COOPERATION AGRICOLE.ORG. *Coop de France Deshydratation : Chiffres clés*. <https://www.lacooperationagricole.coop/fr/coop-de-france-deshydratation-corporate>, consulté le 16-07-2018.

Sauf le pré-broyage par coupe-bordure qui produit une matière plus déstructurée, le prétraitement n'altère pas la plante, mais réduit uniquement sa taille. Cependant, la comparaison des différentes méthodes de prétraitement n'est pas aisée puisqu'elles n'ont pas pu être appliquées sur le même lot de plante. Néanmoins, elles se sont toutes montrées adaptées aux objectifs recherchés. Une analyse plus fine pourra être faite lorsque les résultats quantitatifs de différents lots de jus produits seront présentés.

### 3 Production des jus végétaux

De manière générale la production de jus végétaux à partir d'une plante est associée à une phase de broyage ou destruction de la matière végétale suivie d'une étape de clarification du jus brut. Cette étape a pour objectifs la destruction du tissu végétal, la réduction de la taille des particules et la libération de la molécule d'intérêt, pour faciliter son extraction en phase aqueuse. Cette phase est commune aux différents procédés proposés pour la purification des protéines végétales (CHAN et al. 1972).

A l'échelle laboratoire la technique la plus utilisée pour la destruction des tissus ou des autres organes de la plante, est la macération qui permet la libération d'une haute teneur de la molécule dans le milieu. Cependant, lorsqu'on travaille avec des quantités de matière plus importantes, la macération peut devenir une opération difficile à cause de la présence de fibres et de tissu vasculaire des feuilles. Pour cette raison d'autres techniques ont été employées, par exemple, l'utilisation de l'azote liquide qui permet de convertir en poudre les feuilles de la plante (BŁASZCZYK et al. 2002; DESAI et al. 2002). Bien que l'emploi de l'azote liquide soit très efficace, son utilisation représente une option peu viable à l'échelle industrielle. De ce fait, TANGKA (2003) expose que grâce à l'utilisation de presses, le degré de macération et de réduction de la matière est moins important, à condition d'atteindre des pressions de l'ordre de 5 kPa, valeur qui permettrait d'extraire toutes les protéines des tissus végétaux. Durant cette phase certains phénomènes peuvent cependant avoir lieu comme l'augmentation de la température ou la diminution du pH, ce qui entraîne une perte de la teneur en protéine par précipitation, dénaturation ou dégradation.

De manière générale, les conditions à adopter lors de la phase de production des jus végétaux doivent respecter à minima les principes suivants :

- faciliter l'accessibilité à la molécule d'intérêt, favoriser sa libération ;
- minimiser les volumes pour éviter une dilution trop importante de la protéine ciblée ; ce point est souvent opposé au premier, et une optimisation peut être nécessaire ;
- contrôler la température pour éviter une dégradation thermique ;
- éliminer rapidement les fibres pour éviter l'adsorption de la protéine.

Il est important de prendre en compte ces considérations car comme il est signalé par HASSAN et al. (2008) cette étape peut être considérée comme une des plus importantes du procédé car en plus de déterminer la teneur initiale de la protéine ciblée, elle détermine aussi la teneur des impuretés et composés indésirables qui devront être séparés. Ceci aura une influence importante sur la suite des étapes nécessaires à la purification et conditionnera



certaines variables comme les volumes qui devront être traités et le degré d'élimination des résidus.

### **3.1 Technologies de production des jus végétaux**

Dans ce travail, la production des jus végétaux aura lieu par déshydratation mécanique ou pressage. Pour cela deux technologies, relativement similaires, ont été testées : l'extrusion et la presse à vis. Bien que relativement similaires à la base, ces deux technologies présentent des différences essentielles pour les applications visées.

#### **3.1.1 Extrusion bi-vis**

L'extraction thermo mécano-chimique en extrudeur bi-vis conduit à la production de deux fractions : un extrudat et un filtrat brut. Bien connue dans le secteur agro-alimentaire, l'extrusion consiste essentiellement à pousser une matière chauffée à travers une filière, ou sortie de taille réduite (VERGNES et CHAPET 2001). En général, l'échauffement est assuré par les forces de frottement très importantes entre la matière et la (ou les) vis, mais la chaleur peut aussi être apportée de l'extérieur. Parmi les avantages de cette technologie, citons notamment le fort taux de cisaillement subi par la matière, qui dans le cas d'une plante permet d'assurer l'éclatement des cellules et l'extraction des molécules d'intérêt et l'obtention d'un extrudât ou tourteau relativement sec (10 à 20% d'eau). Par contre, ces conditions conduisent à des augmentations de température difficiles à maîtriser. Par ailleurs, l'introduction systématique d'eau dans le milieu contribue à la dilution de la biomolécule et peut rendre son extraction ultérieure plus difficile.

L'extrusion bi-vis a été utilisée pour le fractionnement de la matière végétale par RIGAL (1996) et par COLAS (2012) pour la production des jus végétaux à partir de luzerne. Dans ce travail, une expérience de production de jus végétaux par extrusion bi-vis a été réalisée, en collaboration avec le Centre de Ressources Technologiques, CATAR - CRITT AGRORES-SOURCES (Toulouse), lors de laquelle les conditions expérimentales préconisées par COLAS (2012) ont été appliquées.

#### **3.1.2 Presse à vis**

Le principe d'une presse à vis peut être considéré essentiellement similaire à celui de l'extrusion : à l'entrée une vis sans fin entraîne la matière qui reste partiellement bloquée en sortie grâce à une réduction importante de la section. L'accumulation de matière dans la presse fait augmenter la pression et favorise l'expulsion du liquide. Si la pression est suffisamment élevée, les cellules éclatent et leur contenu peut ainsi être libéré. La presse à vis est couramment utilisée industriellement dans les procédés de déshydratation de la luzerne, afin d'enlever une partie de l'eau par voie mécanique économisant l'énergie thermique.

Pour résumer, il peut être considéré que les deux technologies permettent :

- une trituration de la matière végétale et simultanément une séparation liquide/solide du matériel solide de plus grande taille (tiges et feuilles déshydratées) ;
- une adaptation facile à l'échelle industrielle.

Par contre, dans une presse à vis les deux principaux inconvénients de l'extrusion sont limités, raisons pour lesquelles elle a été la technologie privilégiée dans ce travail :

- le cisaillement est inférieur, ce qui permet de limiter l'augmentation de la température ;
- le pressage peut être réalisé sans ajout de liquides ce qui évite la dilution de la protéine dans la fraction liquide récupérée.

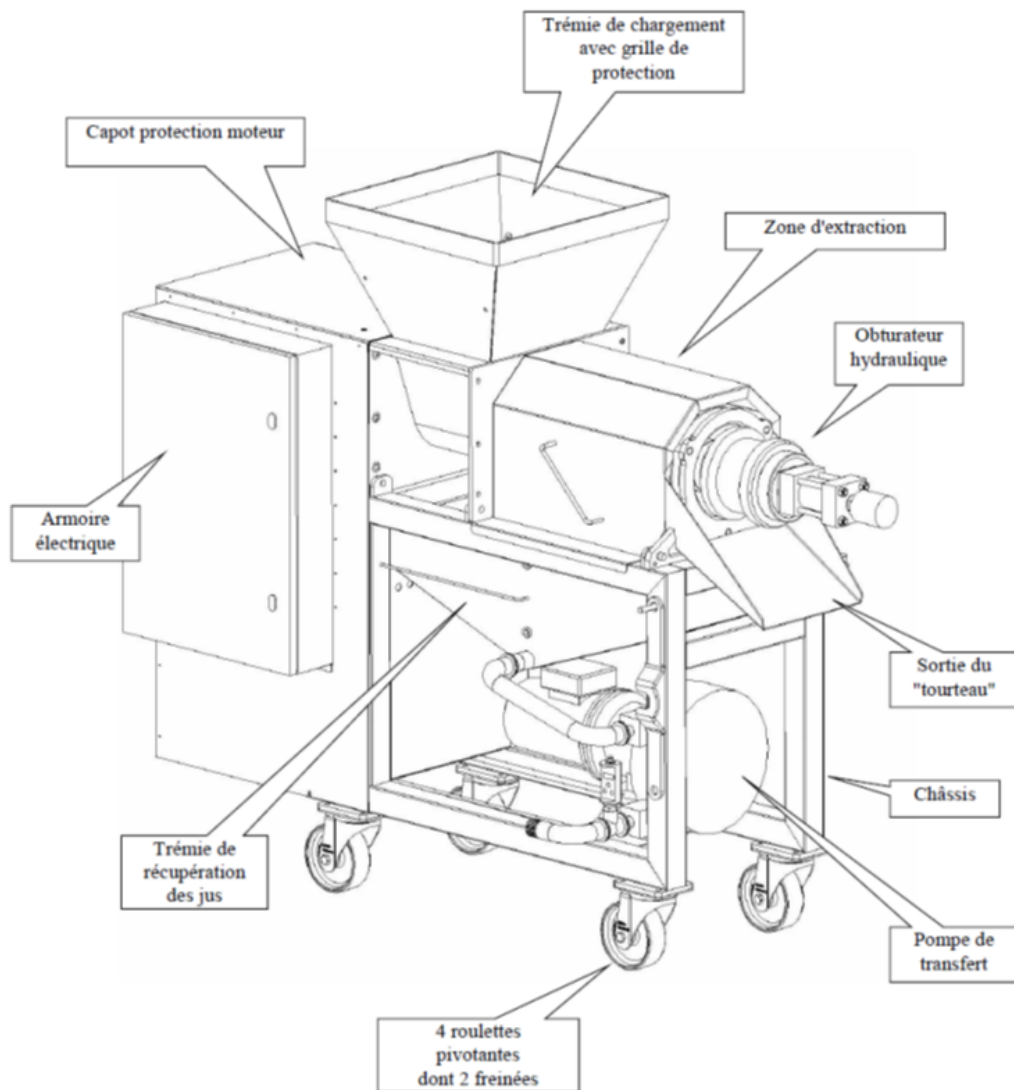


FIGURE II.2 – Dessin de la presse

Les figures II.2 et II.3 présentent respectivement un dessin et le schéma de la presse à vis utilisée dans ce travail. Il s'agit d'un prototype de presse à vis pour biomasse verte fabriqué par FEMAG Industries, d'une capacité maximale de 100 kg/h. La presse est constituée de trois

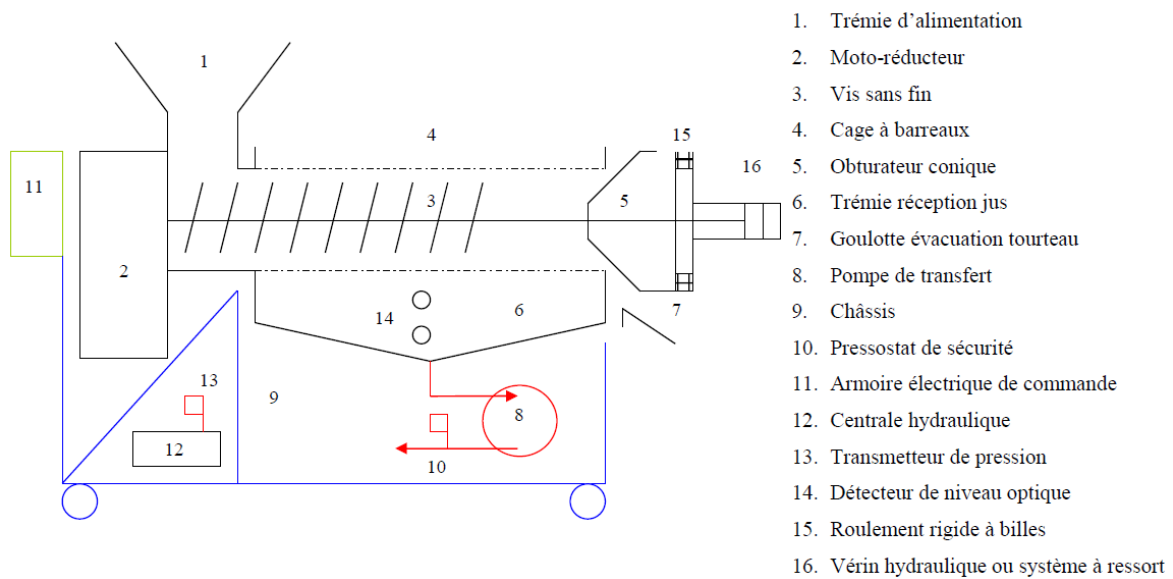


FIGURE II.3 – Schéma de la presse avec ses différents composants

corps principaux : la trémie d'alimentation, la vis, et la sortie. Un boîtier électrique permet de régler les paramètres de fonctionnement et un bac permet la collecte des jus produits. L'ensemble est construit en acier inoxydable.

La fréquence réglable de fonctionnement (de 15 à 60 Hz) détermine la vitesse de rotation de la vis. Le tableau II.3 montre les valeurs de vitesse de rotation de la vis correspondant à une fréquence donnée.

Tableau II.3 – Correspondance entre la fréquence et la vitesse de rotation de la vis de la presse à vis inox à obturateur hydraulique et mécanique

Fréquence	Vitesse de rotation de la vis
60 Hz	28.8 tr/min
50 Hz	24.0 tr/min
40 Hz	19.2 tr/min
30 Hz	14.4 tr/min
20 Hz	9.6 tr/min
10 Hz	7.2 tr/min

La vitesse de rotation de la vis est la variable opératoire principale de la presse. Elle permet de déterminer le débit de fonctionnement et donc la pression de travail, lesquels peuvent néanmoins varier en fonction des caractéristiques de la plante (par exemple la proportion de tiges, leur caractère plus ou moins fibreux, ou la teneur en matière sèche).

## **3.2 Principaux facteurs externes au procédé**

Au-delà de la technologie utilisée pour la production des jus, d'autres aspects parfois non maîtrisables peuvent influencer fortement la production des jus végétaux. Il s'agit principalement des facteurs liés à la plante, à la récolte, et aux conditions environnementales associées.

Dans le cadre du projet RUBIS, la production des jus végétaux est réalisée en concertation avec la coopérative agricole VIVADOUR, afin d'effectuer cette étape immédiatement après la récolte de la plante. De cette façon la plante est réceptionnée au maximum 1h après la coupe et est tout de suite traitée.

Au moment de la réception de la plante certains aspects ont été notés afin d'avoir un descriptif du matériel végétal qui sera traité. Ces aspects concernent la taille de la plante (longueur des tiges), son état de maturation (présence de fleurs, couleur des feuilles), ou la proportion feuilles/tiges.

### **3.2.1 Date de la récolte (conditions météorologiques précédant la récolte)**

Les différents lots de luzerne traités ont été récoltés entre le début du printemps et la fin de l'automne et ce, sur plusieurs années, impliquant des différences de pluviométrie et de température les jours précédant la récolte. Ces paramètres climatiques ont une influence sur la matière sèche de la plante, et donc sur le rendement de production du jus (notamment la température ambiante). Il a été observé que des températures extérieures élevées (supérieures à 30°C pour les lots traités pendant l'été par exemple) conduisent à une augmentation plus importante de la température de travail, obligeant à adapter les conditions opératoires du pressage.

### **3.2.2 Matière sèche de la plante**

Directement lié au point précédent, la teneur en matière sèche de la plante a une influence importante, qualitative comme quantitative, sur la production des jus végétaux. Les plantes avec des taux de matière sèche les plus élevés occasionnent des difficultés durant le pressage traduites par un blocage du tourteau et une augmentation de la température de production du jus.

Par contre, des teneurs importantes en humidité dans la plante, permettent d'avoir des valeurs de rendement élevées ; cependant les jus produits présentent une teneur en matière sèche plus pauvre.

### **3.2.3 Stade de développement de la plante**

La teneur et la stabilité de la Rubisco dans les jus étant fortement conditionnées par le stade de développement de la plante, les aspects qualitatifs permettant de les estimer ont été

examinés. Il s'agit par exemple de la présence de fleurs, la couleur des feuilles et des tiges ainsi que leur taille et leur consistance (rigidité, épaisseur, longueur).

### **3.2.4 Ratio feuille/tiges**

La Rubisco étant essentiellement une protéine foliaire, le ratio feuille/tige est représentatif de la teneur en Rubisco de la plante. En effet, la teneur moyenne en Rubisco déterminée par DOUILLARD (1996) dans les feuilles de luzerne étant une référence, cette proportion permet d'estimer a priori la concentration théorique maximale de Rubisco que l'on peut obtenir dans les jus végétaux. De la même manière que l'état de développement de la plante cet aspect a été analysé qualitativement (visuellement).

## **3.3 Conditions opératoires utilisées**

### **3.3.1 Lots de matières premières traités**

Les différents lots de matière végétale ont été réceptionnés dans des périodes de l'année comprises de mars à octobre. Au total 11 lots ont été réceptionnés, dont sept de luzerne, un de ray-grass anglais, un de résidus de gousses de haricots, un de sorgho fourrager et un de trèfle violet.

Le tableau II.4 présente un descriptif des paramètres externes indiqués précédemment (cf. paragraphe 3.2 de ce chapitre) ayant été observés lors de la réception des différents lots.

À l'exception du lot Luzerne\_0, tous les autres lots de plante ont été traités dans les installations du LISBP à l'INSA de Toulouse. Le lot Luzerne\_0 a été traité au Centre de Ressources Technologiques, CATAR - CRITT AGRORESSOURCES puisque c'est le lot traité par extrusion bi-vis.

### **3.3.2 Protocoles expérimentaux**

#### **3.3.2.i Extrudeuse bi-vis**

Les conditions expérimentales utilisées avec l'extrudeuse bi-vis ont été extraites de la thèse de COLAS (2012) :

- extrudeur BC45 équipé d'un module de filtration en zone 6 ;
- température de consigne des modules : 50°C ;
- vitesse de vis  $N=110$  rpm ;
- débit d'alimentation en luzerne = 12 kg/h ;
- ratio d'alimentation Liquide/Solide = 3-4.

Avant d'être introduite dans l'extrudeuse, la plante subit un découpage manuel en tronçons de 10-20 cm avec des ciseaux à poissons/sécateur. Le jus obtenu par extrusion contient encore une quantité de solides très élevée, puisque la désagrégation de la matière est très importante.

Tableau II.4 – Observations réalisées concernant les paramètres externes au procédé au moment de la réception des lots.

Lot de plante	Date (période)	Caractéristiques plante		
		Aspect visuel	État maturation	Ratio feuilles/tiges
Luzerne_0	17/07/2015 (été)	Couleur vert foncé, tiges longues	Fleurie	Élevé
Luzerne_1	01/10/2015 (automne)	Couleur vert foncé, tiges courtes	Absence de fleurs	Élevé
Luzerne_2	08/06/2016 (printemps)	Tiges très longues, présence d'impuretés (mauvaises herbes)	Fleurie	Moyen
Luzerne_3	19/07/2016 (été)	Tiges très longues	Très fleurie	Moyen
Luzerne_4	19/04/2017 (printemps)	Tiges longues	Début fleuraison	Faible
Luzerne_5	06/06/2017 (printemps)	Tiges longues	Très peu de fleurs	Moyen
Luzerne_6	25/09/2017 (automne)	Couleur vert foncé, tiges courtes et fines	Absence de fleurs	Très élevé
Luzerne_7	24/04/2018 (printemps)	Couleur vert foncé, tiges courtes et fines	Absence de fleurs	Élevé
Haricots (résidus des gousses)	21/07/2016 (été)	Très vert	N.A.	N.A.
Sorgho fourrager	23/11/2016 (automne)	Couleur marron, feuilles très sèches	Maturation très avancée	
Ray-Grass anglais	22/03/2017 (printemps)	Tiges fines, facile à broyer	Absence de fleurs	
Trèfle violet	06/09/2017 (été)	Tiges longues et fines	Très fleurie	Élevé

Il doit donc subir un post-traitement afin de le comparer avec le jus obtenu dans la presse à vis. Une fois obtenu, le jus est traité par filtration sur uneessoreuse (Rousselet) à 2200 rpm à travers une poche de filtration de porosité 5  $\mu\text{m}$ . La masse de filtrat réceptionné en sortie d'essoreuse ainsi que celle de tous les solides séparés (l'extrudât et les solides séparés dans l'essoreuse) sont mesurées pour le bilan de matière. A la fin du traitement, tous les produits ont été stockés à 4°C. Le jus obtenu après essorage est appelé « jus brut ».

### **3.3.2.ii Presse à vis**

Après le prétraitement, la plante est pesée et introduite dans la presse par une trémie de chargement. Une fois la presse montée en pression le liquide s'écoule dans la trémie de récupération du jus et un tourteau est formé en sortie, au niveau de l'obturateur, plus ou moins sec suivant le taux de compression. Les valeurs de fréquences employées pour les différentes expériences réalisées se trouvent entre 20 et 25 Hz. Les températures de sortie du tourteau et du jus végétal sont mesurées.

Pendant que le jus végétal (appelé par la suite « jus brut ») est produit, un suivi massique est réalisé et le liquide est immédiatement transféré dans un tank réfrigéré pour être maintenu à une température de 4°C. Un bilan global de matière est réalisé à la fin du pressage, en considérant la masse totale de plante traitée et le volume de jus produit.

Tous les lots de jus obtenus sont homogénéisés puis font l'objet d'une analyse sommaire de pH et de conductivité. Enfin, une fois produit, le jus peut subir des traitements divers si l'on souhaite le stocker en vue d'un traitement différé dans le temps.

### **3.3.2.iii Synthèse des conditions opératoires**

Le tableau II.5 présente un résumé des conditions de traitement des lots de sources végétales employées dans les différents essais.

## **3.3.3 Résultats et discussion**

Les résultats de l'étape de production des jus végétaux sont présentés dans le tableau II.6 sous forme de bilans de matière de jus produit correspondant à chaque lot de plante traitée.

La définition des paramètres opérationnels pour la méthode de traitement du lot *Lu-zerne\_0* basée sur l'étude menée par COLAS (2012) a permis d'obtenir un rendement de production de jus brut de 45%. Bien que ce résultat soit intéressant, l'étude ultérieure montrera que les températures élevées atteintes durant le procédé conduisent à la perte de Rubisco. Pour cette raison, cette technologie n'a plus été étudiée par la suite. Par contre, les forces de cisaillement très importantes subies par la plante au sein de l'extrudeuse conduisent à considérer celle-ci comme une méthode de référence en ce qui concerne le rendement de production de jus.

Tableau II.5 – Synthèse de conditions d'obtention des jus végétaux pour les différents lots de plantes

Lot	Prétraitement matière végétale	Production jus végétal	Fréquence de rotation de la vis (Hz)	Clarification
Luzerne_0	Coupe manuelle, longueur environ 20-30 cm.	- Extraction thermo mécano-chimique en extrudeur bi-vis - Température 50°C	N.A.	Filtration suressoreuse à 2200 rpm à travers une poche de filtration de porosité 5 µm
Luzerne_1	Broyage mécanique (broyeur électrique), longueur entre 5 et 10 cm.	Pressage à travers d'une presse à vis à obturateur hydraulique et mécanique	25	N.A.
Luzerne_2			20	
Luzerne_3			20	
Luzerne_4			20	
Luzerne_5			20	
Luzerne_6			20	
Luzerne_7			25	
Sorgho fourrager			20	
Ray-Grass anglais			20	
Trèfle violet			20	
Haricots (résidus des gousses)	Sans prétraitement		15	

Tableau II.6 – Résultats expérimentaux de production de jus

Lot de plante	MS % plante	Bilan massique Pressage			Matière Sèche jus brut (%)
		Masse plante (kg)	Masse Jus Brut (kg)	Rendement production jus	
Luzerne_0	21.0	63.0	28.5	45%	9,2
Luzerne_1	20.5	43.0	16.0	37%	11,5
Luzerne_2	23.0	33.0	12.4	39%	8,4
Luzerne_3	27.0	51.5	19.3	37%	11,4
Luzerne_4	19.5	121.4	53.2	44%	11,0
Luzerne_5	20.3	98.7	36.9	37%	9,5
Luzerne_6*	19.0	108.2	70.5	65%	7,0
Luzerne_7*	21.0	79.6	41.8	52%	7,5
Haricots (résidus des gousses)	22.0	85.1	57.2	67%	4,0
Sorgho fourrager	19.0	34.2	18.6	54%	N.M.
Ray-Grass anglais	17.0	140.5	75.5	54%	6,0
Trèfle violet	21.0	111.3	51.2	46%	9,0



La presse à vis s'avère une technologie bien adaptée pour le traitement des différentes matières premières testées. En effet, bien qu'inférieurs, les rendements moyens présentés dans la littérature (à savoir 55% maximum pour la luzerne) sont obtenus uniquement après une étape de pulpage (ARLABOSSE et al. 2011). Pour les autres matières premières les données de la littérature sont plus rares, mais d'une manière générale la production des jus conduit à des bons résultats, sans que des difficultés particulières de fonctionnement aient été identifiées lors de l'opération.

Pour la luzerne traitée dans la presse à vis, les différents lots traités n'ont pas conduit aux mêmes résultats ; leur analyse n'a donc pas été aisée. Même si la même technologie est appliquée et les conditions d'opération sont similaires, les facteurs externes indiqués précédemment influencent fortement les rendements obtenus, et le déroulé même du procédé, comme on a pu le constater durant les tests. Par ailleurs, le prétraitement subi par les plantes n'a pas été non plus le même dans tous les essais. Ainsi, une analyse plus poussée de ces facteurs et leur influence sur les résultats est présentée par la suite pour tenter d'identifier les conditions optimales pour la production des jus. Bien évidemment, cette analyse devra être complétée par la mesure de la concentration de Rubisco dans les jus produits.

### 3.3.3.i Influence des facteurs externes

Au regard des observations synthétisées dans le tableau II.4, les différents lots de luzerne traités peuvent être classés en deux groupes :

- un premier groupe réunissant les lots Luzerne\_1, 6 et 7, la plante y présentait une coloration vert foncé, les tiges de longueur fines et assez fragiles car peu fibreuses, et une absence de floraison. Ces plantes se trouvent dans le stade de croissance dit exponentiel ;
- un deuxième groupe réunissant les lots Luzerne\_2, 3, 4 et 5, la plante y présentait une coloration des feuilles et des tiges vert clair, un peu jaunâtre, tiges longues et fibreuses et plante en état de floraison. Le stade de croissance de ces lots est celui de maturité.

Dans la plupart des cas, il a été observé que le ratio feuilles/tiges des lots était lié à l'état de développement de la plante : les plantes les plus développées sont aussi celles qui montrent des ratios feuilles/tiges visuellement plus faibles, à l'exception du lot Luzerne\_4. Pour ce lot, il a été observé un état relativement avancé de la plante qui se trouvait en début de floraison, cependant le ratio feuille/tige restait proche des plantes qui n'avaient pas encore fleuri.

L'observation des rendements obtenus pour tous les lots qui présentent un état de développement avancé (lots Luzerne\_2 à Luzerne\_5), montre des valeurs proches de 37%. Par contre, le résultat obtenu avec le lot Luzerne\_4 a été très supérieur (44%), plutôt en accord avec les plantes moins développées, dont le ratio feuille/tige était supérieur. Ce dernier facteur semble donc avoir une grande influence sur la quantité produite de jus.

La teneur initiale en MS% de la plante a aussi une influence directe sur les rendements d'extraction de jus. Les valeurs mesurées de MS% pour les différents lots de plante se trouvent dans une gamme de 19% (lot Luzerne\_6) à 27% (lot Luzerne\_3), avec une valeur moyenne de 21.5%. Pour les lots ayant une teneur en MS% très élevée (lots luzerne\_2 et luzerne\_3) le

rendement est moindre, mais en plus, l'étape de production présentait des difficultés durant le pressage traduit par un blocage dans la formation du tourteau et une augmentation de la température. Par contre, plus l'humidité de la plante est élevée (lots luzerne\_4 et luzerne\_6), plus le rendement est élevé. En revanche, les jus produits présentent une teneur en matière sèche plus pauvre.

### **3.3.3.ii Influence du prétraitement de la plante et des conditions opératoires**

Pour les six premiers lots de luzerne l'étape de broyage de la plante a consisté en une coupe mécanique de la tige, permettant de réduire sa taille à environ 10 cm sans intervenir sur la feuille. Pour le lot Luzerne\_7, l'utilisation combinée d'une deuxième méthode de broyage a permis d'avoir une réduction plus importante de la taille des tiges et en même temps une première cassure du matériel foliaire ce qui a facilité l'extraction du jus lors du pressage. Pour autant le rendement de production de jus du lot Luzerne\_6 (ratio feuilles/tiges et humidité élevés) est supérieur aux autres lots. Ces derniers facteurs apparaissent donc comme ayant une forte influence sur les résultats, supérieure à l'influence de la méthode de prétraitement de la plante.

Enfin, en ce qui concerne la vitesse de rotation de la presse, l'analyse est à nouveau difficile à faire. En effet, les conditions de travail ont été souvent subies plus que choisies de par les caractéristiques de la plante à traiter, et qui viennent d'être discutées. Ainsi, il a été constaté pour le premier lot (lot Luzerne\_1) qu'une valeur de 25 Hz provoquait des difficultés lors du pressage telles qu'un blocage de la sortie du tourteau et une augmentation de la température de production du jus.

Le traitement des lots Luzerne\_2 à Luzerne\_6 s'est alors réalisé avec une vitesse de rotation de 20 Hz, ce qui a permis d'éviter les difficultés liées au réchauffement de la matière. Cela n'a pas semblé influencer autrement les rendements d'extraction, au-delà des effets de l'état de la plante.

Le traitement du lot Luzerne\_7, qui présentait de meilleures caractéristiques que le lot Luzerne\_1 en termes d'humidité et d'état de maturation, a été à nouveau effectué avec une vitesse de rotation supérieure (fréquence de 25 Hz), avec comme objectif d'augmenter le rendement. Malgré les conditions plus favorables, le débit d'alimentation de la plante a été réduit afin d'éviter une trop forte rétention de tourteau dans la presse, et donc une forte augmentation de la pression et de la température. Il peut être remarqué que pour une teneur en matière sèche similaire, le rendement d'extraction dans la presse à vis est très supérieur à celui qui avait été obtenu dans l'extrudeuse bi-vis.

### **3.3.4 Conclusion**

La presse à vis apparaît comme une méthode adéquate pour la production des jus végétaux. Les rendements obtenus pour tous les lots de luzerne traités sont similaires à ceux de la littérature. Les rendements obtenus pour les autres matières premières semblent cohérents

avec ceux de la luzerne au regard de leur teneur initiale en matière sèche.

Le travail avec une matière première naturelle, difficile à maîtriser et soumise à de nombreux changements et influences, est délicat à exploiter. Des conditions opératoires qui devraient être contrôlées sont parfois subies et l'effet croisé de plusieurs facteurs est souvent difficile à éviter. Ainsi, pour confirmer les résultats obtenus, il serait nécessaire d'effectuer d'autres essais. Il est néanmoins possible d'établir à partir des résultats obtenus quelques préconisations pour assurer une bonne production de jus végétaux.

Concernant la matière première et son prétraitement :

- une plante encore en phase d'expansion, bien avant la floraison, et avec une forte présence de feuilles ;
- une fragmentation maximale des tiges et du matériel foliaire lors de l'étape de pré-broyage.

Pendant le pressage :

- une corrélation adéquate entre la vitesse de rotation de la vis et le débit d'alimentation de la plante, afin de favoriser la production de jus tout en évitant l'augmentation de la température ou l'obstruction de la sortie du tourteau ;
- un refroidissement rapide du jus.

L'ensemble de ces conditions a été réuni lors du traitement du lot Luzerne\_7 ce qui a permis d'obtenir un rendement de production de 52%, supérieur à celui obtenu avec la méthode d'extraction appliquée au lot Luzerne\_0 avec l'extrudeuse bi-vis, définie comme la méthode de référence.

Afin de comparer de manière plus approfondie les résultats obtenus par les deux technologies, un des aspects essentiels à prendre en compte est la température de travail et son influence sur la teneur en Rubisco des jus produits. Ce point fera l'objet du paragraphe 5 de ce chapitre, après que les méthodes de détermination de la Rubisco dans les jus auront été présentées dans le paragraphe 4.

## 4 Dosage de la Rubisco

### 4.1 Introduction

Dans la littérature, diverses méthodes conventionnelles utilisées pour la quantification de protéines ont été employées pour la détermination de la teneur en Rubisco dans des milieux synthétiques ou purifiés. Toutefois, la mise au point d'une méthode de détection et dosage de la Rubisco rapide, sensible et sélective, destinée à l'analyse de milieux complexes réels reste une problématique clé qui n'a pas été résolue.

Parmi les techniques les plus anciennes pour la quantification de la Rubisco, une de celles qui continuent à être très utilisées est l'analyse par spectrophotométrie à 280 nm de longueur d'onde dans des milieux adaptés aux conditions de mesure (LILLEY et WALKER 1974; SALVUCCI et al. 1986; GALMÉS et al. 2005). En effet, de nombreux travaux ont visé à déter-

miner la valeur du coefficient d'extinction molaire de la Rubisco, dont la valeur varie de 14 à 18 (solution 1% de Rubisco à 280 nm avec un chemin optique de 1 cm) selon les plantes (DOUILLARD et DE MATHAN 1994). Dans ses travaux de purification de la Rubisco à partir de feuilles d'épinard, SALVUCCI et al. (1986) ont déterminé la concentration de la protéine par spectrophotométrie avec la relation  $C(\text{mg/mL}) = A_{\text{cm}/280} \times 0.61$  sur des échantillons contenant de la Rubisco purifiée par FPLC. Cette relation a été aussi utilisée par GALMÉS et al. (2005) dans le suivi d'une méthode d'obtention de la Rubisco hautement purifiée par chromatographie d'échange d'ions et filtration par gel. Dans tous les cas, le manque de sélectivité de cette technique fait que son application est destinée à des milieux extrêmement purifiés ou pour faire un suivi semi-quantitatif qui doit prendre en compte les interférences avec d'autres composés présents dans les milieux et qui absorbent à la même longueur d'onde.

Basée sur le principe de l'interaction sélective entre un anticorps et sa protéine associée, la méthode immuno-enzymatique ELISA est une technique qui a aussi été employée pour la quantification de la Rubisco obtenue à partir de divers végétaux tels que les feuilles de pomme de terre et différentes variétés d'orge (METODIEV et DEMIREVSKA-KEPOVA 1992; CATT et MILLARD 1988). Selon METODIEV et DEMIREVSKA-KEPOVA (1992) cette technique a été proposée comme une alternative à la méthode de quantification de Rubisco par détermination de son activité catalytique, en prenant en compte que l'activité enzymatique est dépendante de l'activation de l'enzyme et des conditions environnementales pendant l'échantillonnage. La méthode d'ELISA a également été utilisée par GROSS et al. (1993) pour la détermination de la concentration de Rubisco purifiée par exclusion stérique et destinée à la génération d'un anticorps spécifique chez le lapin.

Parmi les techniques de détection ou d'identification de protéines, une des plus connues et utilisées pour l'analyse de mélanges de protéines est l'électrophorèse sur gel. La méthode repose sur la capacité des protéines (sous l'action d'un champ électrique) de se déplacer en fonction de leur charge et de leur encombrement à cause des mailles constituant le gel. Le système le plus utilisé pour l'analyse d'un mélange de protéines est le gel SDS-PAGE. Cette technique a été utilisée depuis plusieurs années dans différents travaux afin de confirmer la présence de la Rubisco, grâce à la détection des sous-unités constituant la molécule, et de déterminer son degré de pureté (JOHAL 1982; MERODIO et SABATER 1988; KERFAI et al. 2011b; KERFAI et al. 2011a) c'est ainsi que la plupart du temps, l'électrophorèse a été utilisée en accompagnement d'une autre technique de dosage de protéines comme par exemple la détermination du taux d'azote par la méthode de Kjeldahl ou la spectrophotométrie (KOSCHUH et al. 2004; CARMO-SILVA et SALVUCCI 2011). Dans une étude dédiée à l'extraction et à la purification de la Rubisco à partir de feuilles de blé, par chromatographie d'échange d'ions à l'échelle analytique, le dosage de la Rubisco a été effectué par électrophorèse (SUAREZ et al. 2011). Le traitement des gels est réalisé par une analyse de densitométrie et d'image, afin de mesurer la teneur en Rubisco, sur la base de la détection de la grande sous-unité de la protéine.

Plus récemment, la SEC a été utilisée comme technique de détection et mesure de la Rubisco (KERFAI et al. 2011b; MARTIN et al. 2014; DE JONG et al. 2015). KERFAI et al. (2011b) ont développé une méthode d'identification et de quantification de la Rubisco dans

des extraits de plantes par chromatographie à haute pression d'exclusion stérique (en anglais High Pressure Liquid Chromatography (HPLC))-SEC, couplée à une détection UV-Vis à une longueur d'onde de 280 nm. Cette méthode permet d'analyser différents milieux complexes, tels que les jus végétaux. DE JONG et al. (2015) ont aussi utilisé la chromatographie d'exclusion avec une colonne Superdex 200 (GE) afin d'évaluer la teneur en Rubisco dans différentes fractions générées à partir de la purification des extraits de feuilles de betterave. Les résultats obtenus ont été confirmés par des analyses par spectrophotométrie UV-Vis.

L'HPLC-SEC présente néanmoins quelques inconvénients. Le plus important est probablement le temps nécessaire à une mesure, qui rend très lourde l'exploitation des résultats. La sélectivité des méthodes est aussi parfois limitant car dans ces milieux complexes la mesure peut subir des interférences. Dans ce travail, cette technique constituerait a priori une méthode adéquate pour l'identification et la quantification de la Rubisco, étant donné que la Rubisco est probablement la protéine de masse moléculaire la plus haute dans les jus (KERFAI et al. 2011b) et son pic apparaît dans le chromatogramme, relativement bien résolu.

Enfin, la Bio-Layer Interferometry (BLI®, Forte Bio-Pall), est une méthode développée en 2005, qui repose sur le principe de l'interférométrie en lumière blanche pour suivre les caractéristiques d'une liaison protéine-protéine, généralement antigène-anticorps (DELIS 2015). Cette technique peut être utilisée pour le dosage d'une protéine spécifique présente dans un milieu complexe, car celle-ci est associée de manière unique à un anticorps, ce qui rend cette technique très sélective. Elle a aussi l'avantage d'être rapide (2 à 3 minutes par mesure) et simple à utiliser, une fois que la méthode a été développée. La BLI se présente donc comme une alternative très avantageuse en raison de sa sélectivité, mais surtout de sa rapidité d'analyse, comparée à toutes les autres techniques d'analyse de protéines.

Ces deux méthodes analytiques, l'HPLC-SEC et le BLI, ont été mises en œuvre dans le cadre de ce travail afin de mesurer la concentration en Rubisco dans les différents types d'échantillons issus du procédé. Pour cela, la production d'un échantillon de Rubisco pure par chromatographie préparative d'exclusion de taille a été nécessaire (SEC). Dans la mise en œuvre, des jus de luzerne atomisés et reconstitués ont été utilisés, car l'alimentation des jus bruts présentait de nombreuses difficultés, dont la plus importante est le colmatage de la colonne. Or le séchage par atomisation s'avère une méthode adaptée à la conservation des jus bruts (cet aspect sera développé dans le paragraphe 5.3.3 de ce chapitre), mais en plus le jus obtenu après reconstitution, et contrairement au jus brut, présente des caractéristiques mécaniques (écoulement, adhésion) adéquates pour son utilisation dans les procédés, comme l'avait aussi montré le travail de KERFAI (2011).

Dans cette section, la préparation de l'échantillon de Rubisco pure est d'abord présentée. Les échantillons de Rubisco pure obtenus serviront à établir les courbes d'étalonnage pour l'HPLC-SEC. Les méthodes analytiques seront alors développées et la validation des résultats, faite par analyse des échantillons de Rubisco purifiée (produite dans le cadre de ce projet ou commercial), permettra de conclure sur les contraintes de leur utilisation et leur intérêt.

## 4.2 Purification de Rubisco par Chromatographie préparative d'exclusion de taille

Bien que la chromatographie préparative d'exclusion de taille ne soit pas considérée comme pouvant être transposée à l'échelle industrielle, elle a été appliquée depuis les années 80 à la purification des protéines à l'échelle du laboratoire. Elle avait déjà été référencée par BARBEAU et KINSELLA (1988) comme une des techniques permettant d'isoler la Rubisco d'un jus végétal, afin d'obtenir quelques milligrammes de protéine. En effet, comme déjà indiqué, la taille moléculaire de la Rubisco permet d'avoir un pic bien résolu si les conditions expérimentales sont adéquates.

Selon JANSON (2012) la façon habituelle de réaliser une expérience chromatographique par SEC implique l'introduction d'un petit volume d'échantillon à l'entrée de la colonne, afin d'obtenir des largeurs de pics plus faibles. Toutefois l'auteur signale que dans le cas de la chromatographie à une échelle préparative, des largeurs de pics plus importantes peuvent être tolérées, ce qui permet l'introduction d'un plus grand volume d'échantillon. La figure II.4 permet d'illustrer l'influence du volume d'alimentation de l'échantillon dans la forme des pics dans la chromatographie préparative.

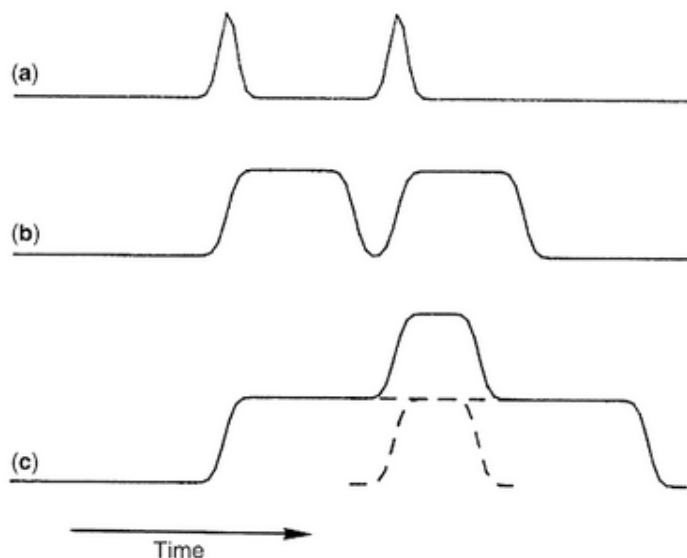


FIGURE II.4 – Influence de la taille de l'échantillon sur la chromatographie préparative (a) Echantillon de petite taille (chromatographie analytique) (b) Taille d'échantillon optimisée par rapport à la capacité maximale (c) Taille d'échantillon trop importante. (JANSON 2012)

Le principe de la séparation par chromatographie d'exclusion stérique sera davantage développé lors de la description de la technique de dosage par HPLC-SEC. La différence des deux approches est principalement liée à l'objectif de la séparation.

#### 4.2.1 Matériel et méthodes

L'appareillage utilisé pour la purification de la Rubisco par SEC préparative consiste principalement en une colonne HiPrep™16/60 (16 mm de diamètre interne et 60 cm de longueur) de 120 mL de volume, pacquée avec le média Sephacryl®S-300 HR (GE Healthcare LS) avec un intervalle de fractionnement de 10 à 1500 kDa (protéines globulaires). Une pompe péristaltique permettant l'alimentation de l'éluant ainsi que celle de la solution à traiter, un spectrophotomètre avec détection UV et un collecteur de fractions complètent le système.

Avant l'alimentation de la solution à purifier la colonne est équilibrée avec une solution de tampon phosphate à 50 mmol et pH 7,5. Le jus reconstitué est préparé et remis en suspension dans l'eau ultra pure du jus séché par atomisation, avec un ratio de 10% de matière sèche (cf. paragraphe 5.3.3 de ce chapitre). Le jus est centrifugé et préfiltré (0,45 µm) avant utilisation.

Pour ce type de colonne le volume maximum d'échantillon alimenté préconisé est de 4% du volume de la colonne (5 mL). Dans notre cas, le but étant de séparer uniquement la Rubisco, des essais ont été réalisés en introduisant un volume de 5 mL mais aussi de 10 mL afin d'augmenter la productivité de la séparation, c'est-à-dire la masse de Rubisco purifiée et récupérée.

Les débits d'alimentation de l'échantillon et de la solution tampon, égaux, ont été fixés à 1 mL/min. Après cela, l'élution est poursuivie avec la solution tampon phosphate. Le suivi de la séparation est effectué par mesure de l'absorbance à 280 nm à la sortie de la colonne et les fractions collectées, sont stockées à 4°C pour une analyse postérieure par HPLC-SEC et SDS-PAGE.

#### 4.2.2 Résultats et discussion

La figure II.5 présente les courbes de l'absorbance mesurée à la sortie de la colonne en fonction du volume de la solution tampon passé pour les deux volumes de jus alimentés.

Trois pics ont été identifiés dans le jus alimenté, bien que sur la figure II.5 seuls les deux premiers ont été totalement représentés. Le troisième pic est moins intéressant pour notre travail car il représente un regroupement de molécules de tailles plus petites, raison pour laquelle il n'est pas davantage développé. Une comparaison qualitative des deux profils (courbes A et B) montre des résolutions de pics relativement proches quel que soit le volume d'échantillon injecté, raison pour laquelle le volume de 10 mL a été retenu.

Comme cela sera montré ultérieurement (paragraphe 4.3 de ce chapitre), les deux premiers pics ont été identifiés comme étant de la Rubisco, le premier sous la forme d'agrégats (pic élué à 45 mL) et le deuxième sous la forme monomère (pic élué à 62 mL). Comme on verra par la suite, le fractionnement d'échantillons de chaque pic, en évitant la zone de recouvrement, a permis de séparer et d'étudier les deux formes possibles de la Rubisco présentes dans les jus.

De même, des analyses par HPLC-SEC ont permis de déterminer que dans les conditions

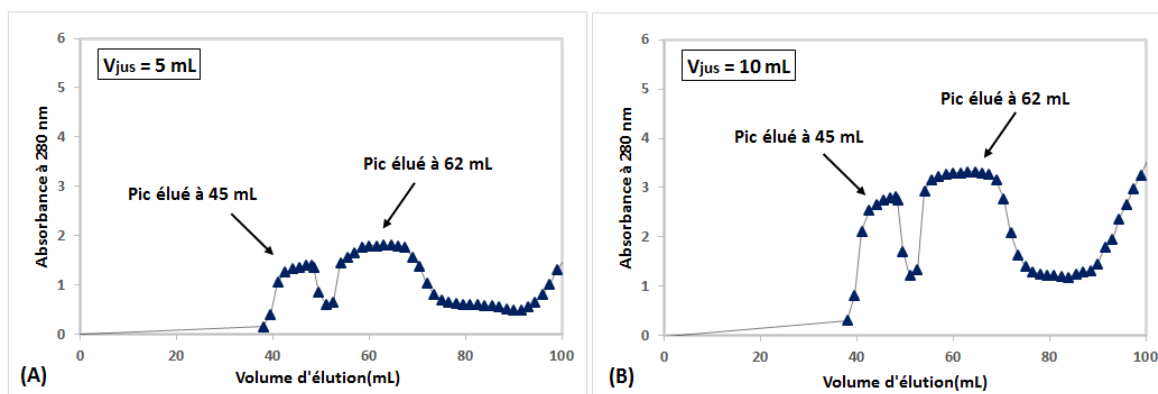


FIGURE II.5 – Suivi de l’absorbance en fonction du volume d’éluant pour la séparation de la Rubisco contenue dans des jus atomisés et reconstitués par SEC dans une colonne HiPrep™16/60 Sephacryl®S-300. (A) Volume d’échantillon alimenté 5 mL. (B) Volume d’échantillons alimenté 10 mL

de salinité de la solution tampon phosphate (conductivité 0,63 mS/cm) et de pH 7,5 la Rubisco purifiée par SEC se maintient stable pendant plusieurs semaines (résultat non montré).

### 4.3 Dosage de la Rubisco par HPLC-SEC

La chromatographie d’exclusion stérique est une méthode chromatographique qui permet la séparation de substances en fonction de leur différence de taille. Les molécules sont transportées par une phase mobile dans une colonne contenant un gel poreux (phase stationnaire). Les molécules de taille plus grande, qui sont exclues des pores, seront éluées d’abord tandis que celles de taille plus faible, pouvant pénétrer dans les pores du gel, seront retenues et ensuite éluées plus ou moins rapidement en fonction de leurs tailles. Chaque molécule est donc associée à un volume d’élué  $V_e$  en relation avec sa taille donc généralement, sa masse molaire (Masse molaire (MW)).

Le travail réalisé par KERFAI et al. (2011b) a permis d’établir une méthode spécifique d’identification et quantification par HPLC-SEC pour la Rubisco. Pour cela des standards de protéines de poids moléculaires différents ont été utilisés pour la calibration de la colonne à 280 nm. Parmi eux, un standard commercial de la Rubisco d’épinard partiellement purifié provenant de Sigma-Aldrich. La figure II.6 présente un chromatogramme obtenu par analyse en HPLC-SEC du standard commercial qui confirme la présence d’autres composés de masse moléculaire plus faible.

Une fois le volume de rétention de la protéine déterminé, des étalons de Rubisco ont permis de proposer une droite d’étalonnage. Pour la réalisation des étalons, la protéine commerciale a été ré-purifiée par dialyse. L’incertitude finale des analyses a été considérée d’environ 10% compte tenu de la pureté initiale de la protéine et du traitement appliqué (KERFAI et al. 2011b).



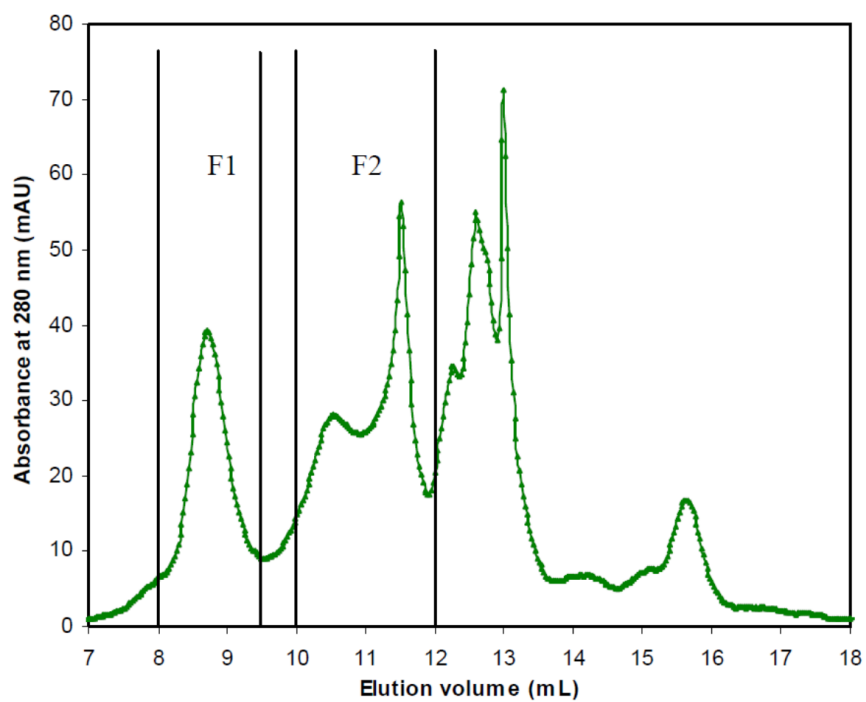


FIGURE II.6 – Chromatogramme obtenu par analyse HPLC-SEC du standard commercial de Rubisco d'épinard partiellement purifiée (Sigma-Aldrich). F1 est la fraction ayant un MW près de 570 kDa et la fraction de F2 de MW entre 60 et 6 kDa (KERFAI et al. 2011b)

Pour que la mesure par absorbance à 280 nm des pics isolés puisse permettre la quantification, elle doit être corrélée de manière spécifique à la teneur en Rubisco de l'échantillon. Or les jus végétaux contiennent d'autres composés, notamment d'autres protéines et des polyphénols, qui absorbent aussi à 280 nm. Par exemple, la séparation par taille des constituants devrait assurer l'absence de telles interférences par des molécules de plus petite taille, sauf si des liaisons entre des molécules petites et la Rubisco se forment, sans altérer le volume d'élu-tion de la protéine, mais modifiant son coefficient d'extinction. D'après la littérature (SYNGE 1975; JERVIS et PIERPOINT 1989; RAWEL et al. 2007; BOUYER et al. 2012), les polyphé-nols notamment peuvent former des liaisons covalentes et non-covalentes avec la Rubisco et peuvent donc conduire à des interférences. Il est donc important de considérer la possibilité de telles interactions dans les conditions de travail et de vérifier si le pic associé à la Rubisco correspond bien à la protéine pure.

Puisque les polyphénols de type flavonoïdes, très présents dans les jus végétaux, absorbent à 280 et à 340 nm (RAMBOURG et MONTIES 1983), MARTIN et al. (2014) ont utilisé le rapport d'absorbances mesurées par analyse UV à ces deux longueurs d'onde sur une solution de Rubisco purifiée, afin de déterminer la présence de polyphénols dans la solution. Dans cette étude, du fait que la Rubisco n'absorbe pas à 340 nm, ce rapport a permis d'identifier si les polyphénols avaient été complètement éliminés.

Dans cette section, la présence de la molécule d'intérêt dans les échantillons sera confir-mée, grâce au volume d'élu-tion donné par la méthode et leur pureté vis-à-vis de la méthode d'analyse sera vérifiée. Dans un deuxième temps, la réalisation d'une droite de calibration permettra de déterminer la concentration de la Rubisco dans les différentes fractions. Une analyse plus globale du profil de l'échantillon peut permettre aussi d'identifier la présence d'autres composés, dont on ne connaîtra pas la nature, mais dont il sera possible d'estimer leur taille, grâce à leur volume d'élu-tion si le pic est bien résolu.

#### 4.3.1 Matériel et méthodes

Le système utilisé est un chromatographe à haute pression AKTA Purifier (GE Healthcare) couplé à un détecteur UV et la colonne chromatographique employée est une KW-804 (Shodex, Japon). Les conditions analytiques décrites dans le tableau II.7 sont basées sur la méthode mise en place par KERFAI et al. (2011b). L'acquisition de données ainsi que le traitement des résultats est effectué par le logiciel UNICORN 5.1®(GE Healthcare).

Tableau II.7 – Conditions opératoires utilisées lors de l'analyse HPLC-SEC pour le dosage de protéines

Limite d'exclusion colonne (KW-804)	$10^3$ - $10^6$ Da
Pression maximale dans la colonne	5 MPa
Composition phase mobile	Tampon phosphate 4mM, 25 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 6,8
Débit	1 mL/min
Longueur d'onde	280 nm
Volume d'injection	0,1 mL

Avant emploi, la phase mobile est filtrée sous vide dans un système Büchner équipé d'une membrane Uptidisc Nylon de 4,7 mm de diamètre et de 0,45 µm de taille de pores (Merk-Millipore, France) et à l'aide d'une pompe à membrane chimique (VWR, France).

#### 4.3.2 Analyse qualitative. Détermination du volume d'élution de la Rubisco

Différentes protéines standards de poids moléculaire connu sont utilisées pour déterminer le volume d'élution de la Rubisco. Chaque protéine est analysée dans les conditions indiquées dans le tableau II.7, afin de déterminer son volume d'élution. L'équation II.1 permet d'ajuster la droite reliant les poids moléculaires des différentes protéines (voir tableau II.8) à leur volume d'élution respectif.

Tableau II.8 – Marqueurs pour l'étalonnage de la colonne HPLC-SEC

Protéine	MW kDa)	$V_{élution}$
Aprotinine	6,5	11,8
Ribonucléase	13,7	11,43
Carbonique anhydrase	29,0	11,2
Ovalbumine	43,0	10,84
Conalbumine	75,0	10,49
Aldolase	158,0	10,19
Ferritine	440,0	9,51
Thyroglobuline	669,0	8,5

$$\log MW = -0,6316 \times V_{élution} + 11,45 \quad (R^2 = 0,945) \text{ pour } 6 \text{ kDa} < MW < 1000 \text{ kDa} \quad (\text{II.1})$$

avec MW : masse molaire en Da

$V_{élution}$  : volume d'élution (en mL) d'une protéine de masse molaire MW

##### 4.3.2.i Analyse d'échantillons commerciaux de Rubisco d'épinards

Afin de déterminer le volume d'élution de la Rubisco, deux standards commerciaux de Rubisco d'épinards ont été utilisés en tant que molécule de référence (KERFAI 2011).

Le premier est le standard de Sigma Aldrich présenté précédemment, dans lequel la Rubisco est partiellement purifiée mais dont la pureté (variable selon les lots) n'est pas donnée par le fabricant. Il est conditionné en forme de poudre. Une solution de ce standard est préparée à une concentration de 3 g/L. Le deuxième standard, provenant d'Antibodies-online.com<sup>4</sup>, est une solution contenant de la Rubisco à 1,2 g/L (pureté supérieure ou égale à 95%), conditionnée dans une solution tampon phosphate à pH 7,0. Les deux solutions ont été analysées

4. <https://www.antibodies-online.com/>

par HPLC-SEC dans les mêmes conditions opératoires, indiquées dans le tableau II.7. La figure II.7 montre un chromatogramme de l'analyse des deux standards.

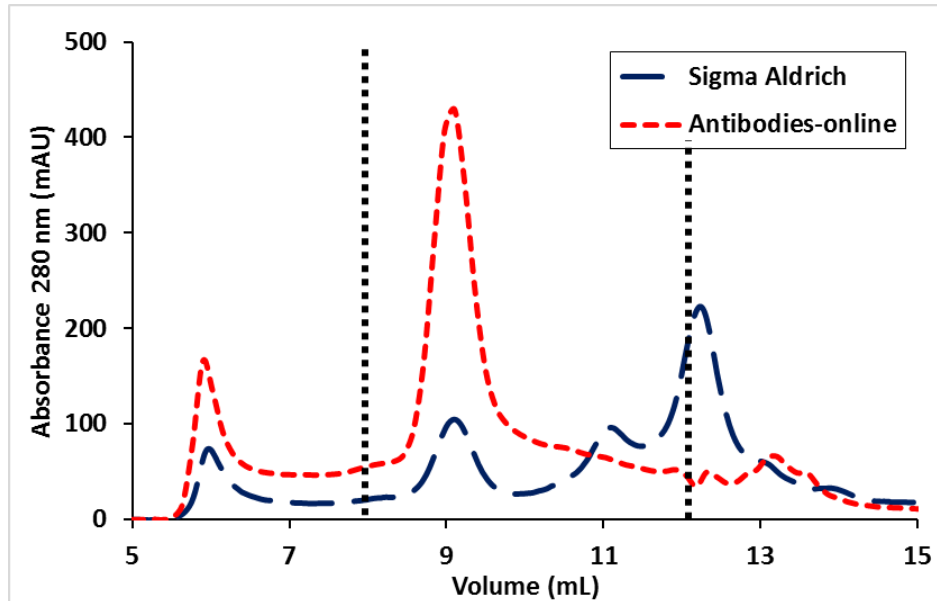


FIGURE II.7 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des 2 standards commerciaux de Rubisco d'épinard. La zone délimitée par les lignes verticales pointillées correspond à la zone de masses molaires utilisables dans l'équation II.1

Les deux chromatogrammes révèlent la présence de deux pics communs : le premier à un volume d'élution de 6 mL et le deuxième à 9,03 mL. D'après l'équation II.1 le pic élué à 9,03 mL correspond à une masse molaire de 558 kDa, valeur qui concorde bien avec la masse molaire de la Rubisco (560 kDa).

La masse molaire du pic élué à 6,0 mL ne peut pas être calculée par cette relation car ce volume d'élution se trouve en dehors de la zone de masses molaires d'exclusion de la colonne, c'est-à-dire supérieur à 1000 kDa. La Rubisco ayant la capacité de s'agréger et former des oligomères (dont la masse molaire sera bien supérieure à celle de la Rubisco), ce pic pourrait correspondre à des agrégats de Rubisco.

Sur le chromatogramme du standard Sigma-Aldrich d'autres composés sont élués entre 11 et 13 mL qui correspondent à des masses molaires en dessous de 32 kDa. D'autres composés sortent de la gamme de tailles prises en compte par l'équation II.1.

Il est important de signaler que la répétition des analyses de ces standards montre qu'ils sont peu stables dans le temps.

#### 4.3.2.ii Analyse des fractions obtenues par traitement SEC d'un jus de luzerne reconstitué

Pour établir une courbe de calibration, des solutions de concentrations différentes et connues de Rubisco doivent être analysées afin d'établir une relation entre la concentration théorique de la protéine en solution et la surface du pic obtenu au volume d'élution correspondant.

Compte tenu de nombreuses difficultés (concentration initiale mal connue, instabilité, présence de plusieurs pics dans les chromatogrammes potentiellement associés à la Rubisco) liées à l'utilisation des standards commerciaux pour la préparation de solutions étalons de Rubisco, l'utilisation des fractions de Rubisco purifiées par SEC à partir du jus de luzerne a été privilégiée (cf. paragraphe 4.2 de ce chapitre).

Dans la figure II.8 les chromatogrammes de deux fractions (appelées fraction SEC éluee à 45 mL et fraction SEC éluee à 62 mL) obtenues lors du traitement par SEC d'un échantillon de jus de luzerne atomisé et reconstitué sont représentés et comparés au chromatogramme d'un échantillon du même jus.

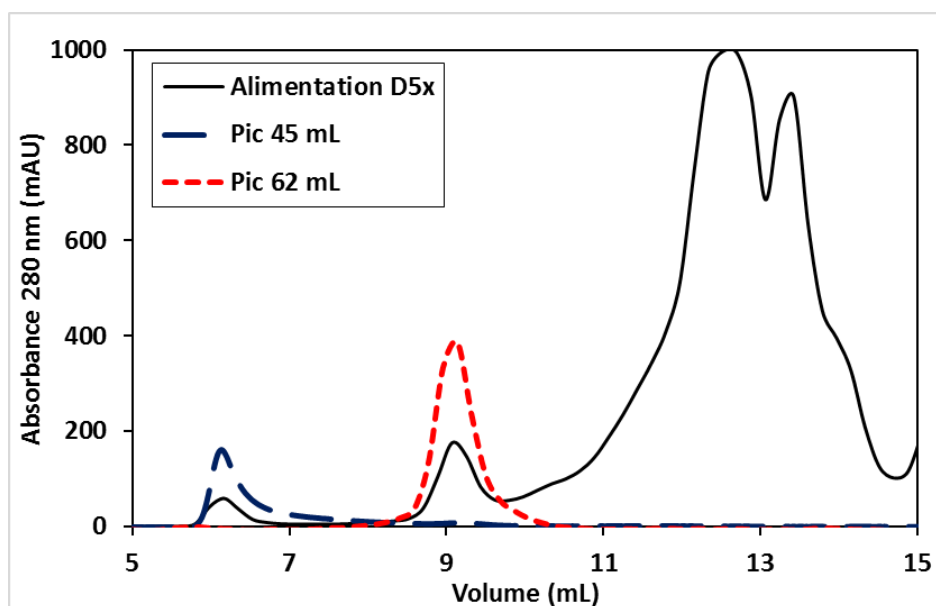


FIGURE II.8 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des 2 premiers pics séparés par SEC, ainsi que du jus de luzerne alimenté (dilué 5 fois)

La superposition des différents chromatogrammes de la figure II.8 met en évidence que la fraction SEC éluee à 62 mL correspond bien au monomère de Rubisco, puisqu'il est élué dans l'HPLC-SEC à 9,03 mL. Cette fraction apparaît en plus très pure puisque aucun autre pic n'a été détecté dans cet échantillon.

Pour compléter la caractérisation de cette fraction, il a été considéré nécessaire de vérifier

que la détection de la molécule à 280 nm est associée à la présence d'une Rubisco pure, sans association avec d'autres molécules telles que les polyphénols, qui pourraient modifier le coefficient d'extinction molaire de la Rubisco à 280 nm.

Pour cela, lors de l'analyse chromatographique de la fraction SEC éluée à 62 mL et du jus d'alimentation, l'absorbance à 340 nm a été mesurée en même temps que celle à 280 nm, et les deux profils obtenus sont comparés. Dans la figure II.9 les différents chromatogrammes obtenus ont été représentés.

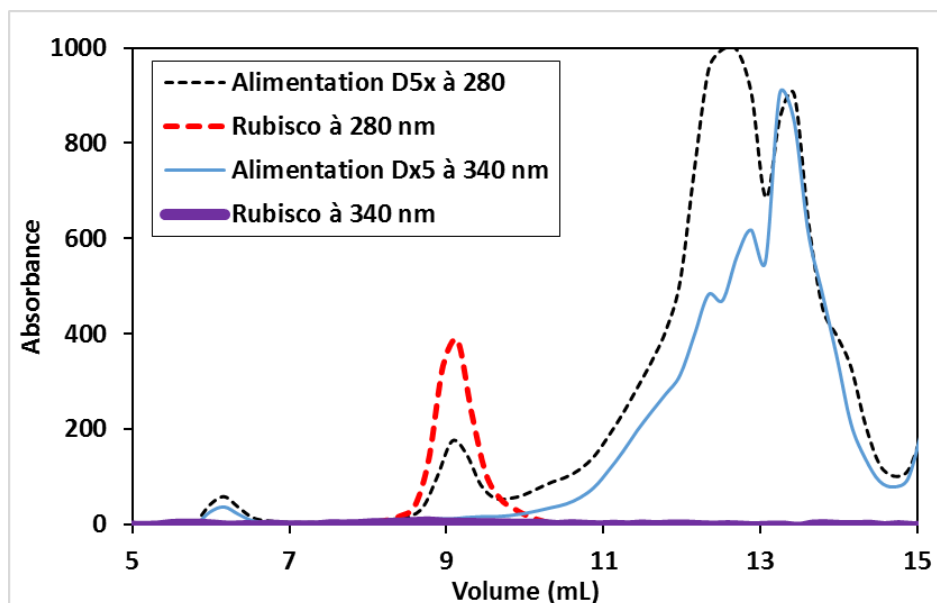


FIGURE II.9 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC avec détection à 280 et 340 nm de la fraction SEC éluée à 62 mL (considérée être de la Rubisco purifiée) et du même jus reconstitué (dilué 5 fois)

Comme il peut être observé dans la figure II.9, aucun pic n'a été détecté lors de l'analyse à 340 nm de la fraction de SEC éluée à 62 mL. De ce fait, cette fraction est considérée comme de la Rubisco pure en solution, où les seuls composés présents en plus de la Rubisco sont les sels de la solution tampon qui ont servi d'éluant lors de la séparation et dont la concentration était de 7,1 g/L.

Dans la figure II.8, le pic correspondant à la fraction SEC éluée à 45 mL correspond à un pic présent dans les deux chromatogrammes de la Rubisco commerciale. Il semble donc intéressant de connaître la nature chimique de ce pic afin de confirmer s'il s'agit, ou pas, des agrégats de la Rubisco. Dans ce but, des analyses en SDS-PAGE dans des conditions dénaturantes ont été réalisées sur cette fraction, mais aussi sur la fraction de Rubisco purifiée (fraction SEC éluée à 62 mL), afin de confirmer la présence des deux sous-unités de la protéine. Pour cela, les différentes bandes séparées seront comparées aux marqueurs de masses molaires connues et aux bandes obtenues avec de la Rubisco commerciale. Les masses molaires des marqueurs utilisés et les profils électrophorétiques obtenus en SDS-PAGE sont montrés dans la figure II.10.

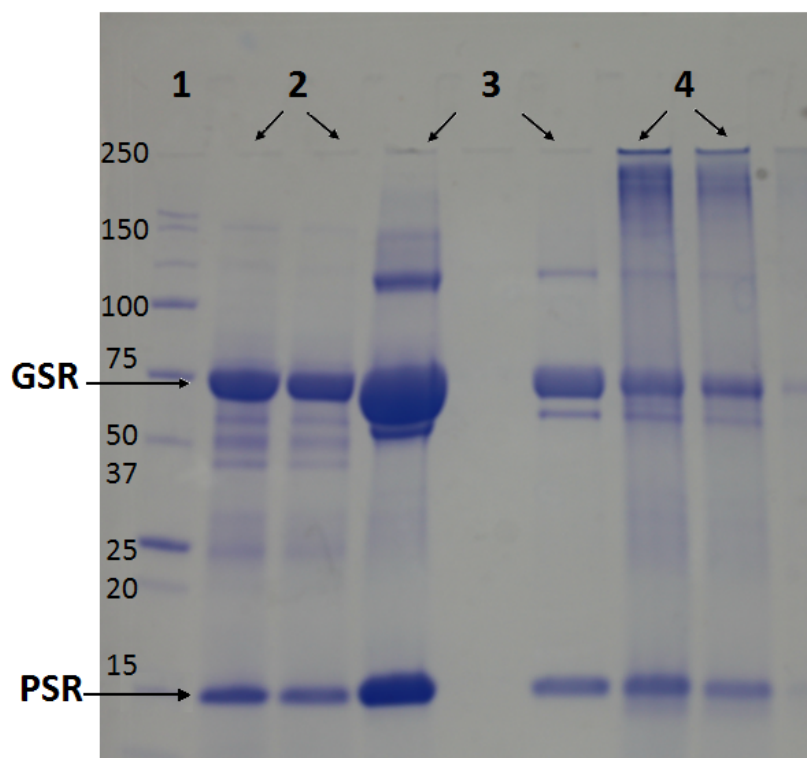


FIGURE II.10 – Analyse par SDS-PAGE 15% des fractions du jus de luzerne séparées lors du traitement par SEC d'un jus de luzerne atomisé et reconstitué. Ligne 1 : marqueurs MW ; lignes 2 : échantillons de Rubisco d'épinards commerciale (Sigma-Aldrich) ; lignes 3 : fraction SEC éluée à 62 mL ; lignes 4 : fraction SEC éluée à 45 mL. GSR : grande sous-unité de la Rubisco, PSR : petite sous-unité de la Rubisco

La figure II.10 montre que les bandes obtenues pour la solution de Rubisco commerciale sont les mêmes bandes révélées pour les fractions séparées par SEC. Elles sont associées à des valeurs de masses molaires proches de 58 et 14 kDa, valeurs des masses molaires des sous-unités de la Rubisco. Ce résultat confirme d'une part le résultat obtenu par HPLC-SEC concernant la fraction de Rubisco purifiée et d'autre part l'hypothèse que la fraction SEC éluée à 45 mL, et identifiée à un volume d'éluion de 6 mL en HPLC-SEC, correspond à de la Rubisco agrégée, puisque sous l'effet de dénaturation, les deux sous-unités sont pratiquement les deux seules bandes identifiées.

### 4.3.3 Analyse quantitative. Courbe de calibration de la Rubisco

La fraction SEC éluée à 62 mL étant une solution de Rubisco pure, elle a été utilisée pour l'établissement de la courbe de calibration en HPLC-SEC. Pour déterminer la teneur en Rubisco de cette solution, des mesures de teneur en matière sèche MS (%) ont été réalisées en triplicata. La masse séchée déterminée correspond à l'addition des masses de sels et celle de la Rubisco. Le détail des calculs de ces résultats ainsi que la validation de cette méthode seront détaillés dans le paragraphe 4.3.4 de ce chapitre.

Ainsi, la teneur en Rubisco de la solution purifiée déterminée par mesure de MS est de 2,16 g/L. La surface obtenue par analyse HPLC-SEC de cette solution est de 257,4 mAU.mL.

La construction d'une courbe de calibration nécessite d'autres points supplémentaires déterminés à partir de solutions de concentrations différentes, préparées avec la même méthode de référence. Dans ce travail, ce principe n'a pas pu être appliqué et les étalons préparés ont été quantifiés avec des méthodes différentes : mesure de masse sèche à l'étuve, mesure de masse sèche après lyophilisation et mesure de l'azote Kjeldahl (NTK) de l'échantillon (paragraphe 4.3.4 de ce chapitre). Finalement, la relation établie par analyse des différentes solutions de Rubisco purifiée et analysées est indiquée dans l'équation II.2. La droite de calibration correspondante est présentée dans la figure II.11.

$$C = 84 \times 10^{-4} \times S \quad (\text{II.2})$$

avec C : concentration de Rubisco en g/L

S : surface du pic chromatographique en mAU.mL

Cette relation permet le dosage de la Rubisco sur différents types d'échantillons. Bien que la nature physico-chimique des échantillons (notamment le pH, par exemple) puisse influencer l'absorbance mesurée, le volume d'échantillon à analyser est très faible et se trouve dilué dans le flux d'éluant. Ce sont donc les conditions de l'éluant qui s'imposent et la mesure peut être réalisée même si les conditions de l'échantillon ne sont pas identiques à celles de l'échantillon de référence.

La difficulté de disposer des échantillons de Rubisco pure a limité par ailleurs l'étude des



paramètres de validation de cette méthode (limites de détection et quantification, incertitude...).

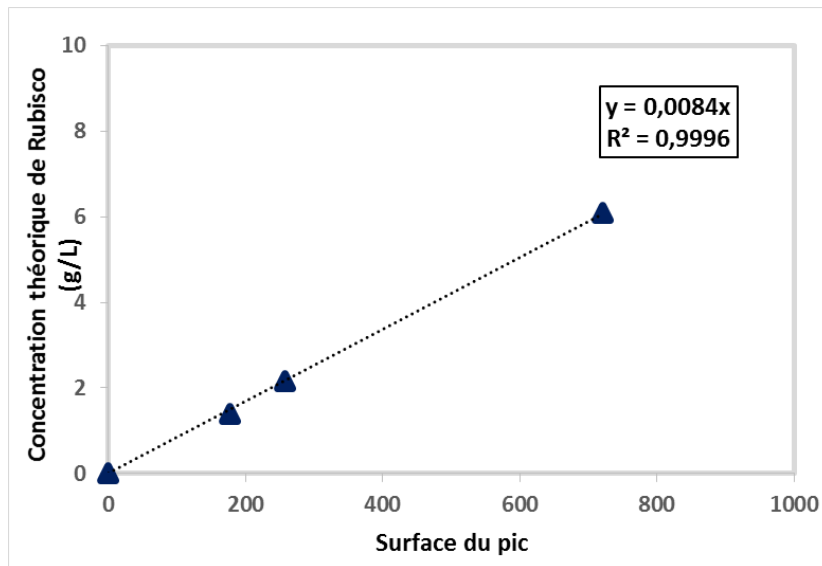


FIGURE II.11 – Droite d'étalonnage pour l'analyse de la concentration de Rubisco en solution par HPLC-SEC à partir des surfaces de pics élués à 9,03 mL

L'établissement d'une droite d'étalonnage pour la quantification du pic à 6 mL serait intéressant pour permettre un dosage total de la Rubisco présente dans les jus. Cependant, ce pic étant strictement en dehors de l'intervalle de mesure de la colonne, il n'a pas été fait ici. Une colonne d'une taille plus appropriée pourrait permettre ce dosage.

#### 4.3.4 Validation des techniques analytiques mises au point

Comme il a été indiqué auparavant, l'utilisation d'autres méthodes permettant de connaître précisément la teneur en Rubisco des échantillons s'avère nécessaire en raison de la non-disponibilité d'un standard de Rubisco de concentration connue et de stabilité suffisante. Elles ont permis de déterminer la concentration en Rubisco des échantillons purifiés, dont les seuls autres constituants sont les sels provenant du tampon utilisé, de concentration connue. La démarche générale suivie est : après l'étape de purification, la solution contenant la Rubisco est analysée par HPLC-SEC afin de vérifier sa pureté, puis sa concentration est établie par HPLC-SEC, et la teneur en Rubisco est déterminée par une des méthodes décrites par la suite.

##### 4.3.4.i Détermination de la teneur en Matière sèche

La matière sèche (MS) constitue la partie d'un produit qui reste une fois que l'eau en a été totalement retirée. La teneur de matière sèche d'une solution de Rubisco purifiée est déterminée par 2 méthodes : séchage par lyophilisation et séchage dans une étuve à 105°C.

Dans les deux cas la teneur en matière sèche correspond à la somme des teneurs massiques en Rubisco et en sels phosphate. Or, comme indiqué par ailleurs, la valeur de la concentration (et donc la masse) en sels est connue. Pour chaque détermination de masse d'un échantillon de Rubisco purifiée, un blanc contenant uniquement la solution tampon a été utilisé. Les deux solutions sont traitées en même temps.

**4.3.4.i.a Lyophilisation** Ce procédé de séchage à froid est, en général, utilisé car il permet de conserver les propriétés biologiques de molécules. L'équipement utilisé est un Christ Martin, modèle Alpha 2-4 -85°C. L'opération est réalisée en trois étapes :

- Congélation d'une masse connue ( $m_{hL}$ ) de la solution à sécher à -20°C.
- Sublimation effectuée sous vide, où l'eau interstitielle contenue dans le produit passe de l'état solide à l'état gazeux. Cette étape est réalisée à une température de 0°C ;
- Séchage final toujours sous vide à une température de maximum 50°C afin d'éliminer par désorption l'eau fixée à la surface du produit. L'humidité résiduelle finale du produit est comprise entre 4 et 6%. Après séchage l'échantillon est pesé ( $m_{sL}$ )

**4.3.4.i.b Séchage dans une étuve** Elle est déterminée par séchage de l'échantillon dans une étuve ventilée. Pour cela, une masse de l'échantillon ( $m_{ch}$ ) est pesée précisément dans un creuset en porcelaine, préalablement séché et pesé vide ( $m_o$ ). Le creuset est laissé dans une étuve à 105°C jusqu'à obtenir par différentes pesées une masse d'échantillon constante ( $m_{cs}$ ).

#### **4.3.4.ii Détermination de l'azote total par la méthode de Kjeldahl**

Les protéines étant constitués d'acide-aminés, le dosage de l'azote d'un échantillon est un de méthodes les plus classiques de déterminer la teneur en protéines de l'échantillon. Un facteur de 6,25, couramment employé pour les protéines (DOUILLARD et al. 1990 ; INCAMPS et al. 2005 ; KAPEL et al. 2006), est utilisé pour convertir la teneur en azote en teneur en protéines.

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl (NTK). L'équipement utilisé est un minéralisateur K-425 et une unité de distillation K-350, (Büchi), couplée à un titreur METROHM. Le principe de la méthode consiste à minéraliser l'échantillon en milieu acide sulfurique en présence de cuivre(II) et d'un catalyseur (oxyde de titane). Dans ces conditions de minéralisation, l'azote organique se retrouve sous forme d'ions ammonium. Ces derniers sont transformés en ammoniac par ajout de soude et un entraînement à la vapeur d'eau permet d'extraire l'ammoniac. Le dosage acidobasique du condensât recueilli permet de déterminer la quantité d'azote présent dans l'échantillon. Pour ces expériences la solution de Rubisco a été diluée d'environ 10 fois dans l'eau distillée avant l'étape de minéralisation.

#### 4.3.4.iii Comparaison des résultats des différentes méthodes

Le tableau II.9 résume les résultats de la détermination par les trois méthodes indiquées de la teneur en Rubisco des fractions de Rubisco purifiées par SEC et analysés par HPLC-SEC. L'accord entre les mesures de masse sèche et d'azote et les analyses HPLC-SEC montrent un bon accord, ce qui permet de valider la méthode d'analyse.

Tableau II.9 – Teneurs en protéine des solutions de Rubisco purifiées déterminées par 3 méthodes et comparaison avec l'analyse HPLC-SEC

Méthode d'analyse	Séchage Étuve		Lyophilisation		NTK
Échantillon	%MS	Conc. Rubisco (g/L)	%MS	Conc. Rubisco (g/L)	Conc. Rubisco (g/L)
Blanc	0,709	-	0,715	-	-
Rep1	0,923	2,14	1,27	5,55	1,15
Rep2	0,925	2,16	1,37	6,55	1,65
Rep3	0,928	2,19	1,33	6,15	-
Moyenne		2,16		6,08	1,40
Écart type		0,03		0,50	0,35
%CV		1,16		8,27	25,25
Surface pic HPLC-SEC (mAU*mL)		257,14		720,68	177,22
Conc. Rubisco selon HPLC-SEC (g/L)		2,2		6,1	1,5

## 4.4 Dosage de la Rubisco par BLI

### 4.4.1 Introduction

La récente découverte de la technique BLI, apparue pour la première fois dans l'année 2005 (par ForteBio, aujourd'hui Pall Corporation), a ouvert les portes à diverses applications dans le domaine de la détection et quantification de biomolécules, plus précisément des protéines. Basée sur les interactions spécifiques protéine-protéine (généralement anticorps-antigène), il est possible de cibler une protéine spécifique qui se trouve dans un milieu complexe, grâce à l'utilisation d'un dispositif nommé biocapteur. Le biocapteur joue un rôle fondamental car c'est sur sa surface qu'a lieu l'immobilisation de la protéine d'intérêt afin d'être quantifiée de façon sélective.

Le principe de BLI repose sur la mesure de l'interférence de deux faisceaux de lumière blanche produits à partir des deux surfaces différentes sur le biocapteur et qui se reflètent traversant deux distances différentes. Cette interférence est appelée interférence « modèle ». La première surface correspond à celle créée par une couche de molécules (anticorps) immobilisées sur la pointe du biocapteur et la deuxième correspond à une couche de référence interne. Lorsque le biocapteur est mis en contact avec la solution contenant la protéine d'intérêt, les molécules de la protéine interagissent avec celles de l'anticorps, provoquant un changement

de l'épaisseur de la couche de molécules immobilisées. Ceci entraîne un décalage par rapport à l'interférence « modèle » qui est proportionnel à l'épaisseur de la couche formée par les protéines fixées à l'anticorps.

A titre d'exemple, dans une étude réalisée par DO et al. (2008) la méthode BLI a été utilisée pour la détermination de la capacité de liaison dynamique de résines d'affinité destinées à la purification de protéines. Des extraits contenant de l'Immunoglobuline de type G, IgG, ont été analysés afin de déterminer la concentration de l'antigène avant et après passage par la colonne avec la résine, grâce à une courbe de calibration préalablement établie. Dans cette étude toutes les solutions analysées (échantillons et standards) ont été mesurées avec des Biocapteurs spécifiques à la protéine produits par Fortebio-Pall Corp. Les principaux avantages soulignés sont la non-destruction de l'échantillon analysé et la possibilité d'analyser des extraits bruts, non-traités ou clarifiés. Les auteurs signalent que cette technologie peut être appliquée à la mesure d'autres macromolécules, à condition de disposer d'une molécule de « capture » fixable sur les biocapteurs. Dans ce cas-là, les biocapteurs peuvent être « personnalisables ».

L'étude que nous présentons est une première approche de la mise en place d'une méthode de dosage de la Rubisco par BLI. Les principaux facteurs qui ont été considérés sont les conditions de préparation des biocapteurs spécifiques à la Rubisco, l'influence du milieu de l'échantillon (nature, pH), ainsi que le temps écoulé entre la préparation des solutions et les analyses. Ce travail a donné lieu à la publication scientifique ci-après, et donc les principaux résultats sont commentés par la suite.

#### 4.4.2 Publication

Bio-Layer Interferometry Method for Quantification of Rubisco in Plant Extracts

Maria A. Usta-Bony, Aurora Fernandez, Stéphane Mathé

LISBP, Université de Toulouse, INSA, INRA, CNRS, Toulouse, France

bony@insa-toulouse.fr

CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS VOL. 65, 2018

ISBN 978-88-95608- 62-4 ; ISSN 2283-9216

Biolayer interferometry (BLI) with biosensors has been tested for measuring the concentration of a protein in different media. Interferometry is based on the interference model of the light reflected by a surface. When the surface of an optical fibre is modified by a bounded compound, interference model changes as a function of the increase of the path length. This technique of protein quantification represents an alternative to the classical methods such as electrophoresis, spectrophotometry, immune-enzymatic tests (ELISA) or HPLC. The main advantages of this method are its specificity, its sensitivity and the promptness of the analysis. In this work, a measuring method for Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Oxydase (Rubisco) from different media has been developed. The most important conclusion is that Rubisco can be efficiently determined by this technique. Moreover, experimental results have shown the strong influence of pH on the measurements.

#### 4.4.2.i Introduction

The use of biomass for production of energy and chemicals is the object of a lot of studies as an answer to the problem of global warming. Rubisco is the most abundant vegetal protein in the world, because it is present in leaves of all the green plants. As an enzyme, Rubisco plays a fundamental role during photosynthesis because it allows the fixation of CO<sub>2</sub> in green biomass during the Calvin cycle. Since its reaction rate is very slow, its behaviour has been the object of numerous studies. Investigations have been conducted on subjects such as Rubisco molecular structure, functionality and stability, carboxylation reaction kinetics, molecular engineering of Rubisco, variability of Rubisco concentrations in the plant according to the growth cycles (FELLER et al. 2007). Applications in biotechnologies are also expected in order to develop, through genetic modification, micro-organisms that could control CO<sub>2</sub> emissions, for example during fermentation (GUADALUPE-MEDINA et al. 2013). Recent studies have also pointed out the industrial interest for its functional properties (VAN DE VELDE et al. 2011a), while allergists are using this protein as a model of non-allergen vegetal protein. The development of a rapid, sensitive and selective method for Rubisco quantification, especially in real complex media, is therefore a challenge.

Different classical methods were used for Rubisco quantifying in synthetic media. One of the simplest and oldest methods used was the spectrophotometric analysis at 280 nm in a well-adapted medium (LILLEY et WALKER 1974). This method was also used by LAN et MOTT (1991) for measuring highly purified activated and non-activated Rubisco and Rubisco activase. Calibration was done by comparing the obtained values with the maximal enzymatic activity. Nevertheless, considering that enzymatic activity depends on environmental conditions during sampling, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was developed and used for measuring Rubisco content in leaf extracts of potato plants (CATT et MILLARD 1988) and in different varieties of barley (METODIEV et DEMIREVSKA-KEPOVA 1992). Based on the selective interaction between Rubisco antibody and the protein, this method can be considered to be specific and accurate enough for the determination of Rubisco and was successfully used in plant extracts.

Most recently, KERFAI et al. (2011b) et KERFAI et al. (2011a) have developed a size-exclusion HPLC method for the identification and quantification of Rubisco in plant extracts, with an UV-Vis detector measuring at 280 nm. This method allows the determination of the protein in different complex media, such as the green juices. However, the time of analysis is long (about 50 min) when real media are analysed because a perfect cleaning of the column is necessary. In a study devoted to the Rubisco extraction and purification from plants by ion exchange chromatography at laboratory scale, Rubisco analysis was carried out by electrophoresis using a polyacrylamide gel (PAGE) (SUÁREZ et al. 2011). Gels were then studied by densitometric analysis and image analysis for Rubisco determination on the basis of the enzyme large subunit.

Biolayer interferometry is an analytical technique based on the measurement of the interferences of two light beams. The interference is generated by two different distances to be crossed by the beams in a biosensor with an antibody immobilised at the tip (*Fort-*

*Bio\_App\_Note\_14.pdf*). When immersed in a solution containing the antigen (protein) the bound antigen–antibody will promote an increase of the biosensor thickness at the tip and will modify the interferometric pattern (SULTANA et LEE 2015). Thus, it is possible to correlate the number of immobilized molecules (concentration) with a shift in the interferometric profile, the response being obtained in real time (DELIS 2015). Figure II.12 schematises the basis of the technique. In addition to the quickness of the analysis (approximately 3 minutes per measurement), this technique has the advantage of being applicable in complex media because of the specific binding reaction. Regardless of this specificity, the matrix of the calibration solutions must correspond to that of the sample containing the analyte because of sensibility of proteins to their chemical environment.

The aim of this work is to apply this principle in order to develop a selective quantitative method to determine Rubisco concentrations in different media. Rubisco solutions were prepared from pure Rubisco powder, refined from alfalfa green juice and purified by size-exclusion chromatography (Sephacryl S-300, GE Healthcare). To verify the influence of media, four different matrices were used namely at different pH values.

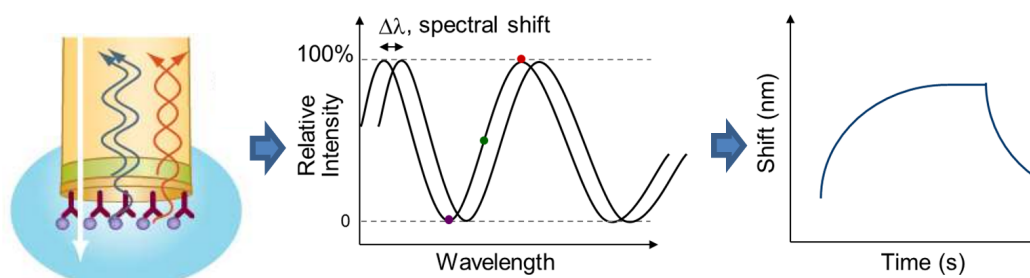


FIGURE II.12 – Global presentation of biolayer interferometry technique. Adapted from fortebio.com and from DAYNE (2012)

<https://www.fortebio.com/bli-technology.html>, accessed 12.15.2017

#### 4.4.2.ii Materials and methods

**4.4.2.ii.a Materials** Manual BioLayer Interferometry system (BLITz), High Precision Streptavidin (SAX) BLI biosensors and Drop holder from ForteBio/Pall Corp. (Menlo Park, USA) were used. Black 96-well non-binding microplate (Greiner Bio-One, France) and 0.5 ml black microcentrifuge tubes (Argos Technologies, USA) were also used.

**4.4.2.ii.b Proteins and compounds** Different monoclonal and polyclonal Rubisco antibodies from different sources were tested (results not shown). Rabbit polyclonal antibody anti-RbcL / Rubisco large subunit, forms I and II, from Agrisera (Vännas, Sweden) was selected. EZ-Link NHS-PEG4-Biotin and Zeba Spin Desalting Columns were purchased from Thermo Scientific (Villebon sur Yvette, France). Hydrogen disodium phosphate (> 99%) and dihydrogen sodium phosphate monohydrate (> 99%) were provided by Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Kinetics Buffer 10x were purchased from ForteBio/Pall Corp. (Menlo Park,

USA). Sucrose for microbiology ( $\geq 99\%$ ) and Glycine ( $\geq 99\%$ ) from Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Germany). All solutions, except 15% sucrose in Kinetics Buffer, were prepared with deionized Milli-Q water. Rubisco samples were extracted from alfalfa (*Medicago Sativa*) juices, purified by gel chromatography in a phosphate buffer at pH 7.4, and atomized by spray drying. Dry solid contains 63% of Rubisco and 37% of salts ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ).

**4.4.2.ii.c Biosensors preparation** Biosensor preparation is essential in order to ensure analysis precision and repeatability (MARAGOS 2011). Batch preparation is recommended for industrial applications. Each batch must be characterized by a calibration curve. In this work, each biosensor has been prepared under controlled and monitored conditions in order to efficiently control all phases of the analytical protocol. Biosensor preparation consists in two steps (DELIS 2015) : (1) biotinylation of the antibody and (2) biotin-antibody fixation onto SAX biosensors.

(1) The antibody anti-RbcL was reconstituted in 50  $\mu\text{L}$  of deionized water to prepare a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  solution. Immediately before use, NHS-PEG4-Biotin (2 g) was diluted to 2 mM. 2  $\mu\text{L}$  NHS-PEG4-Biotin solution were added to anti-RbcL solution and the reaction was incubated at room temperature for 30 min or on ice for 2 h. NHS-PEG4-Biotin non-used was discarded. The non-reacted NHS-PEG4-Biotin was removed by gel filtration with Zeba Spin Desalting Columns, 2 mL. Biotinylated antibody anti-RbcL was stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

(2) To load biotinylated antibody onto SAX biosensors, three steps are necessary (Table II.10). Previously, they must be hydrated in Pall Kinetics Buffer for 10 min. To follow the preparation, experimental conditions for each step need to be indicated in Kinetics advanced mode of the BLITz software, by creating the assay method.

After use, biosensors can be regenerated for reuse. For this, the sensor tips are incubated in glycine 10 mmol/L pH 1 for 10 s, followed by a washing step in kinetics buffer solution. This procedure is repeated 5 times. In most applications, biosensors can be usually regenerated 3 times.

**4.4.2.ii.d Quantitation of Rubisco by bio-layer interferometry** Rubisco's powder at 63% weight has been used to prepare a mother solution at 10 g Rubisco/L and 42.8 mM phosphate in deionized water. For the validation of the analytical method and in order to generate calibration curves, standard solutions of Rubisco were prepared from 0.5 to 2 g Rubisco/L by dilution of aliquots in four different Phosphate Buffered Saline (PBS) buffer solutions. Calibration curves have been determined by using Create Standard Curve module in BLITz Pro software. For each standard, 4  $\mu\text{L}$  of Rubisco solution at the required concentration and buffer were placed into BLITz system using a drop-holder. A pre-hydrated biosensor was loaded into the equipment and the assay was run for 120 seconds with shaker enabled. As BLITz Pro software does not accept zero as a standard, measurements in buffer solutions have been done for each calibration curve considering Rubisco concentration as negligible ( $10^{-12}$  g/L).

All experimental data have been measured at least three times in order to establish the method's repeatability. First, experimental protocol was evaluated by using standard solutions of 1 g/L. The effect of biosensor regeneration has been validated by using : (a) new biosensors or biosensors regenerated until 3 times, or (b) biosensors regenerated at least four times. Then, effects inherent to proteins, such as protein dissolution or protein stability, have been analysed by considering the time between the preparation of the solutions and the measurements. The effect of buffer solution, especially pH, has been also considered. Tables II.11 and II.12 summarize all the experimental conditions investigated. Pall PBS and PBS1 buffer solutions have the same pH but different compositions, namely different ionic strength. In all the cases, prior to their use, biosensors were always hydrated in the corresponding buffer solution for at least 10 minutes. To determine Rubisco concentration in unknown samples, Quantitate Sample module in BLITz Pro software was used. In the same way as for standard solutions, 4  $\mu$ L of sample were placed into BLITz System and the assay was run for 120 s.

All the tests have been carried out at controlled temperature (20°C).

Tableau II.10 – SAX biosensor on-line immobilization protocol (\* values determined after optimization of the method)

Assay Method Experiment Creation				Additional Information	
Step	Step Type	Duration (s)	Position	Sample solution	View volume ( $\mu$ L)
1	Initial Baseline	60	Tube	Pall PBS	350
2	Loading	180*	Drop	Biotin-Antibody 25* $\mu$ g/ml	4
3	Baseline	60	Tube	Pall PBS	350

Tableau II.11 – Experimental conditions for analytical method validation

Standard solution (g/L)	Time from standards preparation to analysis	Replicates for each standard
0.5	2 h and 4 h	3
1	30 min, 2 h and 4 h	4 (+1 for reuse evaluation)
2	2 h and 4 h	3

Tableau II.12 – Buffer solutions used. For each buffer solution, a specific calibration curve has been established

pH	PBS buffer solutions	Identified in this work as
7.40	Pall PBS buffer*	Pall PBS buffer
7.44	81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /19 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PBS 1
6.80	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PBS 2
6.20	19 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /81 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	PBS 3

\* Kinetics Buffer 10X concentration (ProClin@300, 0.1 mol/L phosphate, 1.5 mol/L NaCl, pH 7.4)

#### 4.4.2.iii Results and discussion

During analysis, the experimental results show the evolution of interferometric-profile shifts (in nanometres) with time, as represented in the example of figure II.13. Moreover, on



streptavidin biosensors, the spectral shift corresponds to the path increase, so a spectral shift of 1 nm corresponds to 1 nm of mass thickness (WALLNER et al. 2013). These curves obtained from BLITz software are in on-line representations of the molecular binding that takes place at the tip of biosensors (protein/antibody association curves)(*ForteBio\_App\_Note\_14.pdf*). From these results, two parameters can be determined, both characteristic for a Rubisco concentration in a buffer solution (DELIS 2015) : the “maximal binding” (or maximal spectral shift) corresponding to the amount of Rubisco bounded at a definite time (usually 120 s), and the “binding rate”, corresponding to the initial slope of the curves, which depends on the Rubisco/antibody association rate.

In figure II.13, all the results obtained with the standard solution of 1 g Rubisco/L are represented. Table II.13 summarizes experimental results of maximal binding (MB, in nm) and binding rate (BR, in nm/s) obtained for these standards measured 30 min after the solution preparation. For each buffer solution, left values are replicates measured with new biosensors (Rep 1, Rep 3 and Rep 4). Right values include the replicate measured with a four times regenerated biosensors (Rep 2\*). All the experimental results obtained for this standard solution are clearly regrouped in four categories, depending on the buffer solution (figure II.13). The results for Pall PBS and PBS1 buffer solutions match exactly, showing that the effect of pH is much important than the effect of ionic strength.

For each group, the repeatability of the measurements is quite good when maximal binding is considered, and very good when all the biosensors were new or regenerated 3 times maximum. When a biosensor regenerated more than 3 times is used, the risk to have less repeatable results increases. Moreover, maximal binding obtained with four-reused biosensors are often lower than those obtained with new biosensors, in accord with results obtained by MARAGOS (2011). An important effect of time between the solution preparation and the analysis has been observed especially in the values of binding rates determined (Table II.14). Most of values obtained at 30 min seem to minimize the response. At pH 6.8 and 6.2, Rubisco (pI  $\approx$  6) is less stable because the minimum of proteins solubility corresponds to a pH equal to their pI. In these conditions, the dispersion of the results increases strongly, which makes the analysis less repeatable. From this point of view, analysis performed more than 2 hours after the preparation of solutions, seems to be a good compromise for these conditions. In buffer solutions at pH 7.4, binding rate is well stabilized after 2 h, and values become much regular.

In order to quantify Rubisco concentration in an unknown solution, calibration curves at the experimental conditions chosen must be established. Calibration curves give Rubisco concentration as a function of binding rate (*ForteBio\_App\_Note\_14.pdf*). Standard solutions have been prepared and analysed 2 h later. Figure 3 shows experimental results for buffer solution PBS 1, as an example. For each curve, the baseline was determined with the buffer solution. Fitting of the experimental results was done by using a binomial relationship, which gives better regression coefficients. Calibration curves for all the buffer solutions used are indicated in Table II.15. As for the effect of time, regression coefficients obtained at pH 6.8 and 6.2 were poor. Calibration curves were then used for determining Rubisco concentration in standard solutions of 1 g/L. Results are also included in Table II.15. In accordance with

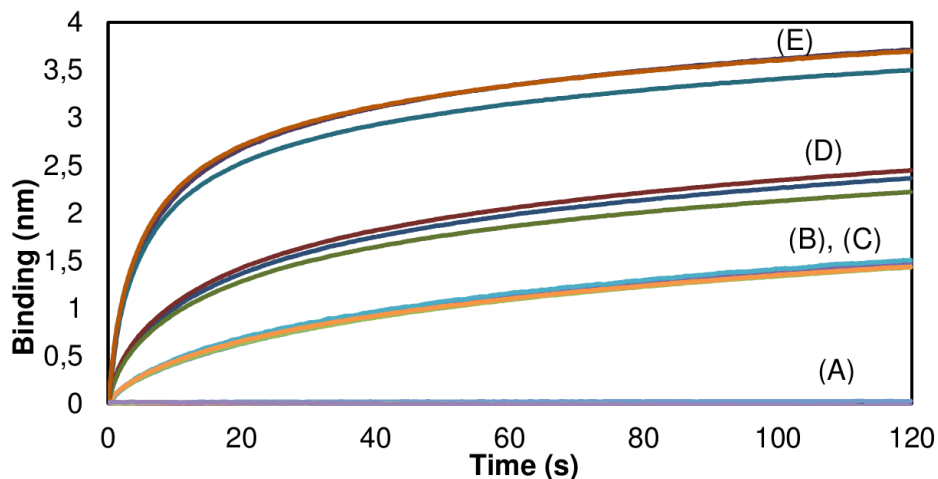


FIGURE II.13 – Signals for buffer solutions (4 curves)(A). Signals for standard solutions of 1 g/L in Pall PBS buffer pH 7.4 (B), in PBS 1 pH 7.44 (C), in PBS 2 pH 6.8 (D), and in PBS 3 pH 6.2 (E). All the results for standard of 1 g/L include 4 curves for 4 replicates

Tableau II.13 – Maximal binding and binding rates obtained with standard solutions of Rubisco at 1g/L in different PBS buffer solutions. Asterisk (\*) means a replicate obtained with a biosensor regenerated four times.

	Pall PBS		PBS1		PBS2		PBS 3	
	MB (nm)	BR (nm/s)	MB (nm)	BR (nm/s)	MB (nm)	BR (nm/s)	MB (nm)	BR (nm/s)
Rep 1	1.46	0.054	1.48	0.062	2.37	0.158	3.71	0.464
Rep 2*	1.49	/0.072	1.40	/0.062	2.09	/0.156	3.48	/0.526
Rep 3	1.49	0.056	1.50	0.059	2.45	0.148	3.50	0.492
Rep 4	1.43	0.056	1.44	0.067	2.22	0.163	3.69	0.438
Mean		0.056/0.060		0.063/0.062		0.156/0.156		0.465/0.480
SD		0.001/0.008		0.004/0.003		0.008/0.006		0.027/0.038
%RSD		1.797/14.049		5.933/4.901		4.986/4.073		5.888/7.931

the above results, Rubisco concentration was efficiently determined in buffer solutions at pH 7.4 but analysis conditions were not adequate for the analyses at pH 6.8 and 6.2.

Tableau II.14 – Binding rates in different PBS buffer solutions obtained with standard solutions of Rubisco at 1g/L at different times from the solution preparation. Each value is the mean of three replicates

PBS buffer solutions	Time between solution preparation and analysis		
	30 min	2 h	4 h
Pall PBS	0.056	0.085	0.084
PBS 1	0.063	0.081	0.079
PBS 2	0.156	0.207	0.179
PBS 3	0.465	0.533	0.428

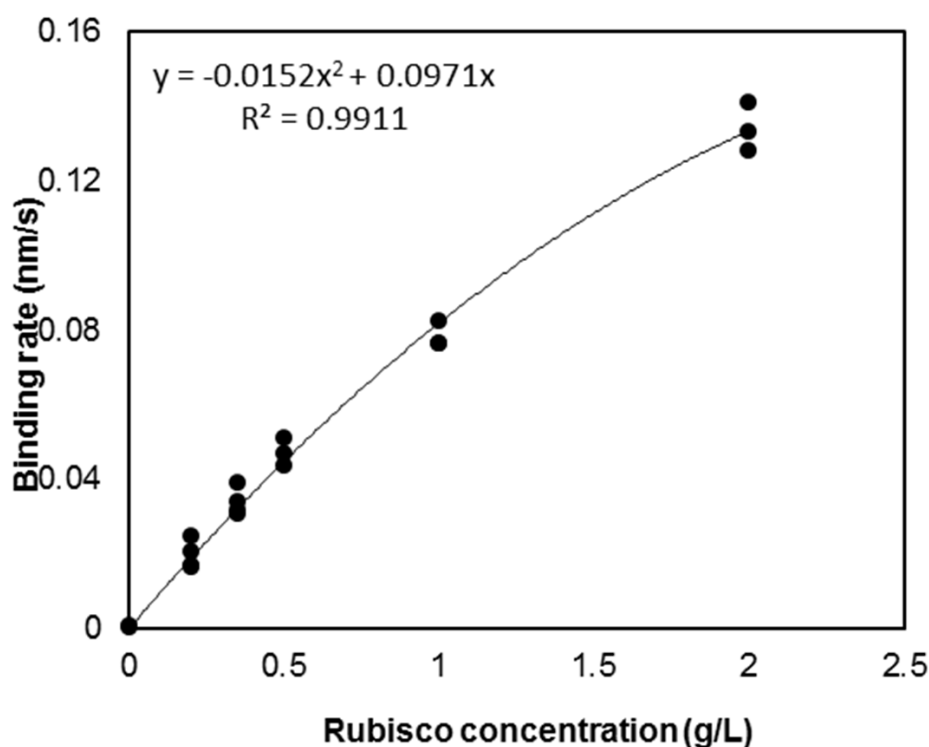


FIGURE II.14 – Calibration curve for buffer solution PBS 1. Each concentration has been triplicated

BLI method was finally applied for determining Rubisco concentration in an unknown solution obtained from alfalfa juice and purified by ultrafiltration. Experimental results (Table II.16) were then compared with analysis by HPLC SEC and dry mass determination. In order to keep concentrations in the interval of the calibration curve, and to guarantee the respect of buffer conditions, solutions were diluted in PBS 1 buffer solution at two dilution ratios. The results obtained were repeatable, with deviations between values under 8%, and consistent for the three analytical methods applied in such a system.

Tableau II.15 – Calibration curves equations for each buffer solution. Rubisco concentration recalculated in standards solutions (theoretical concentration 1 g Rubisco/L).

PBS buffer solutions	Calibration curve equation	R <sup>2</sup>	Rubisco concentration (g/L)
Pall PBS	BR = -0.0182C <sup>2</sup> + 0.1027C	0.9838	1.00
PBS 1	BR = -0.0152C <sup>2</sup> + 0.0971C	0.9911	0.96
PBS 2	BR = -0.0341C <sup>2</sup> + 0.2376C	0.9773	0.86
PBS 3	BR = -0.1399C <sup>2</sup> + 0.6819C	0.8613	0.74

Tableau II.16 – Rubisco quantitation in an unknown sample. All the measures were triplicated

Unknown solution	BLItz analysis			Rubisco concentration (g/L)	
	Rubisco concentration (g/L)	SD	%RSD	HPLC SEC	Dry mass (SD)
Solution X8	8.0	0.38	7.54		10.7 (0.05)
Solution X16	9.4	0.60	4.03	10.3 ± 1.0	

#### 4.4.2.iv Conclusions and perspectives

Biolayer Interferometry is a quickly selective technique for protein analysis and can be applied for Rubisco quantitation even if the results are strongly dependent on the experimental conditions, and must be well controlled. pH was the most important variable to be controlled, but time from sample preparation, biosensors preparation or reuse were also significant. In this work, the recommended conditions to measure Rubisco concentration by BLITz were established to be 0.1 mol/L PBS buffer at pH 7.4, 2 h between the sample preparation and its analysis and the use of new or 3 times-regenerated biosensors.

**4.4.2.iv.a Acknowledgments** The authors gratefully acknowledge financial and material support from the Occitanie Region (France), Vivadour Cooperative and Ovalie Innovation.

#### 4.4.3 Synthèse des résultats et discussion

Une première étude qualitative a permis la sélection d'anticorps polyclonaux (origine lapin) capables de former une liaison spécifique avec la Rubisco de luzerne. Cela a permis la mise au point d'un protocole de préparation de biocapteurs : les anticorps, fixés à la surface des biocapteurs, établiront des liaisons spécifiques antigène-anticorps avec la Rubisco que sera de ce fait retenue par les biocapteurs. Les différentes étapes de la préparation sont réalisées directement dans l'équipement d'interférométrie BLI (mode de fonctionnement « on-line »), ce qui permet d'assurer leur répétabilité.

La fixation spécifique de la Rubisco dans les biocapteurs n'exclut pas totalement les interférences lors de l'application de la méthode car des adsorptions non spécifiques avec la matrice de la solution de Rubisco sont toujours possibles à la surface (non utilisée) des biocapteurs. Pour cette raison, toutes les solutions utilisées pour la mise au point de la méthode et pour

sa validation ont été fortement diluées (neutralisation de l'effet de la matrice). Les solutions de dilution permettent alors d'optimiser les conditions opératoires (pH, force ionique) pour la fixation de la Rubisco dans le biocapteur.

Quatre solutions tampon ont été testées, choisies en considérant notamment la stabilité de la protéine dans les échantillons. Il s'agit des solutions tampon phosphate à 100 mM avec des ratios différents de sels mono- et di-hydratés afin de fixer le pH dans un intervalle entre 6,2 et 7,5. La stabilité de la protéine dans le milieu a été vérifiée en répétant les mesures à intervalles de 1 à 4h, avec des résultats contrastés selon les solutions tampon. La solution tampon 81 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /19 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,44 a été retenue car elle permettait une fixation et une stabilité de la Rubisco optimales. A partir de là, et l'utilisation des solutions de concentration de Rubisco de concentration connue (mesure par HPLC-SEC, volume d'éluion 9,03 mL) une courbe de calibration binomial a pu être proposée.

Les premiers tests de mesure de la concentration de Rubisco ont été réalisés sur des échantillons de Rubisco purifiée par SEC (cf. paragraphe 4.2 de ce chapitre) à partir d'un échantillon de jus de luzerne, atomisé puis remis en solution. Ils conduisent à des résultats considérés cohérents avec les analyses par HPLC-SEC du jus purifié en utilisant l'équation II.2. Une différence de concentration est néanmoins constatée. Elle est attribuée aux pertes de masse de Rubisco purifiée produites durant l'atomisation (le volume de solution obtenue après la remise en solution de la Rubisco purifiée et atomisé n'a pas permis une analyse directe de cette solution par HPLC-SEC).

Une méthode analytique par la technologie BLI a été développée pour le dosage de la Rubisco dans des solutions et conditions déterminées. Elle est rapide et plus sensible que la mesure par HPLC-SEC. Des conditions opératoires ont été proposées afin d'optimiser la fixation de la Rubisco sur les biocapteurs. Ainsi, la méthode permet actuellement de déterminer la concentration en Rubisco d'une solution de lors que l'effet de la matrice peut être neutralisé par la dilution, et notamment sur les échantillons de Rubisco purifiée. D'autres tests doivent être réalisés pour permettre l'application sur d'échantillons de nature différente.

## 4.5 Conclusion

La mesure de la concentration en Rubisco des différents milieux, des jus bruts jusqu'aux solutions de protéine purifiée, reste une question sensible à plusieurs titres :

- la difficulté de disposer de la protéine pure pour la préparation des solutions étalon de concentration connue ;
- la présence de différentes formes de Rubisco, monomère et oligomères, ces dernières de formation et taille incertaines, ajoutée au manque de maîtrise actuel des conditions dans lesquelles la forme monomérique va former des oligomères ;
- les interférences possibles de par la présence des constituants pouvant se fixer sur la protéine et modifier son absorbance à 280 nm (notamment les polyphénols) ;
- la complexité et variabilité des matrices où la Rubisco va se trouver dans le procédé
- la stabilité même de la molécule.

Dans cette section, des réponses concrètes ont été apportées par la mise au point de deux méthodes de dosage de la Rubisco. La première, l’HPLC-SEC, reste une technique assez robuste, de large spectre d’application pourvu que l’échantillon soit bien filtré, pouvant apporter des informations sur les différentes formes de la protéine, mais cependant moyennement sélective. Le temps nécessaire par analyse est très long, et cela rend très difficile le suivi d’expériences qui génèrent par fois de dizaines d’échantillons. La deuxième technique développée, très innovante, devrait être davantage sélective, si les effets des matrices sont faibles ou peuvent être neutralisés par la dilution. Adaptée pour le moment uniquement à l’analyse des solutions de protéine purifiée, elle pourrait s’avérer un bon moyen de suivi du procédé car le temps de l’analyse est très court et permet donc des interventions correctives presque instantanées. Pour cela, des études complémentaires seront encore nécessaires.

Pour ce faire, des échantillons de Rubisco pure ont été produits et caractérisés, les principales interférences ont été vérifiées et les méthodes ont été confrontées à la validation par la mesure de la masse sèche de Rubisco dans les échantillons. Les résultats obtenus nous permettent actuellement de disposer des méthodes adaptées à l’étude de la Rubisco dans les jus et des procédés auxquels elle sera soumise.

## 5 Caractérisation et conservation des jus végétaux

### 5.1 Introduction

La mise au point des méthodes permettant de doser la concentration en Rubisco des jus permet d’approfondir la caractérisation des jus obtenus à partir de différentes matières premières végétales, et donc d’évaluer leur stabilité et les moyens de conservation pouvant être mis en œuvre. En effet, la matière première végétale étant disponible uniquement trois ou quatre fois par an, il est forcément nécessaire de disposer d’un moyen de stockage qui assure à la fois la disponibilité de matière pour la réalisation d’expériences et la non altération de la Rubisco présente initialement. Ces aspects du travail font l’objet de cette section.

Dans un premier temps, les méthodes de caractérisation des jus seront développées. D’une manière générale, les analyses se sont limitées aux variables essentielles vis-à-vis du procédé de séparation de la Rubisco. Les résultats obtenus pour tous les jus produits par pressage de différents lots de plante traitée seront synthétisés et discutés. Des préconisations sur les matières premières à utiliser pourront alors être formulées.

En vue de la conservation des jus, deux approches différentes ont été envisagées : l’utilisation du froid et l’élimination de l’eau. Les résultats obtenus dans chaque cas seront exposés et discutés afin de sélectionner la technique la plus adaptée aux besoins du procédé.

Le temps nécessaire à la réalisation de l’étude sur les modes de conservation a fait que dans un premier temps tous les jus produits ont été congelés. Ainsi, les conséquences de ce traitement sur les propriétés des jus et particulièrement sur la Rubisco sont à considérer afin de bien interpréter les premières expériences réalisées avec les jus décongelés.

## 5.2 Caractérisation physico-chimique des jus

La caractérisation des jus est nécessaire, notamment pour suivre leur évolution tout au long de la manipulation. Dès sa production, la caractérisation du jus peut permettre d'identifier des facteurs ayant un impact sur sa qualité et de cette manière améliorer les conditions de production. De plus, le suivi des paramètres physico-chimiques est nécessaire dans le but d'identifier de possibles changements influençant la stabilité de la protéine (formation d'agrégats, dénaturation...) ou tout simplement pour l'interprétation des résultats de différentes expériences.

Par la suite, les différents paramètres mesurés et les protocoles utilisés sont décrits, puis les résultats obtenus seront présentés et discutés.

### 5.2.1 Paramètres physico-chimiques globaux

Un jus végétal est une solution extrêmement complexe qui contient des matières en suspension et de nombreux composés aux propriétés physico-chimiques très différentes en solution. Tout le travail a été réalisé avec des jus systématiquement centrifugés. Les mesures sont donc réalisées après une centrifugation pendant 20 minutes à 6000 rpm et à 4°C, mais certains paramètres ont été aussi directement mesurés sur les jus bruts au moment de leur production. La mise en œuvre des analyses sur les jus centrifugés reste délicate à cause des multiples interférences possibles et de l'évolution, parfois rapide, des échantillons. Pour ces raisons, les paramètres globaux sont souvent privilégiés.

#### 5.2.1.i pH, conductivité

Les mesures du pH et de la conductivité ont été réalisées dès la production du jus et, autant que possible, les valeurs ont été contrôlées tout au long de sa manipulation.

#### 5.2.1.ii Matière en suspension et matière sèche (MS%)

La teneur en matière en suspension est mesurée le jour même de la production du jus. Elle est calculée par différence de masse entre le jus brut et le jus centrifugé à 6000 rpm pendant 10 min. La teneur en matière sèche est mesurée le jour même de la production du jus en utilisant le protocole de la norme AFNOR 90105-2 (AFNOR 1997), selon lequel le jus est séché à 105°C pendant 24 heures.

#### 5.2.1.iii Teneur en protéine par la méthode de Kjeldahl

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de Kjeldahl (NTK), décrite précédemment (cf. paragraphe 4.3.4.ii de ce chapitre). Le facteur de 6,25 a été utilisé pour convertir la teneur en azote en teneur en protéines.

#### 5.2.1.iv Polyphénols

La présence qualitative des polyphénols a été déterminée par mesure de l'absorbance à 340 nm lors de l'analyse des échantillons par HPLC-SEC, comme indiqué précédemment (cf. paragraphe 4.3 de ce chapitre). Malheureusement, cette méthode n'a pas été appliquée lors de premières analyses des jus ou des échantillons issus des expériences.

#### 5.2.2 Teneur en Rubisco et détermination de son caractère ionique

Le dosage de la Rubisco lors de la production des jus est particulièrement sensible. En effet, il a été mis en évidence qu'une fois produit, la composition du jus peut très rapidement évoluer à cause de l'action d'enzymes qui sont libérées dans le milieu au moment de la rupture cellulaire (JERVIS et PIERPOINT 1989). Par exemple, comme indiqué dans le paragraphe 1.4 du chapitre I, la stabilité de la Rubisco peut être affectée soit par action directe des enzymes (protéases), soit parce qu'elles favorisent la formation de liaisons covalentes entre la Rubisco et les polyphénols présents dans le jus (polyphénoloxidasés) (HORIGOME et KANDATSU 1968). Ces problématiques étant parfois liées à l'état de maturation de la plante, la livraison d'une matière première suffisamment jeune (avant floraison) a été lorsque possible privilégiée (AVILA OSPINA 2014).

Dans ce travail, la Rubisco a été principalement analysée par HPLC-SEC, selon la méthode décrite dans le paragraphe 4.3. Bien que la mise au point de la méthode BLI a été possible et a montré un grand intérêt (cf. paragraphe 4.4), son application sur des échantillons complexes n'a pas été suffisamment validée pour une utilisation généralisée.

Par ailleurs, d'après la littérature, la Rubisco des différentes plantes supérieures ne présente pas toujours la même structure (DOUILLARD et DE MATHAN 1994). Si la grande sous-unité de la Rubisco est toujours la même, la petite sous-unité peut varier d'une espèce à l'autre (UDENIGWE et al. 2017) donnant lieu à une protéine dont le point isoélectrique peut varier d'environ 4,5 (épinards, maïs, coton, tabac) à 6 (luzerne) (DOUILLARD et DE MATHAN 1994). En raison de ces écarts, et lorsque l'information n'est pas disponible dans la littérature, il est très difficile de connaître a priori la charge nette de la protéine quand elle se trouve au pH des jus (usuellement entre 5,8 et 6,2). Or cette valeur s'avère essentielle dans la mise en œuvre du procédé chromatographique par échange d'ions. Ainsi, pour chaque lot de jus produit à partir des plantes dont le pI de la Rubisco n'était pas connu, un test en mode de contact batch a été réalisé afin de vérifier le caractère anionique ou cationique de la protéine dans les conditions de production du jus.

Pour ces tests la résine cationique SP Sepharose FF et la résine anionique ANX Sepharose 4FF (GE Healthcare) ont été utilisées. Le protocole mis en œuvre a été identique à celui décrit dans le paragraphe 2.2.3 du chapitre III.



### 5.2.3 Résultats et discussion

Le tableau II.17 présente un récapitulatif de l'ensemble de paramètres physico-chimiques déterminés pour les différents lots de jus végétaux produits.

Tableau II.17 – Caractéristiques physico-chimiques des jus végétaux issus de différents lots de plantes traités

Lot Jus	Caractéristiques : jus brut/jus centrifugé					
	pH	Conductivité (mS/cm)	Teneur en matière Sèche MS (%)	Masse Volumique (kg/m <sup>3</sup> )	Teneur en protéines (g Protéine/L)	Concentration Rubisco* (g/L) (jus centrifugé)
Luzerne_0	5,8/5,7	15,0/15,0	9,2/7,1	1052/1042	40,05/26,64	N.D.
Luzerne_1	5,8/5,9	13,5/12,8	11,5/9,5	1067/1054	38,4/29,7	5,5
Luzerne_2	6,0/5,9	13,0/12,5	8,4/7,2	1055/1030	38,6/17,3	3,0
Luzerne_3	5,9/5,7	13,8/13,0	11,4/9,2	1068/1020	39,2/27,0	4,2
Luzerne_4	6,6/6,5	14,5/14,0	11,0/8,7	1070/1030	N.M.	3,8
Luzerne_5	6,0/6,0	13,9/13,9	9,5/8,5	1068/1035	N.M.	3,5
Luzerne_6	6,0/5,9	11,4/11,2	7,0/6,0	1045/1020	N.M.	4,9
Luzerne_7	5,8/5,7	8,6/8,2	7,5/6,9	1050/1025	N.M.	4,7
Haricots (résidus des gousses)	5,5/5,4	5,9/5,8	4,0/2,5	1010/1003	2,3/0,9	N.D.
Sorgho fourrager	5,6/5,5	5,55	N.M.	N.M.	N.M.	N.D.
Ray-Grass anglais	6,2/6,2	14,1/13,5	6,0/4,0	1055/1020	18,2/10,5	0,8
Trèfle violet	5,9/5,8	12,9/12,6	9,0/7,0	1150/1070	27,5/15,8	2,4

(\*) Valeurs mesurées le jour même de la production du jus. N.D.= Non détecté, N.M. = Non mesuré

Pour tous les jus produits, les valeurs de pH sont comprises entre 5,5 et 6,5 et les différences de pH entre le jus brut et le jus centrifugé ne sont pas significatives.

La conductivité varie d'un jus à l'autre, notamment entre les différentes plantes, avec des valeurs les plus élevées pour le jus de ray-grass, le trèfle violet et la luzerne. Les différents lots de luzerne présentent des conductivités assez variables, comprises entre 8,6 et 15,0 mS/cm. Les conditions dans lesquelles les coupes ont été réalisées (hauteur de la plante, âge de la plante, mois de la coupe, conditions climatiques...) sont considérées être à l'origine de ces variations.

De la même manière, on observe une variabilité importante de la teneur en matière sèche, qui ne dépasse jamais 11,5%. On observe que les jus caractérisés par un pourcentage de matière sèche élevé possèdent aussi une masse volumique élevée, montrant la cohérence des résultats.

La teneur en protéines totales des jus est assez élevée. Cependant, une partie importante est éliminée lors de la centrifugation. En général, il est considéré que la moitié des protéines dans les jus sont hydrophiles (dont la Rubisco) et l'autre moitié hydrophobe (COSTES 1981).

Il est raisonnable de penser que la plupart des protéines hydrophobes sont éliminées par centrifugation, ce qui peut expliquer la variation de la concentration totale. Par ailleurs, lorsqu'on compare les concentrations de protéine totale et celles de Rubisco on constate une différence très importante. Il est donc possible, qu'une partie de la Rubisco soit perdue lors de la centrifugation.

La Figure II.15 montre les résultats des analyses HPLC-SEC des différents lots de jus produits et centrifugés. Dans la figure II.15-B, un zoom est réalisé sur la partie du chromatogramme correspondant aux deux pics de la Rubisco.

Dans la figure II.15 on peut observer que dans toutes les matières premières où la teneur en Rubisco est élevée, une partie non négligeable de Rubisco se trouverait sous la forme d'agrégats dès la production des jus (analyse qualitative). L'étape de production des jus ne sera pas étudiée davantage dans ce travail, mais une optimisation visant à éviter la formation d'agrégats de Rubisco constitue sans doute une perspective très importante d'amélioration du procédé.

Pour chaque matière première analysée, les résultats des analyses de Rubisco conduisent aux conclusions suivantes :

#### **5.2.3.i Lot de gousses de haricots verts**

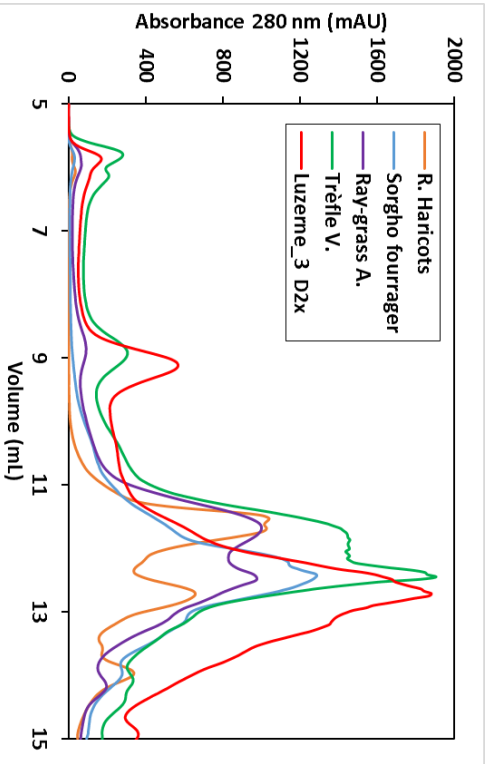
Aucun pic correspondant à la Rubisco n'a été détecté. Bien que l'on associe la couleur verte à la présence de Rubisco (fonction photosynthétique), ce résultat n'est pas surprenant en soi car la Rubisco étant une protéine foliaire elle ne se trouve que dans une proportion moindre dans le fruit de la plante.

#### **5.2.3.ii Lot de sorgho fourrager**

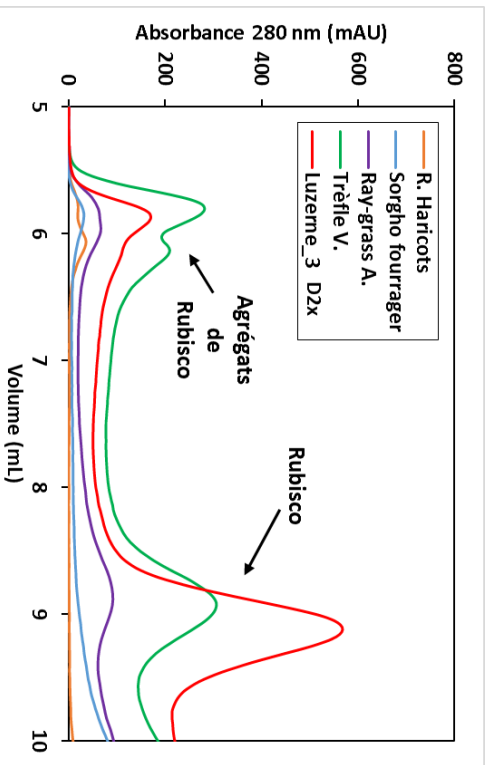
Il s'agit d'une plante C4, donc avec une teneur en Rubisco moins élevée que celle des plantes C3. Toutefois, les plantes C4 (maïs, canne à sucre...) présentent parfois un rapport feuilles/tiges très élevé (LEBLANC et al. 1994), raison pour laquelle il a été considéré intéressant de l'étudier. Lors de l'analyse, un pic de faible surface correspondant aux agrégats de Rubisco a été détecté. Il faut cependant préciser que les caractéristiques du lot traité n'étaient pas favorables car la plante se trouvait dans un état très avancé de développement. Il est donc impossible de déterminer si l'absence de Rubisco dans le jus produit est due à un état très tardif de la plante ou à une faible teneur propre de la variété.

#### **5.2.3.iii Lot de ray-grass**

D'après le pic à 9,03 mL, la concentration en Rubisco de jus est de 0,8 g/L. Le test de détermination du caractère anionique ou cationique de la protéine a été effectué sur ces jus, et a montré que la protéine est retenue uniquement par la résine anionique ANX Sepharose 4FF. La charge nette de la protéine à 6,2 est donc négative (résultat non présenté). Un pic



(A) Chromatogrammes entiers



(B) Pic de Rubisco et agrégats de Rubisco

FIGURE II.15 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC de différents lots de jus produits après centrifugation. Le jus du lot Luzerne\_3 a été dilué deux fois avant analyse, les jus provenant des autres plantes sont analysés sans dilution

de surface presque similaire est obtenu à 6 mL, ce qui met en évidence une concentration de Rubisco agrégée dans ce jus.

#### **5.2.3.iv Lot de trèfle violet**

Comme pour le ray-grass, les deux pics de Rubisco sont observés, le pic des agrégats étant aussi important que celui de la Rubisco monomère. L'aire du pic à 9,03 mL indique une concentration de Rubisco dans le jus de 2,4 g/L. Une fois de plus, le test de détermination du caractère anionique ou cationique de la protéine a montré que la protéine est retenue uniquement par la résine anionique ANX Sepharose 4FF (résultat non présenté).

#### **5.2.3.v Lot Luzerne\_3**

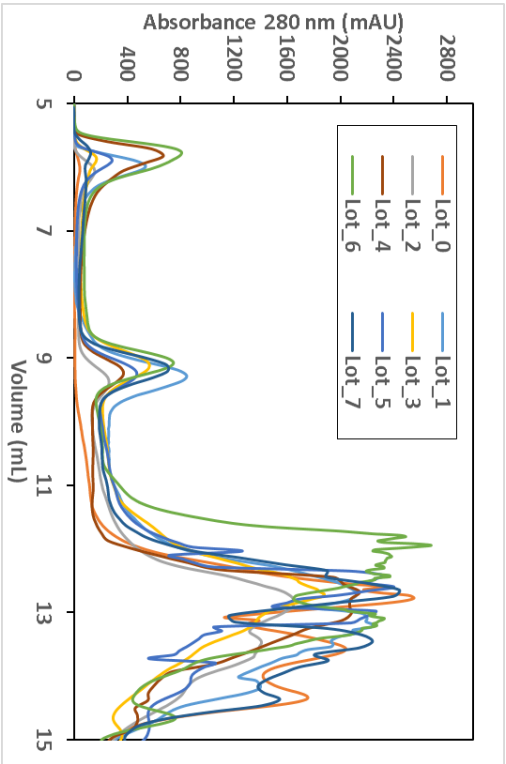
L'aire du pic à 9,03 mL indique que la concentration de la Rubisco dans le jus est de 4,2 g/L. Cette valeur est assez représentative des différents lots de jus de luzerne produits, raison pour laquelle ce lot a été choisi pour la comparaison des différentes matières premières.

En ne retenant comme critère que la concentration en Rubisco, la luzerne, le trèfle et le ray-grass apparaissent comme des plantes intéressantes pour la production de la Rubisco. En effet, bien qu'à ce stade les concentrations de Rubisco paraissent faibles, elles peuvent être comparées à celles du lactosérum (en général entre 5 et 9 g/L toutes protéines confondues) (DE WIT 1998; ANDERSSON et MATTIASSON 2006) dont les protéines sont valorisées depuis de nombreuses années.

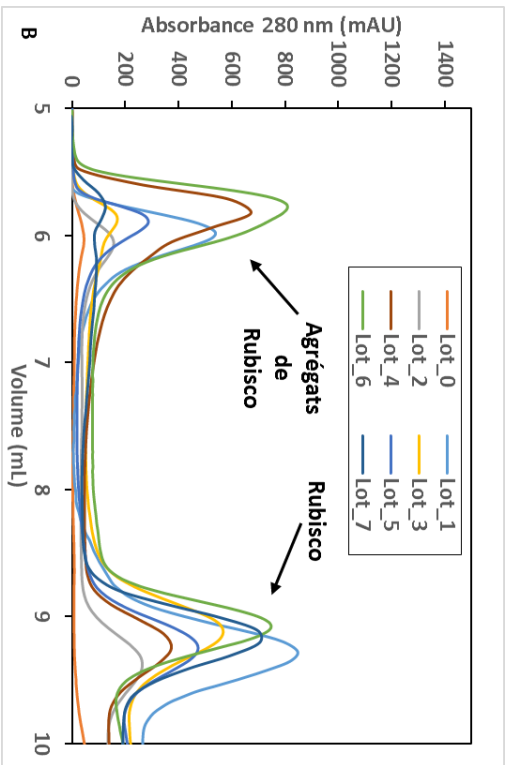
La luzerne reste la matière première la plus prometteuse, raison pour laquelle elle a été retenue pour la suite du travail. Ainsi plusieurs lots ont été produits et analysés. La Figure II.16 montre les chromatogrammes des jus produits à partir des différents lots de luzerne.

La figure II.16 montre que pour le lot Luzerne\_0 il n'y a pas de pic de Rubisco à 9,03 mL et seul un pic de faible surface est observé à 6 mL. Ce jus a été produit dans des conditions différentes de celles des autres lots, et en particulier par le procédé d'extrusion en extrudeuse bi-vis. Dans ces conditions, la température de production du jus a été estimée à 50°C. Dans tous les autres cas, la production des jus a été réalisée avec la presse mono-vis, avec un contrôle indirect de la température de travail qui n'a jamais dépassé 35°C (cf. paragraphe 3.3 de ce chapitre).

La teneur en Rubisco pour les jus obtenus avec les différents lots de luzerne (mesurée uniquement sur les jus centrifugés) varie entre 3,0 et 5,5 g/L, mais elle pourrait être très supérieure si l'on évite la formation des agrégats. Ainsi, DOUILLARD et al. (1990) ont mesuré la teneur en Rubisco des feuilles de luzerne et ont obtenu une valeur moyenne de  $1,6 \pm 0,5$  % masse de Rubisco sur la matière fraîche analysée. Or, d'après (PLANCQUAERT 1971), le ratio feuilles/tiges dans la luzerne est d'environ 50% en masse jusqu'à ce que la plante atteigne 50/60 cm de hauteur, puis elle décroît légèrement. Dans ces conditions, la teneur moyenne de Rubisco dans la plante sera d'environ  $0,8 \pm 0,25$ % en masse. Sur le traitement d'un lot de 100 kg de luzerne, et avec un rendement d'extraction de jus d'environ 40% (cf. paragraphe



(A) Chromatogrammes entiers



(B) Pic de Rubisco et agrégats de Rubisco

FIGURE II.16 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des jus produits à partir de différents lots de luzerne et après centrifugation. Les différents jus ont été dilués deux fois avant analyse HPLC-SEC

3 de ce chapitre), la concentration de Rubisco que l'on devrait trouver dans les jus serait d'entre 13 et 26 g/L, à condition que le rendement d'extraction de la Rubisco soit de 100% et que toute la Rubisco se trouve sous forme monomère. Les résultats ici obtenus peuvent être considérés donc cohérents avec la littérature, même si ils sont plus faibles car des pertes non négligeables existent du fait de l'agglomération de la protéine lors de l'étape de production du jus. En effet, les pics correspondant à la Rubisco agglomérée ont pour tous les jus analysés une surface relativement élevée, parfois même supérieure à celle de la Rubisco monomère.

#### 5.2.4 Préconisations sur le choix de matières premières végétales

Afin de formuler des préconisations sur les choix des matières premières végétales pour la production de Rubisco par le procédé étudié dans ce travail, un critère essentiel est évidemment la teneur en Rubisco que l'on peut espérer obtenir dans les jus. De ce point de vue, et même si ce travail n'est qu'une étude tout à fait préliminaire qui nécessite clairement d'être approfondie, la luzerne, le trèfle violet, voire le ray-grass, peuvent constituer des sources de Rubisco intéressantes.

Néanmoins, en plus de la teneur en Rubisco, le choix des matières premières doit prendre en compte, entre autres, des aspects comme la composition biochimique globale de la plante, qui peuvent conditionner fortement son comportement lors de l'application des procédés. En effet, des composés spécifiques, comme les polysaccharides, peuvent avoir une influence majeure sur les propriétés rhéologiques du jus, et les rendre très difficiles à exploiter. BOUYER et al. (2012) ont fait une synthèse des propriétés de surface des polysaccharides et des protéines naturels, ainsi que de leurs interactions, dont il ressort l'importance des propriétés rhéologiques, adhésives et émulsifiantes de ces molécules (ou de leurs associations). Ainsi, d'autres composés présents dans les plantes vertes (JARRIGE et al. 1963 ; GODIN et al. 2010) peuvent jouer des rôles essentiels dans le comportement des jus au cours des procédés. Ces aspects n'ont pas du tout été étudiés dans le cadre de ce projet, mais ces comportements auront un impact dans les résultats qui seront présentés par la suite. À titre d'exemple, la figure II.17 montre que la formation de mousses relativement stables avait lieu lors de la production des jus.

### 5.3 Conservation des jus

Comme indiqué dans le chapitre I, de nombreuses recherches ont été faites pour essayer de résoudre la problématique de la conservation des jus végétaux. La plupart impliquent l'utilisation simultanée de plusieurs additifs tels que des inhibiteurs de protéases et/ou des agents réducteurs (KNUCKLES et al. 1975 ; GALMÉS et al. 2005 ; SUAREZ et al. 2011 ; DE JONG et al. 2015) afin d'assurer la conservation en solution, par exemple, de la Rubisco. De plus il est courant que ces additifs soient introduits dans des milieux tamponnés et en présence d'autres substances comme par exemple des agents séquestrants.

Dans ce travail, outre le maintien en solution de la Rubisco monomère, le besoin de conser-



(A) Jus produit à partir des gousses d'haricots verts. Malgré la faible teneur protéique, la production de mousse est importante.



(B) Jus produit à partir de luzerne. L'épaisseur et la stabilité de la mousse sont nettement plus importantes.

FIGURE II.17 – Photographies des jus produits lors de la réalisation de ce travail.

ver le jus sans le modifier, répond aussi à la nécessité de réaliser des expériences longtems après leur production. Compte tenu des applications visées pour la Rubisco produite, le choix a été fait d'éviter l'ajout d'additifs (ou dans tous les cas, d'en utiliser en quantités moindres) pour la conservation des jus. Pour ces raisons, deux alternatives de conservation ont été étudiées : l'utilisation du froid et le séchage. Elles seront développées par la suite. Au préalable, les conditions influençant la stabilité de la Rubisco dans les jus seront examinées.

### 5.3.1 Paramètres influençant la stabilité de la Rubisco dans les jus

L'effet de la température (lors de la production des jus et lors de leur stockage), du pH, et l'effet de quelques additifs sur la stabilité de la protéine en solution ont été étudiés.

#### 5.3.1.i Température de production et de conservation des jus

Comme évoqué précédemment, les protéines peuvent se dénaturer irréversiblement lors d'un traitement thermique. Selon les conditions utilisées, le traitement thermique peut engendrer le changement de propriétés physico-chimiques (solubilité, apparition de nouvelles liaisons de covalence), la perte des propriétés fonctionnelles ou la modification de la valeur nutritionnelle.

Dans le paragraphe 1.3.1 du chapitre I, les valeurs des températures de dénaturation de

la Rubisco selon différents auteurs ont été recensées. KERFAI et al. (2011b) ont étudié la production des jus végétaux à partir des feuilles d'épinard par un procédé de déshydratation mécanique assistée thermiquement (DMAT). Des conditions de températures allant de 30°C à 90°C ont été appliquées afin de déterminer l'effet de cette variable sur la composition du jus produit. Selon les résultats de l'étude, dans les conditions de la méthode utilisée, au-delà d'une température de 30°C la Rubisco n'est plus détectée dans les jus produits (analyse en HPLC-SEC). De la même manière, nous avons observé que dans les jus produits à partir du lot Luzerne\_0, la détection de la Rubisco n'avait pas été possible. Cependant, des conditions de température plus élevée peuvent être appliquées sans modification de la protéine, à condition que cela se fasse durant des temps très courts, comme dans le séchage par atomisation (DOUILLARD et DE MATHAN 1994). Ce point fera l'objet du paragraphe 5.3.3 de ce chapitre.

Dans le cadre de ce travail, la concentration en Rubisco du jus du lot Luzerne\_1 a été mesurée par HPLC-SEC sur une période de 8 jours alors que le jus était conservé à 4°C. La figure II.18 montre l'évolution des chromatogrammes au cours du temps et le tableau II.18 présente les valeurs des concentrations obtenues pour la Rubisco monomère. Dans le tableau, le pourcentage de pertes, calculé par rapport à la concentration initiale du jus le jour de la production, est aussi indiqué.

Tableau II.18 – Teneur en Rubisco monomère (pic à 9,03 mL) et pertes sur 8 jours de conservation à 4°C pour le jus produit à partir du lot Luzerne\_1

Temps conservation (jours)	Concentration Rubisco (g/L)	% Pertes (Référence T0)
0 (T0)	5,5	0,00
1	5,4	1,9
3	5,2	5,1
6	4,9	9,9
8	4,3	22,2

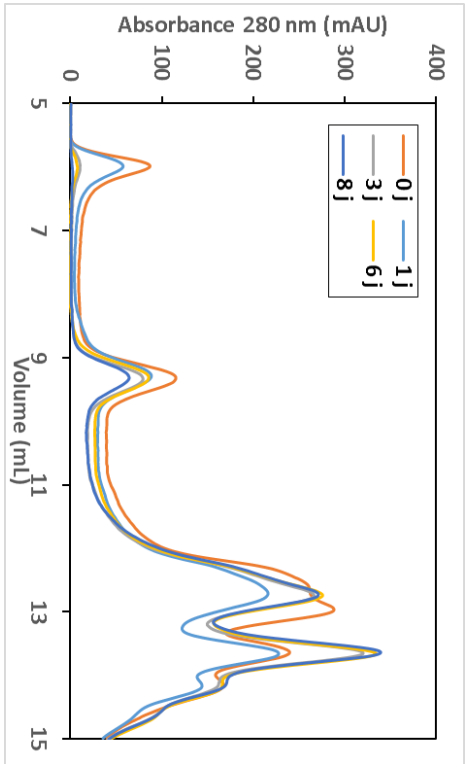
Bien que le calcul précis des pertes ne puisse se faire que pour la forme de la Rubisco éluee à 9,03 mL, le comportement pour la Rubisco sous forme d'agrégats est similaire. Dans les deux cas, on constate que la concentration de la Rubisco diminue lentement les premiers jours mais que les pertes deviennent significatives au-delà de 6 jours (22,2% au 8<sup>ème</sup> jour). La diminution significative du pic des agrégats observée pourrait être due à une augmentation progressive de leur taille, conduisant à leur précipitation ou à leur élimination lors de la filtration préalable à l'analyse.

Dans tous les cas, on peut admettre la possibilité de conserver les jus 2 à 3 jours à 4°C puisque, malgré une évolution, la concentration en Rubisco ne diminue que très légèrement.

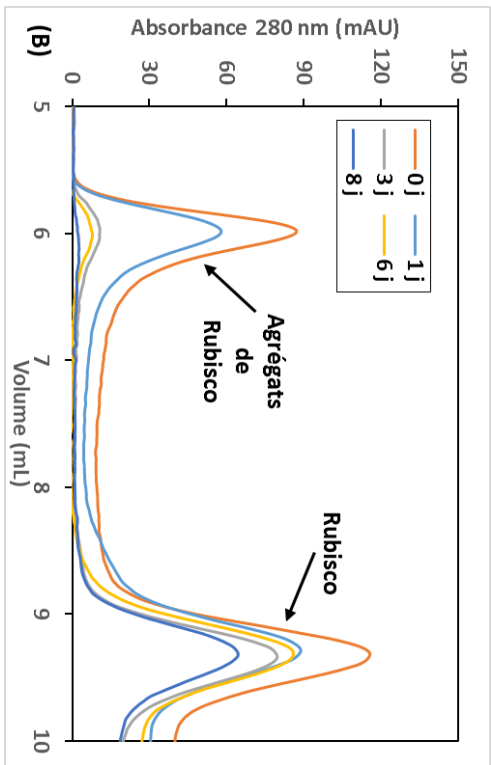
### 5.3.1.ii pH

L'influence du pH sur la stabilité de la Rubisco a été étudiée depuis de nombreuses années (TOMIMATSU et DONOVAN 1981 ; BARBEAU et KINSELLA 1988 ; VAN DE VELDE et al. 2011a). Comme présenté dans le paragraphe 1.3.1 du chapitre I, des valeurs minimales de solubilité de la Rubisco issue de l'épinard ont été retrouvées pour des valeurs de pH entre 3 et 5, alors





(A) Chromatogrammes entiers



(B) Pics spécifiques de la Rubisco

FIGURE II.18 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus du lot Luzerne\_1 stocké à 4°C pendant 8 jours.

que des valeurs de solubilité maximale sont associées à des pH entre 6 et 9 (VAN DE VELDE et al. 2011a).

Selon BARBEAU et KINSELLA (1988), le pH naturel des solutions présentes dans les feuilles de la plante est proche du pI de la Rubisco, raison pour laquelle une partie de l'enzyme a tendance à précipiter, particulièrement lorsqu'elle est soumise à une augmentation de la température. Pour cette raison, il est courant dans les procédés de purification de la Rubisco à partir de matières végétales, d'utiliser des solutions tampon afin de stabiliser le pH des jus dès que la molécule est extraite de la plante (SARKAR et al. 1975; WANG et al. 2008; CARMO-SILVA et SALVUCCI 2011; SUÁREZ et al. 2011).

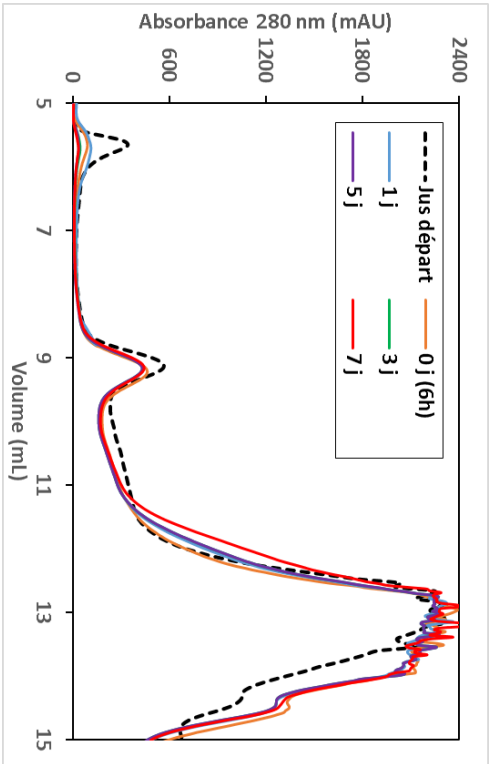
Dans le cadre de ce travail des expériences ont été réalisées avec l'objectif d'évaluer la stabilité de la Rubisco, en modifiant le pH du jus au moment de sa production. Le jus utilisé pour ces tests a été produit à partir du lot Luzerne\_5. Deux valeurs de pH ont été testées, pH 7 et 8, imposés par ajout d'un volume de solution tampon carbonate-bicarbonate ( $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ ) concentrée. Compte tenu de la complexité des jus, des tests préalables ont été réalisés afin d'estimer sa capacité tampon. Cependant, de grandes difficultés ont été rencontrées pour ajuster correctement le pH.

Une fois le pH ajusté, la concentration en Rubisco a été mesurée par HPLC-SEC après 1 h d'agitation, puis pendant une période de 7 jours alors que le jus était conservé à 4°C. Les figures II.19 et II.20 présentent l'évolution des chromatogrammes obtenus au cours du temps. Les profils sont comparés au jus initial avant modification de pH. Le tableau II.19 montre les valeurs de concentrations déterminées pour la Rubisco monomère, ainsi que le pH des jus obtenus. Il est particulièrement remarqué que malgré l'utilisation des solutions tampon, les pH des jus évoluent.

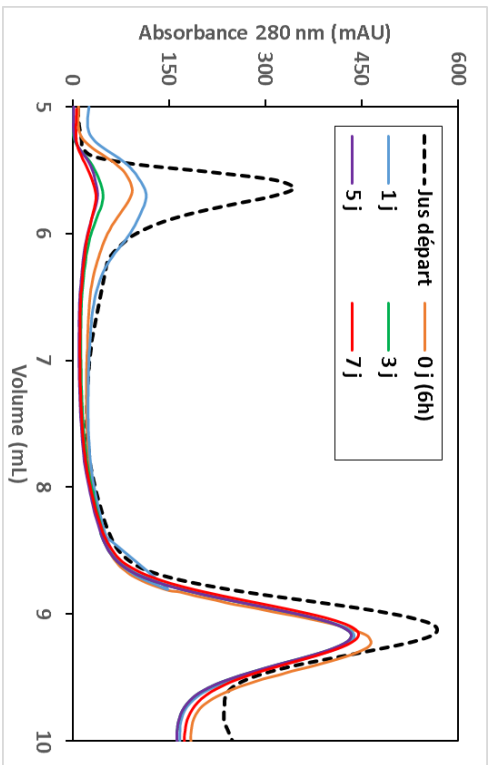
La figure II.19-A montre une évolution assez rapide des chromatogrammes dès la production du jus : alors que les deux pics concernant la Rubisco diminuent, le pic obtenu à un volume d'élution supérieur à 10 mL augmente légèrement. Dans la figure II.19-B, on observe cependant que la diminution du pic de la Rubisco monomère est limitée (en surface, mais aussi dans le temps), alors que celle du pic des agrégats de Rubisco est très importante et progresse considérablement dans le temps.

Les chromatogrammes de la figure II.20 montrent sensiblement le même comportement à pH 7 et 8, même si à pH 8 les résultats de la Rubisco monomère sont affectés d'une plus grande variabilité. Même si cela reste une hypothèse intéressante, il est impossible d'affirmer que la variabilité de la teneur en Rubisco monomère dans le temps à pH 8 est due à une désagrégation des oligomères. En effet, ce pH (et le temps écoulé entre chaque mesure) pourrait favoriser les interactions entre la protéine et les polyphénols (JERVIS et PIERPOINT 1989) conduisant à une augmentation de l'absorbance mesurée, sans augmentation réelle de la concentration de la protéine.

Le pH s'avère donc une variable essentielle pour la maîtrise du procédé. Des valeurs de pH entre 7 et 8 permettent de stabiliser la concentration en Rubisco monomère dans les jus, et cela durant au moins 7 jours de stockage à 4°C. Ces résultats encourageants montrent qu'il

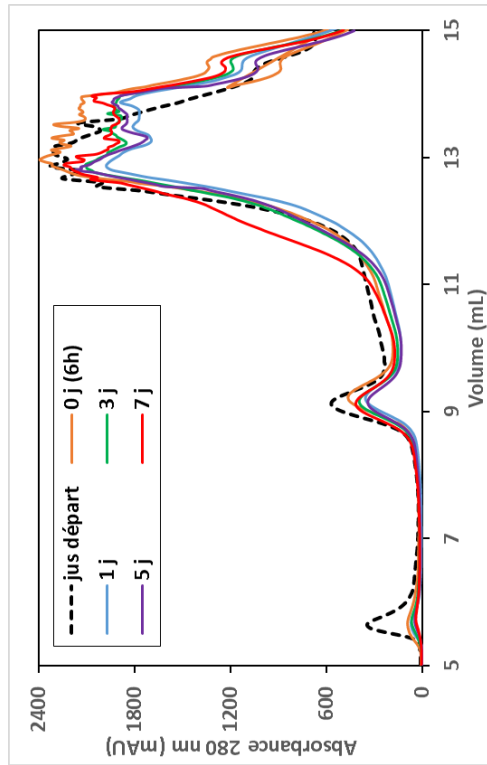


(A) Chromatogrammes entiers

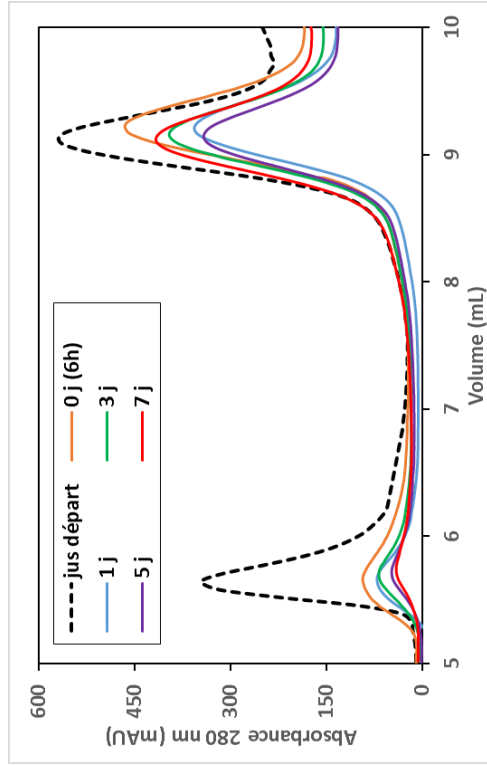


(B) Pics spécifiques de la Rubisco

FIGURE II.19 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus produit à partir du lot Luzerne\_5 après sa production (Jus départ), puis après ajustement du pH à 7 et stockage à 4°C pendant 7 jours.



(A) Chromatogrammes entiers



(B) Pics spécifiques de la Rubisco

FIGURE II.20 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus produit à partir du lot Luzerne\_5 après sa production (jus départ), puis après ajustement du pH à 8 et stockage à 4°C pendant 7 jours.

Tableau II.19 – Influence des conditions de pH sur la concentration en Rubisco sous la forme monomère du jus produit à partir du lot Luzerne\_5. (N.M. = Non mesuré)

Temps	Jus ajusté à pH 7		Jus ajusté à pH 8	
	Conc. Rubisco monomère (g/L)	pH	Conc. Rubisco monomère (g/L)	pH
6 h	5,6	7	3,2	8,1
1 j	5,4	7,1	4,6	7,9
3 j	5,7	7,3	5,2	7,8
5 j	5,8	7,5	4,4	7,8
7 j	5,7	7,4	N.M.	N.M.

serait nécessaire d’approfondir le travail afin de déterminer le pH minimal qui permet une bonne stabilisation de la Rubisco.

### 5.3.1.iii Utilisation d’additifs (inhibiteurs de protéases, agents réducteurs)

Comme indiqué précédemment, l’ajout d’additifs dans les jus végétaux est une méthode couramment utilisée pour la conservation de ces jus. Les inconvénients et les effets secondaires des agents protecteurs, ainsi que la complexité et les variétés de composés phénoliques et d’enzymes oxydatives pour lesquelles ils sont utilisés, rendent difficile, sinon impossible, de concevoir une procédure de production qui puisse être appliquée d’une manière satisfaisante à la plupart des végétaux (JERVIS et PIERPOINT 1989). Outre les effets de ces additifs au niveau du procédé, qu’il faudrait évaluer, le coût de ces additifs s’ils sont utilisés en grande quantité aura fortement un impact sur le coût global du procédé. Quelques essais ont été faits au cours de ce travail (ajout de protéases et de metabisulfite), tout en essayant de minimiser la quantité ajoutée, mais les résultats n’ont pas été probants et ne seront pas montrés ici.

### 5.3.2 Conservation des jus par congélation

Comme il a été déjà indiqué, la congélation est considérée avoir un impact négatif sur la stabilité de la Rubisco (KOSCHUH et al. 2004), car cela produirait la floculation de la plupart de la protéine. DOUILLARD et DE MATHAN (1994) ont recensé néanmoins des travaux dans lesquels la structure et l’activité enzymatique des protéines Rubisco d’origine végétale diverse restaient intègres lors de la congélation dans des solutions spécifiques, comme le sulfate d’ammonium. La congélation reste à ce jour une manière courante de conservation des jus présente dans la littérature de par la facilité de son utilisation (ZHANG et al. 2015; ZHANG et al. 2017). Ainsi, et avant que d’autres méthodes de conservation puissent être mises au point, la congélation a été utilisée aussi dans ce travail afin de stocker les jus produits. Dès lors, il peut être intéressant d’examiner si il y a une méthode de décongélation permettant de garantir la Rubisco dans sa forme native.

Trois modes de décongélation ont été testés sur des échantillons de 1 L du jus congelé pendant 2 mois provenant du lot Luzerne\_1 :

- Décongélation « lente », le jus congelé est laissé à 4°C toute la nuit,

- Décongélation à température ambiante pendant une durée de 3 à 4 h,
- Décongélation « rapide » à l'aide d'un four micro-ondes pendant une durée d'environ 1 h. La température du jus lors de la décongélation est contrôlée et elle reste inférieure à 30°C. La puissance utilisée pour le programme de décongélation est de 160 W.

Après décongélation le jus est analysé par HPLC-SEC afin de déterminer sa concentration en Rubisco. La figure II.21 montre les chromatogrammes obtenus selon les différentes conditions de décongélation et le tableau III.14 présente les valeurs des concentrations en Rubisco monomère obtenues ainsi que le pourcentage de pertes calculées par rapport à la concentration en Rubisco dans le jus dit « Frais », c'est-à-dire au moment de la production.

Tableau II.20 – Influence des conditions de décongélation sur la concentration en Rubisco sous la forme monomère du jus produit à partir du lot Luzerne\_1

Mode de décongélation	Concentration Rubisco (g/L)	% Pertes (référence jus «frais»)
Lente à 4°C	0,0	100,0
Température ambiante	1,2	78,1
«Rapide» four micro-ondes	3,1	43,8

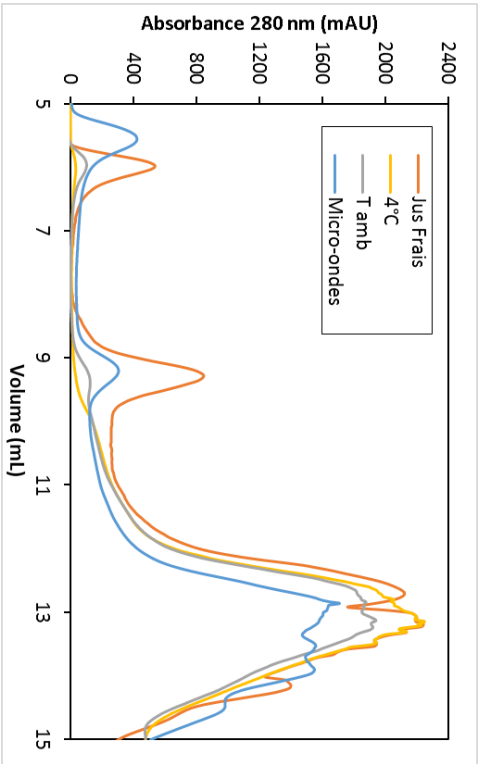
Le protocole de décongélation mis en œuvre en four micro-ondes est celui qui conduit à un jus avec la teneur en Rubisco monomère la plus élevée. Cependant une perte de 44% est constatée par rapport à la teneur initiale du jus « frais ». La décongélation lente à 4°C est la plus défavorable puisque la concentration de Rubisco monomère en solution dans le jus décongelé de cette manière est indétectable. Il semblerait donc que la vitesse de décongélation et/ou les micro-ondes aient une incidence sur la teneur en Rubisco monomère dans le jus décongelé, bien que les pertes restent élevées. Dans la figure II.21 on observe aussi que l'influence de la méthode de congélation sur le pic des agrégats de Rubisco est très variable.

Afin de vérifier la stabilité de la Rubisco dans les jus décongelés en four micro-ondes, et pour la comparer à celle de la Rubisco dans les jus « frais », le jus décongelé a été conservé à 4°C et la concentration en Rubisco de ce jus a été mesurée par HPLC-SEC sur une période de 4 jours. La Figure II.22 montre l'évolution des chromatogrammes au cours du temps et le tableau II.21 présente les valeurs des concentrations de Rubisco monomère obtenues.

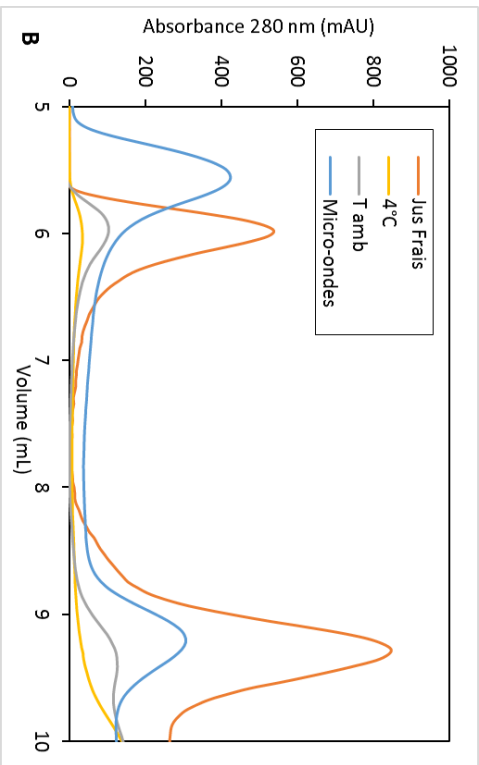
Tableau II.21 – Suivi de la teneur en Rubisco monomère du jus produit à partir du lot Luzerne\_1 décongelé suivant le protocole en four micro-ondes et stocké à 4°C

Temps conservation (jours)	Concentration Rubisco (g/L)	% Pertes (référence jus «frais»)	% Pertes (référence jus décongelé à T0)
0 (T0)	3,1	43,8	-
1	2,0	64,5	28,9
2	1,0	82,3	68,6
4	0,4	93,2	87,8

On observe que dès le premier jour après la décongélation, les pertes sont très importantes. En effet, l'évolution de la concentration en Rubisco monomère dans un jus maintenu à 4°C est très différente lorsque le jus a été congelé au préalable. Dans la figure II.23, la perte (calculée

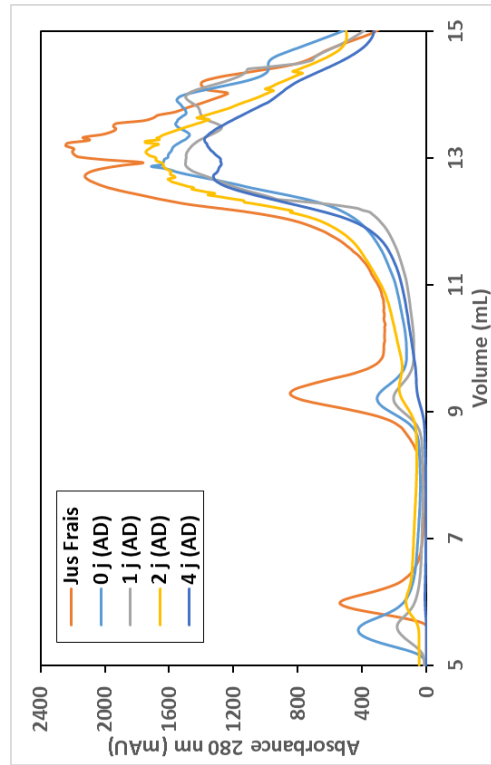


(A) Chromatogrammes entiers

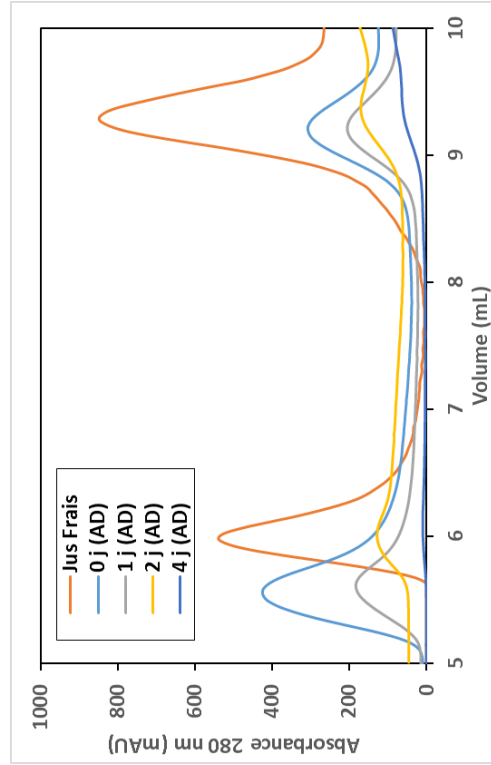


(B) Pics des agrégats de Rubisco et de la Rubisco monomère

FIGURE II.21 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus du lot Luzerne\_1 frais (au moment de la production) et après décongélation selon les trois protocoles.



(A) Chromatogrammes entiers



(B) Pics des agrégats de Rubisco et de la Rubisco monomère

FIGURE II.22 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC du jus du lot Luzerne\_1 frais (au moment de la production), décongelé en four micro-ondes et conservé à 4°C durant 4 jours. (AD : Après décongélation)



par rapport à la teneur en Rubisco du jus le jour de sa production) lors de la conservation à 4°C est indiquée pour le jus non congelé et le même jus après congélation /décongélation.

Il apparaît donc que la congélation n'est pas une méthode adéquate pour conserver les jus produits car, même en optimisant l'étape de décongélation, les pertes en Rubisco monomère dans les jus sont d'environ 44% et, en plus, la fraction récupérée est nettement moins stable que dans les jus jamais congelés.

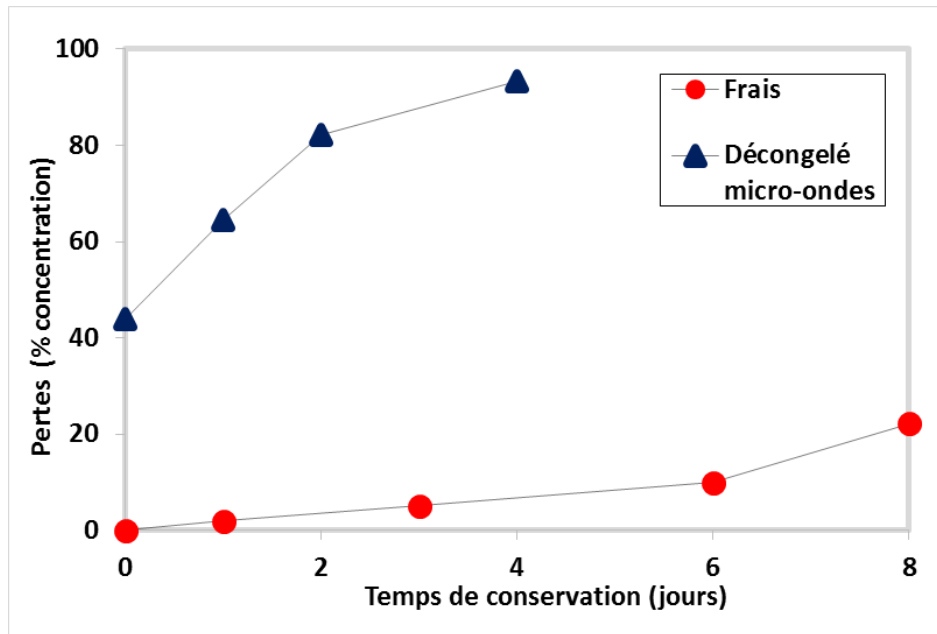


FIGURE II.23 – Perte de Rubisco monomère dans des jus produits avec le lot Luzerne\_1 conservés à 4°C, sans congélation (●), et après congélation/décongélation (▲).

### 5.3.3 Séchage par atomisation

Le séchage par atomisation est utilisé fréquemment dans l'industrie (et en particulier dans l'industrie agro-alimentaire) pour palier le problème de l'instabilité thermique des molécules. Si les températures appliquées restent relativement élevées, les temps durant lesquels les molécules se trouvent soumises à de telles températures sont très courtes, grâce à l'atomisation ou division en petites gouttes de l'échantillon à sécher. Des jus atomisés avaient été utilisés dans le travail de KERFAI (2011), montrant que la conservation de la poudre sèche des jus et en particulier de la Rubisco était très bonne. Dans la littérature, peu de travaux font mention de l'atomisation comme façon de conserver les jus, mais DOUILLARD et DE MATHAN (1994) recensent quelques travaux dans lesquels des solutions de Rubisco, voire des jus, ont été traités par atomisation.

Au-delà de faciliter le stockage des jus et la conservation de la Rubisco, l'atomisation pourrait aussi répondre aux difficultés naturelles liées à la variabilité de la ressource. Parmi

les avantages de l'atomisation, on peut mentionner :

- une gestion facilitée de la ressource agricole, car elle permet de rendre indépendant le procédé des flux de matières premières saisonnières ;
- une réduction conséquente du volume des jus facilitant le stockage et la conservation ;
- une stabilisation des molécules d'intérêt (par exemple les protéines). Il a été démontré dans certains cas, que le séchage par atomisation permet même une stabilisation de la molécule d'intérêt ;
- la possibilité d'optimiser les conditions de travail, par une reconstitution de jus avec des solutions diverses et avec des conditions adaptées (concentration, pH, ..).

Ainsi, l'atomisation a été mise en œuvre afin de produire une poudre sèche, dont la reconstitution permet d'obtenir un jus dit « reconstitué » dans lequel la teneur et la stabilité de la Rubisco seraient équivalentes à celles du jus au moment de la production.

Les essais de séchage par atomisation ont été réalisés, dans le cadre du partenariat du projet RUBIS, au laboratoire RAPSODEE, qui a défini les conditions de travail et réalisé les expériences. L'équipement utilisé est un atomiseur NIRO à l'échelle pilote d'une capacité de 1 L/h. Les conditions d'atomisation sont fixées pour avoir des températures d'entrée de 120°C et de sortie de 70°C. Après atomisation la poudre obtenue est stockée à -20°C, condition vérifiée par KERFAI (2011).

Après séchage de la poudre atomisée, celle-ci est remise dans de l'eau ultra-pure en respectant la teneur en matière sèche déterminée dans le jus de départ (indiquée dans le tableau II.17). La suspension obtenue est appelée jus reconstitué. Après centrifugation, la teneur en Rubisco est mesurée par HPLC-SEC.

Au total six lots de jus produits par divers lots (cinq de luzerne et un de ray-grass) ont été atomisés. Le tableau II.22 présente un récapitulatif des expériences réalisées avec les conditions opératoires utilisées et les résultats obtenus.

Le rendement de récupération est défini par rapport à la masse de poudre qui devrait être obtenue compte tenu de la teneur en matière sèche du jus.

Les résultats montrent un rendement de récupération moyen de 85%, dans les conditions de travail, pour les différents lots de jus de luzerne traités. Pour le jus produit à partir du ray-grass, le rendement (65%) est nettement inférieur et la concentration en Rubisco monomère du jus reconstitué (0,2 g/L) est moindre par rapport au jus frais.

Les résultats obtenus avec le ray-grass ont été associés à des difficultés importantes d'opération durant l'atomisation (et dans l'étape de chromatographie, dont les résultats ne seront pas montrés). En effet, des phénomènes de collage, et une grande difficulté d'écoulement de ces jus ont été observés avant atomisation, ce qui a rendu difficile la conduite des expériences. Bien que ce comportement n'ait pas fait l'objet d'études dans le cadre de ce travail, il a été relié à la composition biochimique du ray-grass (cf paragraphe 5.2.4 de ce chapitre). Après atomisation, ces jus (mais aussi ceux produits par les lots de luzerne) voient leurs propriétés mécaniques changer très fortement. Dans la littérature, les polymères amorphes sont fréquemment caractérisés par une température, appelée de transition vitreuse ( $T_g$ ) (PEREZ et al. 1990), qui

Tableau II.22 – Conditions opératoires et résultats obtenus dans les expériences de séchage par atomisation des jus végétaux

Lot	Conservation avant atomisation	Masse de jus traité (kg)	Masse de poudre obtenue (g)	Rendement de récupération (% MS)	Concentration en Rubisco monomère du jus avant séchage (g/L)	Concentration en Rubisco monomère du jus reconstitué (g/L)
Luzerne_0	Congelé à -20°C durant 4 mois	1,7	134,5	85	N.D.	N.D.
Luzerne_4	Congelé à -20°C durant 2 mois, centrifugé	2,7	193,0	82	2,9	2,7
Luzerne_5	Frais à 4°C de 1 à 2 jours	10,6	859,0	86	3,5	5,3
Luzerne_6	Frais de 1 à 4 jours	35,0	2107,0	86	4,5	4,3
Luzerne_7	Frais (ajusté à pH 7,5) à 4°C de 1 à 5 jours	40,0	2520,0	84	4,7	4,8
Ray-Gras	Centrifugé, frais à 4°C durant 2 jours	3,5	91,0	65	0,7	0,2

représente un intervalle des températures durant lequel le polymère subit une transformation d'un état amorphe à un autre dit caoutchouteux, dont les propriétés mécaniques sont totalement différentes. Cela s'applique aux polymères d'origine végétale ou alimentaire (RONKART et al. 2009) comme aux plastiques industriels. Pour les constituants habituels des parois végétales, les températures de transition vitreuse sont considérées relativement élevées, de l'ordre de 250°C (KELLEY et al. 1987). Par contre, tous ces auteurs s'accordent à dire que la présence d'eau, qui agit comme un plastifiant, dans les milieux peut réduire très fortement les valeurs de Tg, notamment à des valeurs en dessous de 100°C. Ceci pourrait expliquer le changement de comportement à l'écoulement des jus, et sera notamment essentiel pour le fonctionnement du procédé chromatographique.

Les résultats montrent, par contre, que pour les différents jus produits par les lots de luzerne la teneur en Rubisco monomère après reconstitution du jus est équivalente à celle du jus avant atomisation.

Le lot Luzerne\_5 présente un résultat particulier. En effet, on observe une concentration en Rubisco monomère plus grande dans le jus reconstitué que dans le jus avant atomisation. La figure II.24 compare les profils chromatographiques obtenus par HPLC-SEC pour ces deux jus. On peut observer en effet une augmentation du pic de la Rubisco monomère, qui se traduit par une augmentation de la concentration de 3,5 g/L dans les jus frais à 5,3 g/L dans le jus reconstitué. Puisque les teneurs en matière sèche des deux jus sont égales, cette augmentation de concentration ne peut s'expliquer que par la diminution du pic des agrégats de la Rubisco, qui est aussi observable sur la figure II.24.

L'étude de l'impact de l'atomisation sur les polyphénols, et leur interaction éventuelle avec la Rubisco, a été initiée. Les chromatogrammes obtenus par l'analyse HPLC-SEC des

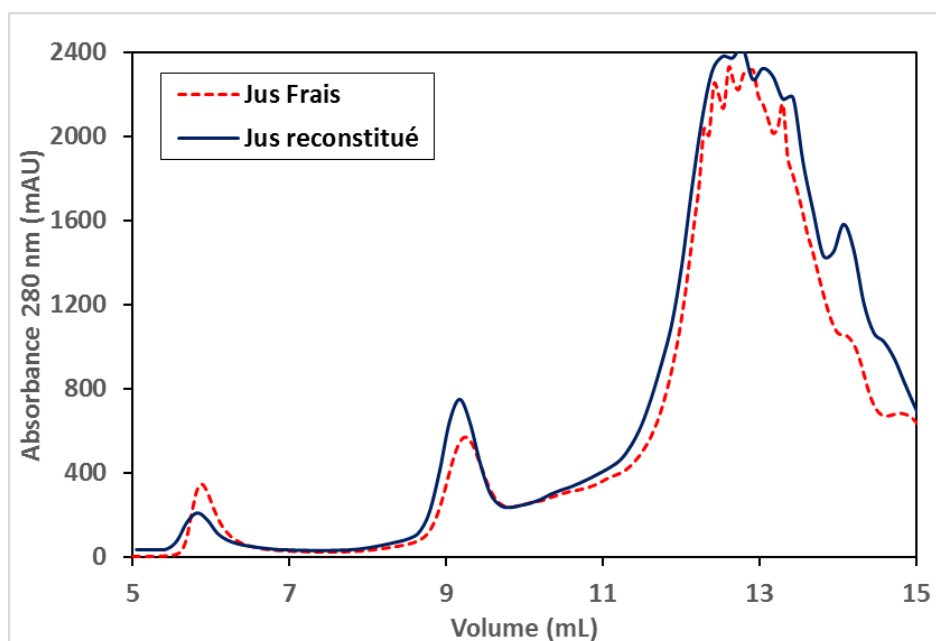


FIGURE II.24 – Comparaison des chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC à partir du jus frais et du jus atomisé et reconstitué, produits avec le lot Luzerne\_5

jus frais et des jus atomisés, puis reconstitués, produits par le lot Luzerne\_7 sont représentés dans la figure II.25, avec mesure de l'absorbance à 280 nm et 340 nm (cf. paragraphe 5.2.1 de ce chapitre). On observe une superposition des pics de la Rubisco monomère dans les deux chromatogrammes, que ce soit à 280 nm ou à 340 nm. Cela indique que les teneurs en Rubisco monomère et en polyphénols sont égales pour les deux jus.

La figure II.25 montre aussi une réduction du pic des agrégats de la Rubisco (y compris pour les mesures à 340 nm) et une augmentation du signal des pics élués entre 12 et 14 mL. Cette tendance est vérifiée pour toutes les expériences réalisées avec des lots de luzerne, quel que soit le prétraitement subi avant atomisation. On observe donc que globalement, l'atomisation a un impact sur l'allure des chromatogrammes obtenus, ce qui implique des modifications de la composition et/ou des propriétés ou de la structure des constituants entre le jus frais et le jus atomisé et reconstitué. Seul le pic de la Rubisco monomère semble ne pas être affecté (ou être peu affecté) par ces modifications.

Les jus contiennent un très grand nombre de produits, de telle manière qu'il n'est pas possible de les séparer et d'obtenir une courbe de calibration pour chacun d'entre eux. Pour cette raison, il est difficile d'associer la diminution d'un pic ou la variation d'un profil avec l'augmentation de la teneur de certains composés.

En conclusion, le séchage par atomisation est retenu comme un procédé très intéressant pour la conservation du jus, compte tenu du comportement de la Rubisco monomère. De plus, la teneur en protéine des jus atomisés et reconstitués reste égale à celle du jus frais, ce qui montre que la Rubisco est stable dans la poudre et cela durant des semaines (résultats non

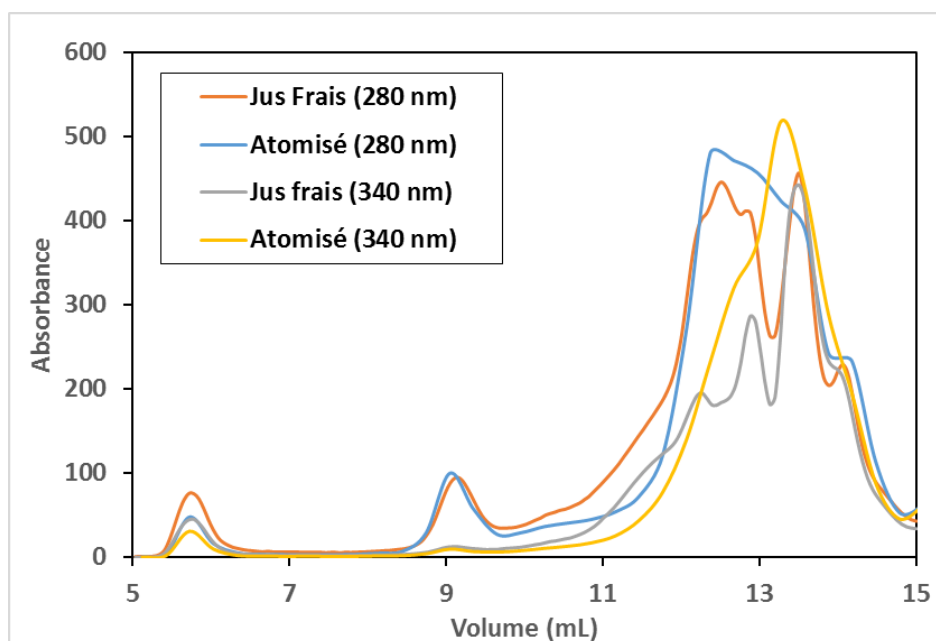


FIGURE II.25 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC avec détection à 280 nm et 340 nm du jus frais (dilué 8 fois) et du jus atomisé et reconstitué (dilué 8 fois) produits à partir du lot Luzerne\_7

montrés ici). Enfin, comme il a été précisé, et bien que le sujet n'ait pas été davantage analysé dans ce travail, l'atomisation induit une modification du comportement mécanique des jus, qui sera essentiel au fonctionnement du procédé.

## 5.4 Conclusion

Les méthodes d'analyse de la Rubisco ont permis de mettre en place la caractérisation de la teneur en Rubisco des jus produits à partir de sources végétales différentes. Outre la teneur en protéines des jus, c'est uniquement la Rubisco, et en particulier sa forme monomère (appelée simplement Rubisco dans le reste du travail) qui doit être maîtrisée. Les différences entre les deux sont importantes (c'est normal puisque la Rubisco constitue jusqu'à 70% des protéines hydrophiles) mais peuvent parfois représenter des pertes relativement importantes dans le procédé. Elles dépendent notamment des conditions physico-chimiques de production des jus, qui doivent alors être optimisées. Les facteurs étudiés qui ont la plus grande influence sur la stabilité de la Rubisco sont le pH et la température, pour lesquels des gammes de conditions de travail ont été proposées.

Les matières premières étant produites de façon saisonnière, des méthodes de conservation des jus produits ont été nécessaires pour la réalisation du projet (comme ce serait le cas pour une éventuelle mise en œuvre industrielle). La congélation reste une technique de conservation classique et simple, très utilisée malgré l'effet négatif qu'elle peut avoir sur la protéine. Le séchage par atomisation permet par contre une parfaite conservation de la concentration en

Rubisco des jus, favorise le stockage grâce à la très forte réduction du volume et la protéine est plus stable dans les jus une fois reconstitués.

Ces procédés de conservation vont jouer aussi un autre rôle important dans le procédé : ils peuvent modifier les propriétés mécaniques des jus, facilitant par exemple leur traitement dans le procédé. Ainsi, il a été observé qu'après séchage par atomisation les jus de luzerne deviennent moins visqueux et collants. Ce point sera davantage discuté dans le chapitre suivant, lors de l'étude de la mise en œuvre de la séparation chromatographique. Cependant, les propriétés mécaniques des jus, conséquence notamment de la composition biochimique des plantes dont ils sont issus, peuvent être rédhibitoires pour l'application du procédé. Ainsi, les jus de ray-grass, dont les propriétés sont adéquates après atomisation, sont tellement collants que leur traitement par atomisation reste très compliqué. On voit donc que la sélection des matières premières nécessite de s'intéresser à des paramètres plus généraux que la seule teneur en Rubisco des jus produits.

## 6 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, des questions à la frontière entre le végétal, la chimie et le génie des procédés ont été abordées. Elles ont été un préalable essentiel pour le positionnement, la compréhension voire la réalisation de ce travail. Dans un premier temps, des plantes susceptibles d'avoir un intérêt particulier ont été recensées. La production des jus végétaux est la première étape du procédé, permettant la mise en solution de la protéine. La production des jus dans une presse à vis pour biomasse verte a été étudiée, en considérant notamment l'influence des facteurs externes liés à la récolte sur le rendement. Afin de caractériser les jus de manière plus approfondie, et d'une façon plus générale pour les besoins du projet, des méthodes analytiques spécifiques à la Rubisco ont été analysées ou développées. Cela a permis notamment de mettre en évidence dans les jus, deux formes différentes de Rubisco, le monomère recherché, et des formes oligomères. Enfin, s'agissant d'une matière végétale, fortement évolutive et dont la disponibilité est ponctuelle, des méthodes de stockage et leur influence sur la conservation de la protéine ont été évaluées. Le séchage par atomisation a montré de bons résultats car il permet une bonne conservation de la protéine sous forme monomère, plus stable par la suite, et pouvant être conservée à froid ( $-4^{\circ}\text{C}$ ) très longtemps.

Des questions importantes sont encore à étudier, notamment les conditions qui favorisent l'agglomération des monomères de Rubisco, les transformations qui ont lieu dans les jus lors de l'atomisation, la mise au point de la technique BLI dans les jus... Elles constituent autant de perspectives d'amélioration du procédé.



# Procédé de purification de la Rubisco

## Sommaire

1	Introduction . . . . .	115
2	Extraction de la Rubisco à partir des jus végétaux clarifiés par CEI . . . . .	117
2.1	Principe . . . . .	117
2.2	Étude des différentes résines pour la rétention de la Rubisco à partir de jus végétaux . . . . .	122
2.3	Expériences de changement d'échelle . . . . .	137
2.4	Conclusions . . . . .	157
3	Purification et conditionnement . . . . .	159
3.1	Introduction . . . . .	159
3.2	Objectif . . . . .	160
3.3	Principe . . . . .	161
3.4	Démarche expérimentale . . . . .	167
3.5	Présélection des membranes . . . . .	168
3.6	Expériences d'ultrafiltration/diafiltration à échelle laboratoire . . . . .	169
3.7	Conclusion . . . . .	186

## 1 Introduction

Comme évoqué dans les chapitres précédents, l'objectif de ce travail est d'étudier les conditions permettant d'obtenir des isolats de Rubisco, dans un milieu tamponné, avec des teneurs en sel et un pH contrôlés, favorisant la stabilité de la protéine et le maintien de ses propriétés fonctionnelles. Pour cela, deux opérations de séparation ont été mises en œuvre et étudiées : la chromatographie d'échange d'ions et la séparation membranaire par Ultrafiltration (UF). Elles seront présentées plus en détails dans ce chapitre.

La chromatographie d'échange d'ions est une opération coûteuse, et donc utilisée normalement en dernière étape, pour une purification finale. Cependant, de nombreux travaux publiés essentiellement depuis les années 2000 ont tenté de mettre en avant la sélectivité de la



chromatographie afin de l'utiliser en tant qu'opération de capture et d'extraction d'une molécule d'un milieu complexe, permettant de réduire fortement le nombre d'étapes des procédés, grâce aux opérations en lit fluidisé ou expansé (HICKETIER et BUCHHOLZ 2002, CHEN et al. 2004, VAN BOXTEL et al. 2006).

L'ultrafiltration utilisée en mode Diafiltration (DF) apparait, quant à elle, comme une opération de grand intérêt pour la purification finale et l'ajustement des conditions physico-chimiques du milieu, compte tenu de la différence importante de taille existant entre la protéine et les autres solutés. Cependant, les valeurs de concentrations en protéine recherchées étant élevées, cela peut constituer un frein qu'il est nécessaire d'analyser (ARAKAWA et al. 2017).

Les deux opérations seront présentées l'une après l'autre. Pour chaque opération, les principes scientifiques et techniques de base seront rapidement rappelés. S'agissant d'opérations de séparation sur un support solide, le choix des matériaux, les équipements et les modes d'opération seront présentés et discutés. Enfin, les expériences réalisées et les résultats obtenus seront synthétisés et discutés. Cela inclut le changement d'échelle et la caractérisation des milieux et de la protéine obtenue. Enfin, les principales conclusions de ces travaux seront énoncées.

Quatre contraintes principales ont fortement conditionné le travail.

- L'utilisation exclusive des milieux réels et l'utilisation de jus produits à partir de matières premières végétales traitées dans le laboratoire. Pour cette raison, le contrôle des conditions opératoires n'a pas toujours été possible ou suffisant. De même, certaines expériences que l'on aurait souhaité faire n'ont pas pu être réalisées, car la quantité de matière première nécessaire dépassait parfois la capacité du laboratoire à les gérer.
- Les méthodes d'analyse et la quantité d'échantillons à analyser, qui ont représenté une partie très importante du travail, et dont la fiabilité (interférences) a été régulièrement questionnée tout au long du travail.
- La volonté de s'approcher au maximum des conditions réelles dans lesquelles le procédé pourrait être mis en œuvre à l'échelle industrielle afin d'identifier les principaux verrous et limitations.
- La nécessité de produire la protéine en quantité suffisante pour les manipulations qui ont permis la validation des méthodes de dosage de la protéine et pour les manipulations nécessaires à l'étude de ses propriétés fonctionnelles. Cette nécessité a parfois conduit les travaux en dépit du développement des connaissances.

Ces contraintes ont pu parfois limiter l'apport en connaissances fondamentales de ce travail, mais elles constituent une garantie de la faisabilité du procédé étudié, ce qui pourrait permettre un développement industriel relativement rapide. Elles ne constituent cependant pas l'assurance que le procédé industriel sera viable, car il faut en plus prouver que les compromis économiques (investissements/fonctionnement/temps/fiabilité/complexité...) sont respectés ce qui nécessite parfois des technologies ou des apports scientifiques complémentaires (TONDEUR 1994).

## 2 Extraction de la Rubisco à partir des jus végétaux clarifiés par CEI

### 2.1 Principe

La CEI est une opération de séparation basée sur l'affinité d'un ion (le soluté d'intérêt) pour un support solide (la résine). La résine est chargée à l'opposé de celle du soluté et neutralisée par un autre ion, avec qui le soluté va s'échanger. La réaction d'échange est réversible et respecte l'électroneutralité de chaque phase. Ainsi, contrairement à l'adsorption, avec qui elle est souvent associée, la réaction d'échange obéit à des rapports stœchiométriques stricts (NICOLAS-SIMONNOT 1991). Lors de l'échange, la matrice n'est pas fondamentalement modifiée mais, comme on le verra, elle peut subir des changements de volume ou gonflements.

L'application de la CEI à la séparation des protéines est une des applications les plus courantes et fait l'objet d'une abondante littérature. À titre d'exemple, on peut citer les travaux de DIEDERICH et al. (2015), LOJEWSKA et al. (2016), LI et SUN (2014), STONE et CARTA (2007), MÜLLER (2005). Bien que les protéines soient des polyélectrolytes, elles sont souvent considérées comme ayant une charge nette selon le pH du milieu dans lequel elles se trouvent, positive si le pH est inférieur à son point isoélectrique (pI), et négative si le pH est supérieur au pI. Le phénomène d'échange d'ions est ainsi prépondérant dans la séparation.

Cependant, la nature complexe des polymères que sont les protéines, avec des résidus hydrophiles et hydrophobes, de caractère acido-basique variable, fait que d'autres phénomènes que l'échange d'ions peuvent avoir lieu lors de la mise en œuvre des procédés de séparation. Ainsi, leur charge nette n'est pas toujours suffisante pour décrire tous les mécanismes possibles de rétention d'une protéine sur un support aussi spécifique qu'une résine d'échange d'ions. Il a été prouvé, par exemple, que des protéines avec des valeurs de pI et des valeurs de charge nette très proches peuvent avoir des capacités de rétention différentes dans la même résine échangeuse d'ions (DEPHILLIPS et LENHOFF 2001). De plus, PEZZINI (2011) a mis en évidence que des forces d'interaction de nature hydrophobe peuvent intervenir dans la protéine, créant des changements structuraux qui peuvent modifier le comportement chromatographique des protéines.

#### 2.1.1 Les résines d'échange d'ions

La résine d'échange d'ions est au cœur du procédé. Il s'agit essentiellement d'une matrice solide poreuse plus ou moins rigide (qui ne participe pas à la réaction d'échange) à l'intérieur de laquelle des groupes fonctionnalisés ont été greffés. Différentes matrices solides, très simples ou relativement complexes, et différents groupes fonctionnels sont disponibles commercialement afin d'assurer des applications très variées (WAKKEL 2015). LENHOFF (2011) a proposé une analyse approfondie des résines, basée entre autres sur la structure et la distribution des groupes fonctionnels et montrant leurs effets sur le transport des protéines, dans l'objectif d'identifier les principaux axes de nouveaux développements.

Selon la nature ionique du groupe fonctionnalisé, la résine peut être anionique (pour l'échange d'anions) ou cationique (pour l'échange de cations). Elle est aussi dite acide ou basique, et peut être forte ou faible, selon la force acidobasique du groupe. Les résines dites fortes, dont la capacité ne dépend pas du pH, sont les plus courantes, mais les résines dites faibles, dont la capacité dépend du pH, peuvent assurer des conditions de travail plus spécifiques selon le milieu.

Parmi les matrices les plus étudiées et utilisées actuellement on peut mentionner de nombreux polymères organiques ou encore la silice (BARRANDE et al. 2009 ; ANGELO et al. 2016 ; CARVALHO et al. 2005 ; MATSUI et al. 2015 ; SARMENTO et al. 2000). Une grande partie des matrices pour les bioséparations sont macroporeuses, c'est-à-dire que les pores internes sont abondants et larges, afin de faciliter la diffusion des solutés, notamment lorsque ceux-ci ont une grande taille, comme dans le cas des protéines. Les matrices polymériques sont notamment caractérisées par leur degré de réticulation : plus la réticulation est élevée plus la matrice est rigide, et plus le degré de réticulation est bas, plus la matrice est souple. Elle peut alors subir des phénomènes d'expansion et de contraction qui peuvent rendre l'opération en colonne en lit fixe plus délicate car à l'origine des surpressions ou d'autres modifications hydrodynamiques dans les colonnes (NICOLAS-SIMONNOT 1991).

Outre la variation de volume d'une résine par l'échange d'ions de taille différente, le phénomène du gonflement peut conduire à des variations importantes de taille des particules de résine. Le gonflement consiste en une dilatation de la particule de résine par l'effet principalement de la pénétration du solvant (HELFFERICH 1962). Les origines du gonflement sont multiples, avec principalement la solvatation des constituants ioniques ou polaires à l'intérieur des résines (eau liée), et le phénomène d'osmose (eau libre) occasionné par une concentration élevée d'ions dans les particules. La matrice étant insoluble, elle oppose une certaine résistance à cette pénétration, le système arrivant finalement à une situation d'équilibre en fonction surtout des conditions de salinité et de la nature du soluté. Le gonflement, lorsqu'il a lieu, doit être correctement prédit lors de la mise en œuvre du procédé, afin d'éviter des difficultés opérationnelles majeures par la suite (réduction du volume poreux de la colonne, augmentation de la perte de charge, ...).

Enfin, les résines d'échange d'ions se présentent le plus souvent sous la forme de particules sphériques de petite taille, en général, de 20  $\mu\text{m}$  à 150  $\mu\text{m}$  de diamètre dans les bioséparations. Cela permet de réduire au maximum la résistance par le transport interne (diffusion des solutés à l'intérieur des pores de la matrice), mais aussi pour assurer la plus grande surface d'échange possible entre le solide et la solution. Ces limitations sont d'autant plus importantes à minimiser que les solutés à séparer sont des protéines, donc des macromolécules de grande taille et faible coefficient de diffusion même en solution aqueuse (de l'ordre de  $10^{-11}$  à  $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour une protéine de la masse molaire de la Rubisco, d'après TYN et GUSEK (1990)). La limite inférieure de taille de particule est en général imposée par les pertes de charges occasionnées dans les colonnes lors de leur utilisation.

### 2.1.2 Mise en œuvre du procédé

Bien que ce ne soit pas la seule possible, la mise en œuvre du procédé a lieu le plus souvent dans la forme dite en lit fixe, c'est-à-dire, avec la résine pacquée en colonnes de diamètre et hauteur variables. Afin de réduire au maximum la dispersion et d'obtenir une bonne séparation, les particules de résine sont bloquées à l'intérieur de la colonne empêchant ainsi leur mouvement et donc le mélange. D'autres modes d'opération, comme le lit mobile simulé (ANDERSSON et MATTIASSON 2006 ; SATZER et al. 2014) et le lit fluidisé ou expansé (HICKETIER et BUCHHOLZ 2002 ; BAUMEISTER et al. 2003 ; BIAZUS et al. 2006), sont aussi possibles.

L'échange d'ions est une opération strictement discontinue. La résine utilisée doit être successivement en charge, lavée, éluée et régénérée pour un nouvel usage. Le procédé peut cependant fonctionner de manière continue, semi-continue ou discontinue selon la façon dont ces différentes opérations se déroulent au sein de l'installation.

La charge et l'élution constituent les étapes clés du procédé. Lors de la charge, la molécule d'intérêt est fixée dans la colonne. Lors de l'élution elle est récupérée, plus pure et normalement plus concentrée que dans l'alimentation.

Classiquement, le procédé peut être mis en œuvre suivant trois méthodes, dont la différence principale est la façon de réaliser l'élution : dans la chromatographie dite frontale, la différence d'affinité par la résine des constituants du mélange sert à effectuer l'élution, sans ajout de solutions spécifiques ; dans la chromatographie de déplacement, un composé est ajouté dans l'alimentation, dont l'affinité par la résine est supérieure à celle des constituants de l'alimentation, et va permettre l'élution ; et dans la chromatographie d'élution une solution spécifique est utilisée pour réaliser l'élution, une fois la charge de l'échantillon à séparer finalisée. Enfin, dans ce dernier cas, la solution d'élution alimentée peut être de composition fixe (élution en mode isocratique) ou avec une solution dont la composition évolue progressivement (élution en mode gradient).

L'évolution de la concentration du soluté en sortie de la colonne lors de la charge est appelée courbe de percée. Elle permet de déterminer la capacité d'échange de la colonne dans les conditions de travail souhaitées. L'évolution de la concentration du soluté en sortie de la colonne lors de l'élution permet quant à elle de déterminer la sélectivité ou résolution de la séparation, et le facteur de concentration obtenu. Elles sont fondamentales pour le dimensionnement du procédé, puisqu'elles seront directement reliées à la capacité de production et aux autres variables de conduite du procédé.

Cependant, l'analyse des courbes de percée et d'élution lors du travail avec des milieux complexes n'est pas aisée, puisque chaque échantillon en sortie de la colonne ne contient généralement pas que le soluté d'intérêt mais aussi de nombreux autres constituants qui ont pu aussi participer à des réactions d'échange.

Dans le cadre de ce travail, où la chromatographie n'est pas utilisée comme procédé de purification mais de captage et d'extraction de la protéine de son milieu, la chromatographie

d'élution est mise en œuvre mais son application est partiellement modifiée. En effet, compte tenu de la complexité du milieu, les principes de la chromatographie frontale sont aussi mis à contribution puisque l'alimentation est introduite dans la colonne de manière continue jusqu'à sa saturation. L'objectif de cette modification est de permettre un déplacement des composants indésirables retenus dans la colonne par la Rubisco, permettant leur élimination préalablement à l'élution et donc une meilleure séparation. Ainsi, lors des expériences, la charge est prolongée autant que possible jusqu'à la saturation en Rubisco. Ensuite, la colonne est lavée puis éluée. Lorsque la solution en sortie de colonne durant la charge contient à nouveau une concentration importante en Rubisco, il peut être par exemple envisagé son alimentation dans une deuxième colonne jusqu'à l'épuisement de la protéine. Enfin, dans ce travail, l'élution de la résine s'est faite en mode isocratique, c'est-à-dire avec une solution de sel de concentration constante.

### 2.1.3 Démarche expérimentale

Pour répondre aux objectifs de cette étude, la mise en place des expériences s'est effectuée en prenant en compte progressivement la sélection de la résine et le changement d'échelle. Ainsi, notre démarche est proche de celle proposée par RATHORE et VELAYUDHAN (2003) qui est résumée dans la Figure III.1.

#### 2.1.3.i La sélection de la résine

Tout d'abord une présélection de sept résines a été effectuée en fonction de leurs propriétés physicochimiques et de leurs avantages pour la séparation de protéines de grande taille, comme c'est le cas de la Rubisco. Dans ces expériences, une purification totale de la Rubisco n'est pas recherchée car des étapes ultérieures du procédé permettront éventuellement d'améliorer la séparation. Ce qui est principalement recherché est d'assurer une rétention et une concentration d'élution élevées.

Ainsi, deux types d'expériences préliminaires ont été réalisés, selon le mode de contact entre la résine et les jus contenant la Rubisco :

- dans un premier temps, des expériences en mode batch ont permis de vérifier la capacité des résines à retenir la Rubisco d'une manière simple et rapide, dans les conditions d'opération recherchées.
- dans un second temps, des expériences préliminaires en colonne en lit fixe à l'échelle laboratoire ont permis d'évaluer et de comparer la rétention de la Rubisco dans les différentes résines. En particulier la capacité de rétention, le facteur de concentration et l'affinité obtenus avec les différentes résines ont été déterminés. Ces essais préliminaires ont permis aussi de faire une première analyse du procédé dans le mode de fonctionnement choisi.

A l'issue de ces expériences préliminaires, la résine a été sélectionnée pour le changement d'échelle et la réalisation des expériences de validation.

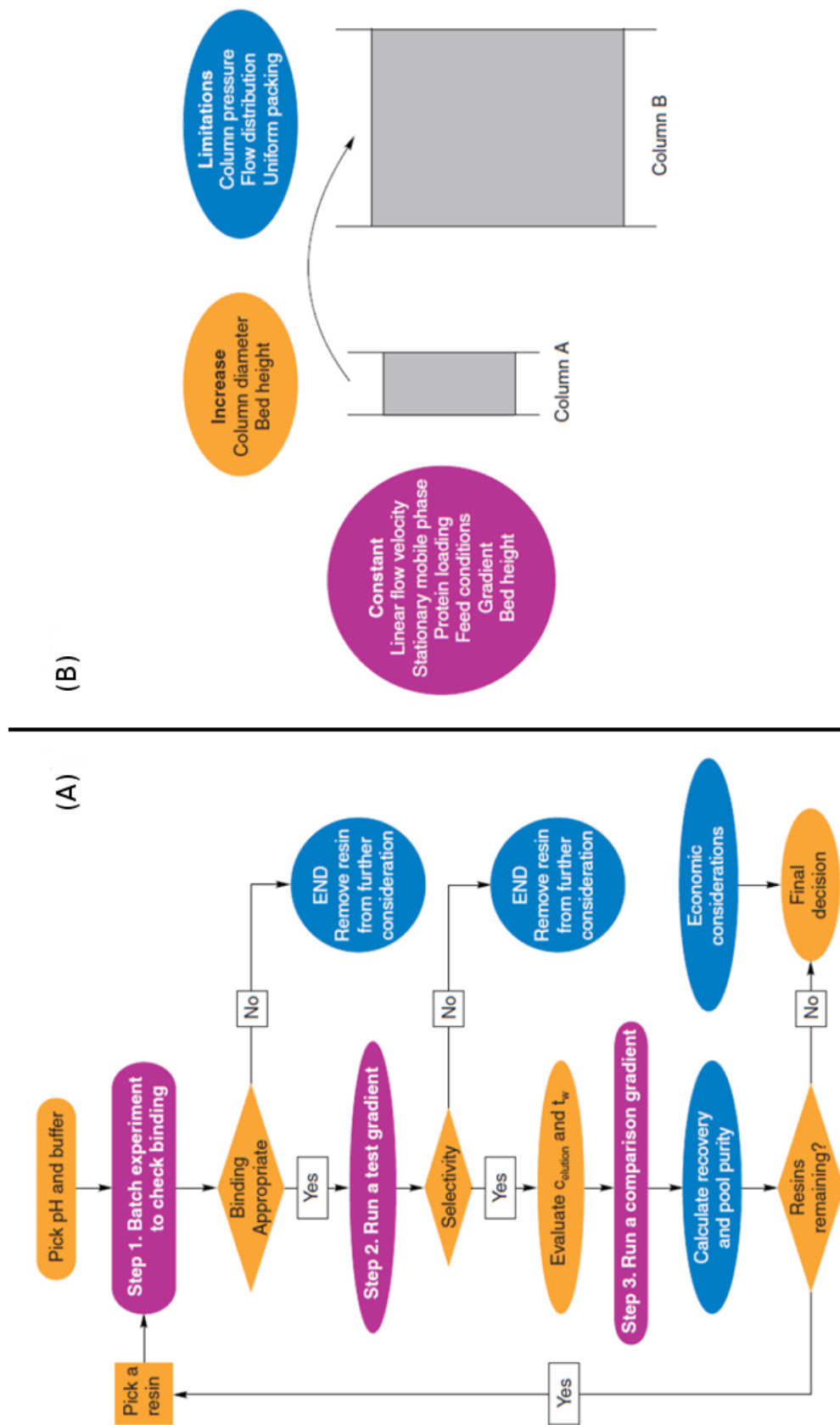


FIGURE III.1 – Schémas de développement d'un procédé de chromatographie préparative (RATHORE et VELAYUDHAN 2003).

### 2.1.3.ii Le changement d'échelle

L'idée essentielle du changement d'échelle est de montrer que la qualité de la séparation peut être maintenue lorsqu'on augmente la taille de l'équipement. En effet, il n'est pas évident de prédire a priori le comportement du système à grande échelle, et la progression par étapes permet de valider le fonctionnement du procédé.

Après sélection de la résine, des expériences en colonne en lit fixe ont été réalisées à deux échelles différentes : laboratoire et petit pilote. Pour chaque échelle, la hauteur de la colonne a été maintenue constante. De la même manière, la vitesse superficielle d'alimentation des solutions a été constante (autant que possible), afin de garantir un même temps de passage dans la colonne, et donc les mêmes phénomènes et/ou limitations (mêmes pertes de charge, mêmes limitations par les transferts...). Cette dernière contrainte n'a pas toujours pu être respectée pour des raisons propres aux différents tests.

1. Échelle laboratoire : des expériences ont été réalisées dans un premier temps dans une colonne de 16 mm de diamètre interne afin de valider les résultats préliminaires. Dans un deuxième temps, une colonne de 50 mm de diamètre interne a été utilisée.
2. Échelle pilote : un dispositif expérimental versatile et instrumenté, équipé d'une colonne de 140 mm de diamètre interne, a été développé et caractérisé. Il a servi à des objectifs multiples : de compréhension, grâce à une métrologie poussée, de production de Rubisco, grâce à sa capacité supérieure, et bien évidemment, à valider les résultats obtenus à l'échelle laboratoire.

Comme pour les essais préliminaires, l'influence des conditions opératoires, ainsi que les caractéristiques des jus alimentés sont analysées. Cette analyse a permis d'identifier à l'échelle intermédiaire de laboratoire, des possibles difficultés ou limitations du protocole expérimental, avant de passer à l'étape de scale-up proprement dite. Les expériences à échelle pilote ont permis de valider l'opérationnalité de chaque étape, et cela dans des conditions plus contraignantes car des facteurs comme le temps et les volumes traités peuvent avoir un impact important sur le procédé.

## 2.2 Étude des différentes résines pour la rétention de la Rubisco à partir de jus végétaux

### 2.2.1 Sélection de la résine

Le critère le plus habituel pour la sélection d'une résine est la sélectivité. Cependant, d'autres critères peuvent jouer un rôle important, voire être déterminants, selon chaque problème spécifique. Dans ce travail, où on est assez loin du cadre habituel d'application de la chromatographie, la sélectivité a été prise en compte, mais d'autres facteurs ont été considérés essentiels. Parmi eux :

- la productivité (capacité, durée des cycles, facteur de concentration) ;
- la facilité de mise en œuvre à l'échelle industrielle, la répétabilité des cycles et la stabilité ;

- la compatibilité avec une utilisation en pré-purification ;
- la compatibilité des matériaux avec des applications agro-alimentaires ;
- le coût.

Ainsi lors de la sélection de la résine certains paramètres, comme le gonflement, sont à minimiser autant que possible, puisqu'ils peuvent induire des difficultés de fonctionnement des colonnes. D'autres, comme les larges pores qui facilitent l'accès aux sites d'échange, sont à favoriser pour réduire les limitations cinétiques de la séparation (NICOLAS-SIMONNOT 1991). Des travaux précédents (KERFAI 2011) avaient montré la sélectivité et la capacité très intéressantes de la résine Q Hyper Z. De plus, sa matrice développée pour un fonctionnement en lit expansé permettait d'envisager le développement industriel en colonne de hauteur suffisante pour assurer une bonne productivité. Bien que le coût très élevé de cette résine, et finalement l'arrêt de sa production, aient empêché son utilisation, sa capacité d'environ 35 g Rubisco/L a été considérée comme une référence dans la suite du travail.

### 2.2.2 Résines présélectionnées

Six résines échangeuses d'anions ont été présélectionnées pour cette étude. Elles sont produites et commercialisées par deux fabricants :

- Pall Corporation : résines Q Ceramic Hyper D et HyperCel Star AX ;
- GE Healthcare Life Science : résines Capto Q, Capto Q ImpRes, Q sepharose FF et ANX sepharose 4FF (High Sub (HS))

Le tableau III.1 présente leurs principales caractéristiques fournies par les fabricants. La résine Q Hyper Z est aussi indiquée, comme référence. Les groupes fonctionnels utilisés sont majoritairement des amines quaternaires, qui confèrent à la résine un caractère acide fort. Par contre, deux résines (l'ANX Sepharose 4FF et HyperCel Start AX) utilisent respectivement des amines tertiaires et primaires, et la disponibilité de leurs sites dépend alors du pH.

En ce qui concerne la taille des particules, deux résines ont des tailles autour ou inférieures à 50  $\mu\text{m}$  (Q Ceramic Hyper D, Capto Q Impres), alors que les autres ont des tailles supérieures, plutôt autour de 90  $\mu\text{m}$ . Pour les premières, des difficultés supplémentaires de mise en œuvre peuvent être pressenties, en considérant notamment la nature des jus végétaux qui seront utilisés dans les étapes de charge (présence éventuelle de particules très fines, viscosité...).

La nature de la matrice permet quant à elle de classer les résines dans trois grands groupes : les matériaux composites (les « Hyper »), les résines à base d'agarose, et celles à base de cellulose. Ces derniers matériaux ont l'avantage d'être naturels et peuvent être plus facilement compatibles avec les procédés agroalimentaires. L'intérêt des matériaux composites est celui d'avoir une structure de grands pores remplis d'un gel conçu pour favoriser la diffusion des protéines (BOSCHETTI 1994 ; JUNGBAUER 2005). Il en résulte des résines de grande capacité et faibles limitations cinétiques (FERNANDEZ et CARTA 1996 ; KERFAI 2011). Enfin l'agarose constitue depuis très longtemps une base pour de très nombreuses résines, dont l'utilisation est très large de par leur caractère hydrophile et inerte, et la facilité pour les fonctionnaliser (BOSCHETTI 1994). Ces résines qui sont toujours largement étudiées (SANAGI et al. 2016 ; NWEKE et al. 2017) trouvent des applications dans la purification des protéines (ZHOU et al.



2004; STONE et al. 2009; SALEHI et PENG 2016), comme dans l'extraction des molécules naturelles des milieux végétaux (XU et al. 2006; DONG et al. 2013; WANG et al. 2013).

Enfin, toutes les résines affichent un large intervalle de pH dans lequel elles peuvent fonctionner. Par contre, comme indiqué précédemment, cette caractéristique est à considérer avec prudence pour les résines anioniques faibles, donc la capacité peut varier fortement avec le pH.

L'analyse des propriétés des différentes résines présélectionnées est synthétisée dans le tableau III.2, en termes de principaux avantages. Leur adaptation à la séparation des protéines est évidemment essentielle, mais pour certaines les gammes de masses molaires des protéines visées sont très élargies par rapport aux utilisations habituelles. Cela montre notamment un intérêt croissant des procédés chromatographiques pour les très grandes protéines, ainsi que l'adaptation progressive des supports.

### **2.2.3 Étude préliminaire en mode batch pour la sélection de la résine**

Les tests en mode batch permettent de faire une estimation rapide de la quantité de Rubisco fixée par unité de volume de chaque résine, dans les conditions de travail. Cela permet de sélectionner rapidement les résines qui sont les plus adaptées pour des expériences plus poussées.

#### **2.2.3.i Matériel et méthodes**

Les résines présélectionnées sont initialement stockées dans les conditionnements commerciaux prévus par leur fabricant, selon notamment le type de matrice. Les résines Q Hyper Z et Q Ceramic Hyper D sont conditionnées en forme de poudre sèche. Les résines de matrice à base d'agarose sont conditionnées en forme de suspension dans une solution de stockage contenant de l'éthanol à 20% (v/v). C'est le cas des résines Capto Q, Capto Q ImpRes, Q Sepharose FF et ANX Sepharose 4FF. Enfin, la résine à base de cellulose, HyperCel Star AX, est stockée dans un mélange d'éthanol 20% (v/v) et de NaCl 1 mol/L.

Pour leur utilisation les résines sont rincées plusieurs fois puis équilibrées avec une solution tampon de phosphate 100 mM à pH 6, pendant au moins une heure. L'équilibration permet d'ioniser les groupes fonctionnels selon la valeur du pH de la solution tampon et plus généralement d'homogénéiser l'état de la résine. Après équilibration, chaque résine est filtrée à l'aide d'un système Büchner avec une membrane de 0,45 µm et une pompe à vide afin d'éliminer le maximum de solution tampon. Un échantillon d'environ 3 g de résine « humide » est alors prélevé afin de déterminer sa masse sèche (% MS); cette valeur sera prise en compte lors du calcul de la masse de résine sèche utilisée dans les tests en batch. Pour les résines Q Hyper Z et Q Ceramic Hyper D la masse sèche est mesurée directement par pesée.

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées avec un jus de luzerne (lot Luzerne\_1) conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ , préalablement décongelé et centrifugé à 6000 rpm et  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 20 min. La concentration de Rubisco est de 0,63 g/L, le pH de 5,9 et la conductivité de

Tableau III.1.1 – Caractéristiques des résines présélectionnées (Sources : Handbook Ion Exchange Chromatography Principles and Methods 11000421, GE HealthCare, LS.; Chromatography media selection guide USD2714, Pall Corporation)

Résine	Ligand	Taille Particule	Type d'échangeur	Matrice	CE (mg/ml) (BSA)	Intervalle de pH de fonctionnement	Limite d'exclusion [Mr] [Globular Proteins]
Q Hyper Z	Amine quaternaire	75µm(40-105)	Anionique Fort	Oxyde Zr/ Polymère d'acrylate	80	4 à 13	N.D
Q Ceramic Hyper D	Amine quaternaire	50µm	Anionique Fort	Oxyde Si/ Polymère d'acrylate	85	2 à 12	N.D
Capto Q	Amine quaternaire	90µm	Anionique Fort	High cross-linked agarose dextran surface extender	>100	2 à 12	N.D
Capto Q Impres ANX	Amine quaternaire	36-44µm (d <sub>50v</sub> )	Anionique Fort	High cross-linked agarose	>95	2 à 12	N.D
Sepharose 4FF	Amine tertiaire (Diethylaminopropyl)	90µm (45-165)	Anionique Faible	Agarose 4% réticulation	5 (Thyroglobuline)	3 à 13	3 x 10 <sup>7</sup>
Q Sepharose FF	Amine quaternaire	91µm (45-165)	Anionique Fort	Agarose 6% réticulation	120 (HSA)	2 à 12	4 x 10 <sup>6</sup>
HyperCel Star AX	Amine primaire	80µm	Anionique Faible	Cellulose rigide	>100	1 à 13	N.D

Tableau III.2 – Récapitulatif des principaux avantages des supports Q Hyper Z, Q ceramic hyper D, HyperCel Star AX, Capto Q, Capto Q ImpRes, Q sepharose FF et ANX sepharose 4FF.

Fabricant	Résine	Avantages
Pall	Q Ceramic Hyper D	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propriétés similaires au Q Hyper Z</li> <li>• Large utilisation pour les bio séparations</li> <li>• Stabilité dimensionnelle</li> <li>• Sites d'échange abondants dans l'hydrogel accessibilité Protéine</li> </ul>
	HyperCel Star AX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Productivité élevée dans la purification des protéines</li> <li>• CE élevée à courts temps de résidence</li> <li>• Tolérance aux sels</li> <li>• Matrice à base de cellulose rigide</li> </ul>
GE	Capto Q	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Purification intermédiaire de protéines</li> <li>• CE élevée</li> <li>• Matrice à base d'agarose réticulée</li> </ul>
	Capto Q ImpRes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Purification d'une haute résolution grâce à une petite taille de particule</li> <li>• Possibilité de travailler à hauts débits</li> <li>• Matrice à base d'agarose réticulée</li> </ul>
	ANX Sepharose 4FF (HS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Porosité importante: Purification de protéines de grande taille (Masse molaire élevée)</li> <li>• Matrice à base d'agarose</li> </ul>
Healthcare	Q Sepharose FF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Large utilisation pour les bio séparations</li> <li>• CE élevée</li> <li>• Matrice à base d'agarose réticulée</li> <li>• Echangeur utilisé dans plusieurs travaux pour la purification de la Rubisco</li> </ul>

13,6 mS/cm.

Pour chaque résine équilibrée, une masse de la résine humide est pesée précisément et mise en suspension avec 20 mL de jus de luzerne. Le flacon est agité dans un agitateur rotatif pendant 4 h, puis sédimenté jusqu'à séparation des phases solides et liquides. La fraction liquide est séparée et analysée par HPLC-SEC pour déterminer leur teneur en Rubisco. La résine est lavée plusieurs fois avec de l'eau ultra-pure, jusqu'à ce que la conductivité de l'eau de lavage soit identique à celle de l'eau pure.

Après lavage la résine est mise en contact avec 10 mL d'une solution de NaCl 1 mol/L. Le flacon est agité pendant 2 h, puis les phases liquide et solide sont séparées. L'« éluat » (fraction liquide) est analysé par HPLC-SEC. Les conditions opératoires des essais en mode de contact batch sont résumées dans le tableau III.3.

Tableau III.3 – Conditions opératoires des essais en mode batch pour les résines étudiées

Résine	Masse résine humide, $m_h$ (g)	Conditions Opératoires Tests en Batch				
		Humidité (% $m_h$ )	Masse résine sèche (g)	Solution Équilibration	Volume Jus (mL)	Volume NaCl 1M (mL)
Q Hyper Z*	-	-	3,710	Tampon 0,1mol/L pH 5,8	20	10
Q Ceramic Hyper D*	-	-	2,629			
HyperCel Star AX	5,095	91,3	0,443			
Capto Q	5,117	81,5	0,946			
Capto Q Impres	5,102	83,8	0,827			
ANX Sepharose 4FF (HS)	5,001	87,8	0,611			
Q Sepharose FF	5,059	87,3	0,642			

\*Ces résines ont des masses volumiques très supérieures, donc un volume équivalent représente une masse environ 3 fois supérieure

### 2.2.3.ii Résultats et discussion

Les résultats expérimentaux sont présentés dans le tableau III.4. Pour chaque résine, la concentration de Rubisco mesurée dans l'éluat et la rétention de Rubisco sont indiquées. La variation de la concentration dans le jus après la charge est indétectable par l'analyse HPLC-SEC et la détermination de la rétention lors de la charge n'a pas pu être évaluée. Bien que par la suite, la rétention sera déterminée comme la masse de Rubisco fixée par unité de volume de lit, cette définition n'est pas aisée à appliquer en batch, car les volumes de résine utilisés ne sont pas correctement mesurables. L'expression de la rétention par unité de masse a été donc préférée ici.

Dans la figure III.2, les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse par HPLC-SEC des éluats sont présentés. On observe notamment le pic de la Rubisco (obtenu pour un volume d'élution de 9,05 mL), et celui d'autres constituants de plus petite taille (volume d'élution

Tableau III.4 – Résultats expérimentaux de rétention de la Rubisco en mode batch sur les résines présélectionnées.

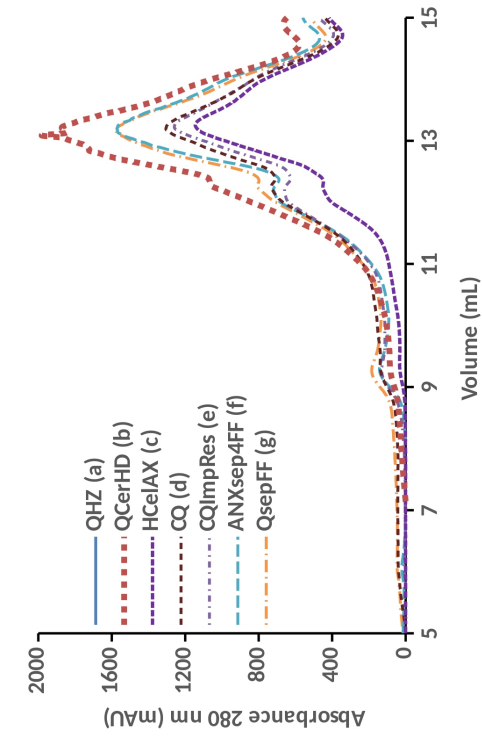
Résine	Concentration Rubisco éluat (g/L)	$M_{\text{Rubisco}}/M_{\text{résine}}$ (g Rub/kg Res sèche)	$S_{\text{Rubisco}}/S_{\text{AC}}$
Q Hyper Z	0,1	0,13	0,001
Q Ceramic Hyper D	0,3	1,33	0,018
HyperCel Star AX	0,2	4,29	0,008
Capto Q	0,5	5,84	0,023
Capto Q Impres	1,2	14,27	0,044
ANX Sepharose 4FF (HS)	1,0	16,20	0,039
Q Sepharose FF	0,7	10,70	0,035

supérieur à 9,05 mL) présents dans l'éluat (cf. paragraphe 5.2 du chapitre II). Dans la figure III.2-A, l'ensemble du chromatogramme est représenté, alors que sur la figure III.2-B un zoom est réalisé sur le pic de la Rubisco.

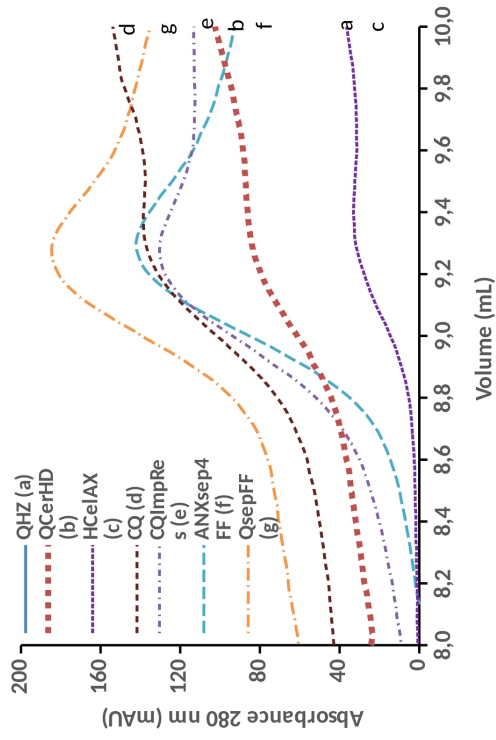
Le fonctionnement en mode batch ne permet pas de déterminer la capacité d'échange des différentes résines, ni apporte beaucoup d'information concernant leur sélectivité par rapport à la Rubisco. En effet, l'élution se faisant durant un seul contact, il n'est pas possible d'espérer une séparation sélective des molécules. On pourrait tout de même observer une variation relative de la taille des pics, qu'il est difficile d'interpréter ici compte tenu de la nature complexe de la solution. De ce fait, le ratio massique relatif entre la Rubisco et les autres constituants présents dans les éluats ne peut pas être correctement déterminé, car il n'est pas possible d'établir une droite d'étalonnage des pics (autres que celui de la Rubisco).

Cependant, une comparaison qualitative des ratios de surfaces de pics entre la Rubisco et les autres constituants des éluats,  $S_{\text{Rubisco}}/S_{\text{AC}}$ , peut être établie à partir des chromatogrammes HPLC-SEC représentés dans la figure III.2, puisque toutes les expériences ont été faites avec le même jus. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau III.4. D'après ce ratio, les résines qui présentent les valeurs de  $S_{\text{Rubisco}}/S_{\text{AC}}$  les plus élevées sont la Capto Q Impres, l'ANX sepharose 4FF et la Q sepharose FF, ce qui permettrait d'affirmer que dans les conditions des expériences, ce sont les résines qui semblent avoir plus d'affinité pour la Rubisco.

De même, il est possible de faire une comparaison des résines vis-à-vis de leur intérêt pour la production de Rubisco : plus le ratio masse de Rubisco/masse de résine est élevé et le pic de la Rubisco résolu, plus la résine serait favorable à la rétention de la protéine. D'après les résultats obtenus, les résines qui se présentent comme les plus favorables pour la rétention de la Rubisco sont la Q sepharose FF, la Capto Q ImpRes et l'ANX sepharose 4FF.



(A) Chromatogramme entier



(B) Pic de la Rubisco

FIGURE III.2 – Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des fractions d'éluion obtenues avec les résines présélectionnées.

## 2.2.4 Expériences en colonne en lit fixe

Afin de déterminer la capacité d'une résine vis-à-vis d'une protéine et leur affinité, il convient d'étudier le système en colonne en lit fixe. Cela permet notamment de prendre en compte les conditions réelles du procédé, dès lors que celui-ci sera mis en œuvre avec ce mode de contact. La réalisation de ces expériences est aussi un premier moyen de valider le protocole expérimental proposé et d'identifier à petite échelle des éventuelles difficultés qui pourraient se présenter liées, par exemple, aux types de solutions traitées (milieux réels) ou aux conditions opératoires. Enfin, un dernier objectif de ces expériences est de se procurer des premiers éléments de réponse nécessaires pour le changement d'échelle du procédé.

Les expériences préliminaires en colonne à l'échelle laboratoire ont été réalisées avec les résines présélectionnées, afin de confirmer et d'approfondir les résultats préliminaires en batch. Cependant, deux résines ont été exclues de ces essais : la Q Hyper Z, pour laquelle de nombreuses données étaient disponibles (KERFAI 2011), et la Capto Q, qui s'est avérée similaire à la Capto Q Impres et moins intéressante.

Chaque expérience réalisée en colonne de lit fixe implique la mise en œuvre successive des différentes étapes du procédé chromatographique. Lors de la charge, la détermination des courbes de percée nécessite la mise en équilibre de la colonne avec la solution d'alimentation. Dans cette étude, nous parlerons de saturation de la résine dès lors que le système atteint l'équilibre pour une concentration d'alimentation  $C_0$  donnée. La résine étant alors équilibrée (saturée) elle ne peut plus échanger, de telle manière que la concentration de protéine dans la solution en sortie de la colonne est aussi  $C_0$ .

### 2.2.4.i Matériel et méthodes

Le dispositif expérimental utilisé à l'échelle laboratoire est schématisé dans la figure III.3. Il est constitué d'une colonne chromatographique de laboratoire (C1) en verre (GE Healthcare), équipée d'un adaptateur qui permet de fixer la hauteur du lit durant l'utilisation de la résine. Cela définit aussi le volume de la résine dans le lit qui est considéré constant durant toute l'expérience. Pour les tests, la colonne sera garnie avec la résine étudiée et alimentée par une pompe péristaltique (P1) à débit contrôlé.

A l'aide de la vanne V1, des solutions d'équilibration (réservoir T), le jus à traiter (réservoir J), l'eau de lavage (réservoir T) et la solution d'élution (réservoir T) sont successivement introduites dans la colonne. La solution en sortie de la colonne est fractionnée (E1) pour analyse ultérieure. Les vannes V2 et V3 permettent d'assurer si besoin l'isolement de la colonne. Un analyseur UV-Vis est placé en sortie de colonne afin de suivre en ligne l'absorbance de la solution. Il s'agit uniquement d'un indicateur global du bon fonctionnement de l'expérience.

Les expériences préliminaires ont été réalisées avec une colonne de type XK 16/20 (pour 16 mm de diamètre interne). La hauteur du lit de résine a toujours été de 10 cm. Le volume de chaque colonne (VC) est donc de 20,1 mL.

Pour chaque résine étudiée, la préparation de la colonne suit un protocole similaire : tout d'abord la résine est rincée plusieurs fois avec la même solution tampon qui sera utilisée pour l'équilibrage, suivant le même protocole que pour les tests en batch. Une fois rincée et filtrée, la résine est introduite dans la colonne où elle est paquée. La masse exacte de résine utilisée est déterminée par différence de masse entre la masse initiale préparée et celle non utilisée à la fin. Une validation du package de la résine est réalisée expérimentalement avec la détermination de la Hauteur Équivalente à un Plateau Théorique (HEPT) et du facteur d'asymétrie. Cet aspect sera développé en détail dans la description du dispositif utilisé à l'échelle pilote (cf. paragraphe 2.3.1 de ce chapitre).

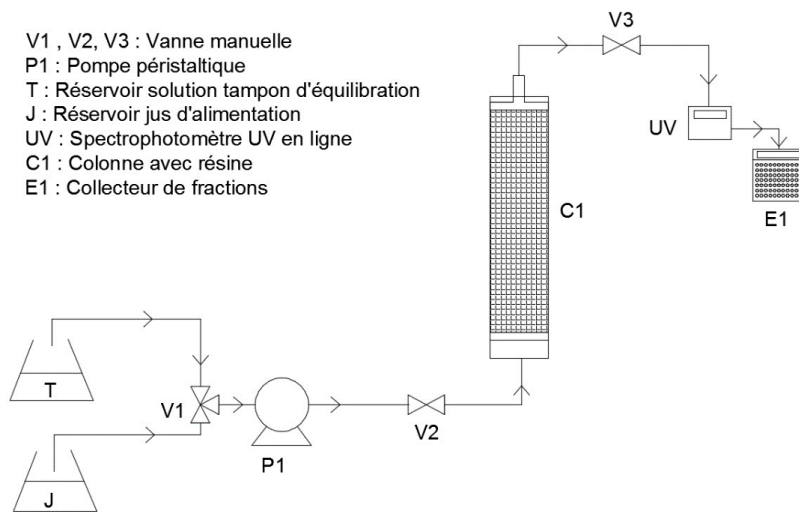


FIGURE III.3 – Schéma de l'équipement utilisé pour l'étude de la récupération de la Rubisco par chromatographie d'échange d'ions en lit fixe à l'échelle laboratoire.

Dans toutes les expériences, quelle que soit la résine utilisée, les conditions suivantes ont été respectées :

**Équilibrage :** La solution utilisée est une solution tampon phosphate à 100 mmol/L ajustée à pH 5,8.

**Charge :** La charge est toujours réalisée avec des jus de luzerne congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , puis décongelés et clarifiés par centrifugation à 6000 rpm et à  $4^{\circ}\text{C}$  durant 20 min. Le jus utilisé peut varier selon l'expérience, notamment en ce qui concerne la concentration de Rubisco. Parfois, il s'est avéré impossible d'avoir un débit d'alimentation stable durant les essais, les colonnes se colmatant partiellement au fur et à mesure de la charge. Ainsi, la valeur de la vitesse superficielle considérée pour chaque expérience correspond à une valeur moyenne, déterminée soit par moyenne des valeurs mesurées lors des expériences, soit à partir du volume total alimenté et de la durée de la charge. Cet aspect sera traité plus en détail lors de la discussion des résultats.



**Lavage :** Dans tous les tests après la charge, les colonnes sont lavées à l'eau ultra-pure, jusqu'à ce que l'absorbance à la sortie de la colonne soit proche de zéro et stable. Une analyse par HPLC-SEC de la sortie de la colonne permet de confirmer que le lit de résine a été correctement lavé.

**Élution :** Une solution de chlorure de sodium de concentration de 0,5 mol/L a été utilisée. Cette solution permet d'éluer la totalité de la Rubisco fixée. Comme pour la charge, la stabilisation des débits durant l'élution s'est avérée difficile. Ainsi, les vitesses superficielles employées lors des tests varient entre 0,5 et 1,3 cm/min. En effet, malgré le lavage de la colonne, le colmatage du lit mais aussi le gonflement de la résine (variable selon chaque résine), sont à l'origine de ces variations. De ce fait, les débits sont des valeurs moyennes de celles instantanées et mesurées tout au long de l'expérience.

**Nettoyage :** Des solutions de chlorure de sodium de concentration de 1 et 2 mol/L, d'hydroxyde de sodium à 1 mol/L, d'acide acétique à 1 mol/L et d'éthanol à 70% (v/v), sont utilisées de manière successive à la fin de chaque cycle d'utilisation de la résine. Un volume équivalent à un volume de colonne est alimenté pour chaque solution à un débit très faible (inférieur à celui utilisé pour l'élution) afin de favoriser les temps de contact avec la résine. Après passage de chaque solution un rinçage de 2 volumes de colonne à l'eau ultra pure est effectué. Cette méthode de nettoyage a été adaptée afin de garantir l'élution totale de tous les composés retenus sur la résine, qui reste à optimiser afin de limiter l'utilisation de solutions et de réduire le temps de l'étape.

En complément, le tableau III.5 synthétise les conditions opératoires utilisées pour la charge et l'élution et qui n'ont pas pu être identiques dans toutes les expériences. Tout comme pour les essais en batch, l'alimentation utilisée pour ces tests est le jus lot Luzerne\_1 conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Avant utilisation le jus est décongelé et centrifugé à 6000 rpm et à  $4^{\circ}\text{C}$  durant 20 min afin de produire un jus clarifié à pH  $6.0 \pm 0,2$ .

#### 2.2.4.ii Résultats et discussion

La figure III.4 montre les courbes de percée obtenues lors de la charge, c'est-à-dire l'évolution de la concentration de Rubisco en sortie de colonne (exprimée par rapport à la concentration d'alimentation), en fonction du volume de solution alimenté (exprimé en nombre de volumes de lit passés,  $V/VC$ ). L'expérience avec la résine Q Ceramic Hyper D n'a pas permis de fixer la Rubisco dans la colonne dans les conditions de travail (résultats non indiqués sur la figure). Pour cette résine, une expérience spécifique dans des conditions de pH différentes a été réalisée postérieurement, montrant des résultats de charge très différents (résultats non présentés).

Dans cette présentation des résultats, la normalisation des variables est souvent utilisée et a pour but de faciliter la comparaison des expériences différentes. En général, le volume de solution alimenté durant la charge est normé par le volume poreux du lit,  $V_p$ , ce qui revient

Tableau III.5 – Résumé des conditions opératoires durant l'équilibration, la charge et l'élution des expériences en colonne à l'échelle laboratoire pour les résines étudiées.

		Résine étudiée					
		Q Ceramic Hyper D	HyperCel Star AX	Capto Q Impres	ANX Sephacrose 4FF (HS)	Q Sepharose FF	
Volume colonne (mL)		20,1					
Équilibration	Solution Alimentée	Tampon phosphate 100 mmol/L pH 5,8					
	Vitesse superficielle (cm/min)	2,5					
Charge	Jus centrifugé	$C_0$ Rubisco (g/L)	5,3	4,3	2,7	4,6	4,2
		pH	6,1	6,1	6,0	5,8	6,0
		Conductivité (mS/cm)	15,2	17,0	16,9	16,4	16,8
	Volume jus alimenté (mL)	220	193	250	250	220	
	Vitesse superficielle (cm/min)	2,0	2,2	1,0	2,5	2,5	
Élution	Solution Alimentée	Chlorure de sodium 0,5 mol/L pH 6.3					
	Vitesse superficielle (cm/min)	1,2	1,0	0,8	0,5	1,3	

à indiquer le nombre de fois que le fluide dans la colonne est renouvelé ( $V/V_p$ ). Cependant, puisque l'objectif ici est de comparer des expériences réalisées avec des résines constituées de matrices très variées, la normalisation par le volume du lit (VC) a été préférée. Cette variable est parfois utilisée dans les travaux qui portent sur les résines constituées de matrices à base de polysaccharides, type gel et fortement poreuses, comme l'HyperCel Star AX (ANGELO et al. 2013).

L'ensemble des courbes de percée représentées dans la figure III.4 montre que dans les conditions de travail, les différents systèmes atteignent l'équilibre puisque la concentration de la protéine en sortie de la colonne est sensiblement égale à celle d'entrée. Les courbes sont relativement symétriques et montrent des largeurs réduites de la zone influencée par la limitation par les transferts. Par contre, l'équilibre est atteint assez rapidement, au mieux lors du passage de 2 volumes de colonne.

Les courbes d'élution associées à chaque expérience sont présentées dans la figure III.5 qui montre la concentration en Rubisco de la solution en sortie de la colonne en fonction du volume de la solution d'élution passée, pour chaque résine étudiée.

Il est important de préciser que ces courbes ne représentent que la concentration en Rubisco, alors que les solutions d'éluat contiennent encore d'autres constituants en concentration variable, comme cela sera indiqué par la suite.

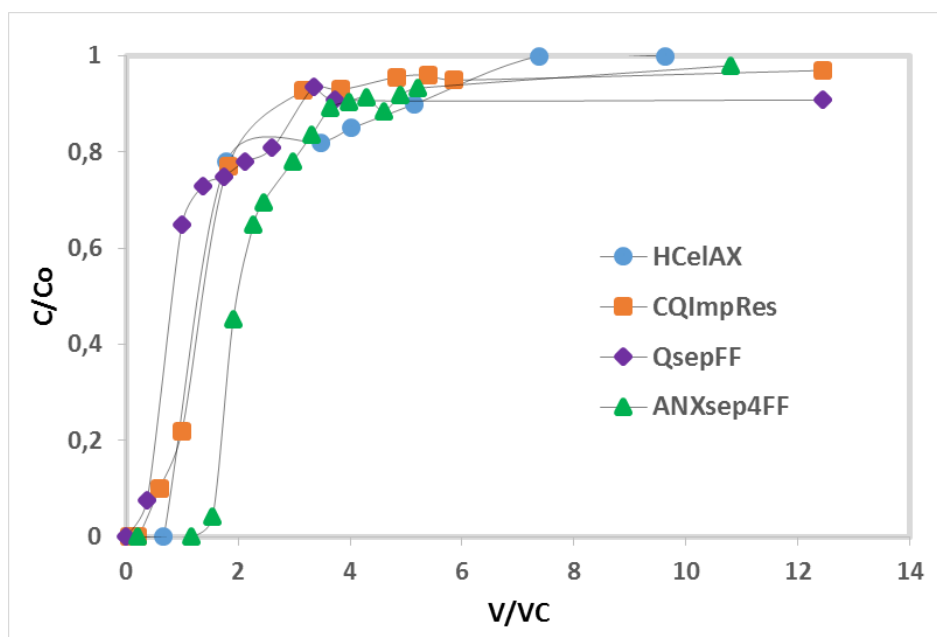


FIGURE III.4 – Courbes de percées de la Rubisco déterminées expérimentalement dans des colonnes à l'échelle laboratoire avec les résines Hyper-Cel Star AX (HCelAX), Capto Q ImpRes (CQImpRes), Q sepharose FF (QsepFF) et ANX Sepharose 4FF (ANXsep4FF).

A partir des courbes d'élution, des indications sur l'affinité de la protéine par les résines peuvent être obtenues. Les courbes d'élution permettent aussi de déterminer le temps de rétention  $t_R$  associé à la Rubisco pour chacune des résines.

De plus, les courbes d'élution montrent les valeurs de concentrations maximales de Rubisco obtenues et permettent ainsi d'estimer si un facteur de concentration élevé peut être obtenu.

Les courbes de percée représentées dans la figure III.4 et celles d'élution de la figure III.5 permettent de déterminer la masse totale de Rubisco qu'il est possible de fixer pour chaque résine : l'aire entre la droite horizontale  $C/C_0 = 1$  et la courbe de percée, corrigée par  $C_0$  et  $VC$ , représente la masse de Rubisco chargée ; l'aire sous la courbe d'élution représente la masse de Rubisco éluee. L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau III.6.

Théoriquement, lors de l'élution, toute la masse de Rubisco fixée dans la colonne doit être récupérée. Cependant, en fonction des conditions de travail, un rendement d'élution peut être déterminé qui représente le fait que la récupération de la protéine chargée s'est faite efficacement. En effet, une analyse de la forme et de la symétrie du pic d'élution permet d'estimer la difficulté de récupérer la totalité de la protéine fixée. Par exemple, une forme asymétrique de la courbe d'élution de la résine Q Sepharose FF indique qu'une fraction de la Rubisco fixée est retenue plus longtemps. Cette masse est plus difficile à récupérer ce qui rend plus difficile sa quantification. De fait, ce sont essentiellement des difficultés hydrodynamiques ou cinétiques qui peuvent conduire à ce type de résultats.

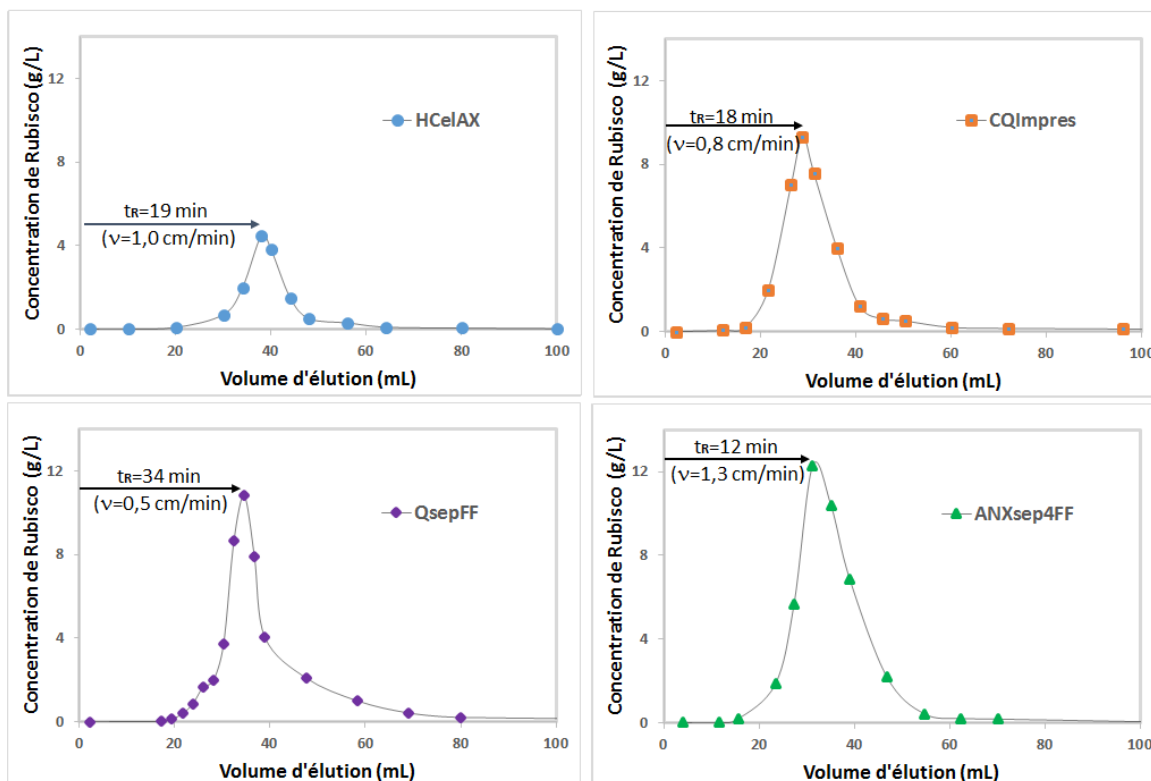


FIGURE III.5 – Courbes d'éluion : concentration en Rubisco des éluats (g/L) en fonction du volume d'éluant passé (mL), sur les supports HyperCel Star AX (HCelAX), Capto Q ImpRes (CQImpRes), Q sepharose FF (QsepFF) et ANX sepharose 4FF (ANXsep4FF) en colonne à échelle laboratoire.

Tableau III.6 – Résultats expérimentaux obtenus pour la rétention de Rubisco lors des expériences préliminaires en colonne en lit fixe avec les résines HyperCel Star AX, Capto Q ImpRes, Q Sepharose FF et ANX Sepharose 4FF.

		Résine étudiée			
		HyperCel Star AX	Capto Q Impres	Q Sepharose FF	ANX Sepharose 4FF
Charge	Masse alimentée (g)	0,83	0,67	1,15	0,92
	Masse fixée (g)	0,08	0,12	0,15	0,16
Éluion	Masse éluée (g)	0,05	0,12	0,14	0,16
	Facteur concentration maximale	1,04	3,42	2,34	2,90
Rendement élution (%)		62	100	93	100
$M_{\text{Rubisco}} / V_{\text{lit}}$ (g/L)		4,0	6,0	7,5	8,0

Le rendement d'élution de la résine HyperCel Star AX paraît assez faible. Cette résine, assez étudiée dans la littérature (ANGELO et al. 2013; ANGELO et al. 2016; CHAMPAGNE et al. 2013b) est considérée comme une résine « salt tolérant », c'est-à-dire adaptée à un fonctionnement dans des solutions très salines. En effet, elle est fortement conseillée pour la purification de protéines présentes dans des milieux de conductivité élevée (jusqu'à 20 mS/cm) et pour des valeurs de pH entre 7,5 et 8 (*Contaminant Removal by Anion Exchange on Salt Tolerant HyperCel™ STAR AX Sorbent Prior to Downstream Purification of Recombinant Interleukin 7* 2011). Ainsi, compte tenu de la concentration en NaCl utilisée pour l'élution, il est probable que sous les conditions de force ionique et de pH appliquées pour l'élution, la totalité de la protéine n'ait pas été élue. CHAMPAGNE et al. (2013a) ont comparé la sélectivité de la HyperCel Star AX à d'autres résines échangeuses d'anions et ont montré que pour l'élution de protéines telles que la BSA et la transferrine, cette résine nécessite des concentrations en sel très élevées pour atteindre des conductivités de 18 et 37 mS/cm respectivement.

Les résultats obtenus de capacité de rétention de Rubisco par unité de volume ( $M_{Rubisco}/V_{lit}$ ) confirment les résultats préliminaires obtenus en batch en ce qui concerne les résines qui montrent une plus grande capacité dans les conditions de travail définies. Il s'agit des résines ANX Sepharose 4FF, Q Sepharose FF et Capto Q ImpRes.

La résine Capto Q Impres est celle qui présente le facteur de concentration le plus élevé, malgré une capacité de rétention légèrement plus faible. Par contre, elle est caractérisée par une taille de particule très petite (36-44  $\mu\text{m}$ ) car elle a été conçue pour le traitement de milieux pré-purifiés. En conséquence, des pertes de charge assez importantes ont été observées dans la colonne durant les expériences, qui se sont traduites par une forte opposition à l'écoulement et donc des faibles débits d'alimentation du jus. De ce fait, cette résine semble peu adaptée au traitement de milieux complexes et chargés comme c'est le cas des jus végétaux.

Les résines ANX Sepharose 4FF et Q Sepharose FF sont celles qui ont conduit aux valeurs de capacité de rétention les plus élevées, l'ANX Sepharose conduisant par ailleurs à un facteur de concentration supérieur.

Outre la confirmation de résultats permettant de sélectionner la résine, ces expériences préliminaires montrent que le procédé de chromatographie d'échange d'ions peut être mis en œuvre en lit fixe pour la séparation de la Rubisco à l'échelle laboratoire dans une colonne de 16 mm de diamètre interne. La charge peut être effectuée à partir du jus de luzerne décongelé et centrifugé. Les conditions d'élution appliquées (NaCl à 0,5 mol/L, pH 6,3) ont permis d'obtenir des fractions où la Rubisco est jusqu'à 3,5 fois plus concentrée que dans le jus initial pour les résines Capto Q ImpRes, Q Sepharose FF et ANX Sepharose 4FF.

### 2.2.5 Présentation de la résine retenue

L'ANX Sepharose 4FF (HS) est la résine finalement retenue pour les tests de validation. En effet, les résultats des expériences préliminaires indiquent que l'on peut obtenir des valeurs de capacité de rétention et de facteur de concentration intéressantes avec cette résine. Ces

valeurs sont très proches, voire supérieures à celles obtenues pour la résine Q sepharose FF qui est le support couramment utilisé dans la littérature pour la purification de la Rubisco (BOTA et al. 2002 ; GALMÉS et al. 2005 ; SUAREZ et al. 2011 ; MARTIN et al. 2014). D'autres facteurs ont permis de conforter ce choix.

Tout d'abord sa teneur plus faible en agent de réticulation (4% contre 6% pour la Q Sepharose par exemple) lui donne une porosité plus importante (AMERSHAM 2000) ce qui la rend plus adaptée pour la purification de protéines de haute masse moléculaire comme c'est le cas de la Rubisco. En effet, une étude réalisée sur la caractérisation de cette résine et sa capacité de rétention sur des protéines de différentes tailles (LAGERLUND et al. 1998), souligne une sélectivité et une capacité dynamique plus importantes pour des molécules de masse moléculaire élevée comme la thyroglobuline. Ces auteurs indiquent aussi que cette résine est très stable et qu'elle se conserve sur une longue période. Elle résiste notamment bien aux milieux basiques ce qui est un point important pour le nettoyage du lit de résine. De plus, elle peut être pacquée dans des colonnes à grande échelle et utilisée avec des débits importants même avec une hauteur de lit assez élevée.

De plus, c'est une résine de type base faible qui permet de s'adapter aux conditions de pH spécifiques des milieux, comme dans notre cas. L'ionisation de la résine en fonction du pH est étudiée via un dosage acidobasique (figure III.6 extrait de LAGERLUND et al. 1998). Pour ce dosage, de la résine sous forme base libre est placée dans une solution de chlorure de potassium à 1 mol/L et le pH est ajusté à 3 avec une solution d'acide chlorhydrique ce qui permet de mettre la résine sous la forme ammonium ( $\text{NH}^+$ ). La résine est ensuite dosée avec de la soude à 0,1 mol/L. Pour l'essai « blank titration » il n'y a pas de résine et on observe donc un seul saut de pH correspondant au dosage de l'acide chlorhydrique par la soude. En présence de résine il y a deux sauts de pH : le premier correspond au dosage de l'acide chlorhydrique excédentaire et le deuxième au dosage de la résine qui est sous la forme ammonium. Le pH à la deuxième équivalence est voisin de 10 et celui à la demi équivalence est voisin de 9 ce qui est en accord avec le dosage des fonctions ammonium. En se plaçant à la demi-équivalence du deuxième dosage les auteurs ont pu évaluer, de manière imprécise compte tenu de l'allure de la courbe, le pKa autour de 9. Ainsi, pour un pH supérieur à 10 la résine est essentiellement sous la forme N (base libre) alors que pour un pH inférieur à 8 elle est essentiellement sous la forme ammonium  $\text{NH}^+$ . La différence entre les deux volumes équivalents est environ deux fois plus grande pour l'ANX Sepharose HS (high sub) que pour l'ANX sepharose LS (low sub) ce qui est cohérent car la capacité d'échange est environ deux fois plus forte pour la HS.

### 2.3 Expériences de changement d'échelle

Après sélection de la résine, des expériences visant à étudier le changement d'échelle ont été réalisées. Elles ont été toutes réalisées avec la résine ANX Shepharose 4FF (HS). Au total, treize essais ont été réalisés tous avec du jus de luzerne, frais, congelé/décongelé ou atomisé, dont huit à l'échelle laboratoire et cinq à l'échelle pilote. Comme on le verra par la suite, huit expériences ont été retenues pour être exploitées, car des difficultés diverses ont empêché une

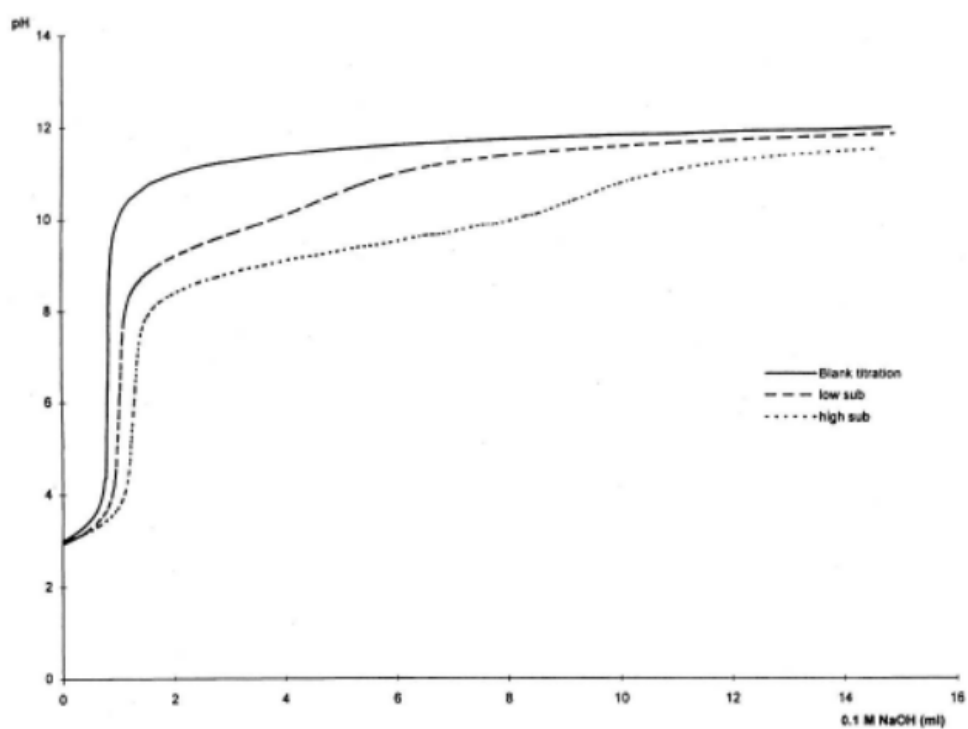


Fig. 1. ANX Sepharose 4 Fast Flow (low sub) and (high sub) in 1 M KCl titrated from pH 3 to 12 with 0.1 M NaOH.

FIGURE III.6 – Courbe de titration de la résine ANX sepharose 4FF (HS) de pH 3 à 12, avec une solution de 0,1 mol/L de NaOH ; Source LAGERLUND et al. 1998

exploitation approfondie des cinq autres. Néanmoins, ces expériences non présentées ont été parfois importantes dans le cadre du travail puisqu'elles ont régulièrement permis d'identifier des difficultés pratiques d'opération à corriger.

Pour l'étude à l'échelle du laboratoire, deux colonnes ont été utilisées : la XK 16/20, déjà utilisée dans les expériences préliminaires, et la XK 50/20, colonne tout à fait similaire à la première mais avec un diamètre interne de 50 mm. L'ensemble du dispositif expérimental décrit lors des expériences préliminaires (cf. paragraphe 2.2.3 de ce chapitre) a été utilisé pour toutes les expériences à cette échelle. Il ne sera pas davantage décrit. La hauteur des lits de résine utilisés a toujours été de 10 cm.

Les tests à l'échelle pilote se sont déroulés dans un équipement développé spécifiquement, répondant aux mêmes principes généraux, mais permettant une plus grande souplesse de fonctionnement et une métrologie plus complète. Le diamètre interne de la colonne a été de 14 cm, ce qui à la hauteur de lit utilisée comme référence (10 cm), représente un volume de résine d'environ 1,5 L. Ainsi, la réalisation des expériences à l'échelle pilote a été nettement complexifiée par le besoin de traiter des volumes importants de jus, entre 10 et 30 L selon les expériences.

Enfin, quelle que soit l'échelle de l'expérience, un échantillonnage assez fin a été réalisé avec l'objectif d'effectuer un suivi relativement précis de la protéine. Chaque expérience a ainsi fourni des dizaines d'échantillons et amené un travail analytique substantiel.

Dans ce chapitre, l'équipement développé pour les expériences à l'échelle pilote sera d'abord présenté et caractérisé. Puis les huit expériences réalisées (et exploitées) seront présentées et les résultats obtenus analysés et discutés.

### 2.3.1 Échelle Pilote

La figure III.7 montre le schéma de l'équipement pilote développé, construit et utilisé dans ce travail. Conceptuellement similaire à l'équipement du laboratoire, les différences principales à signaler sont :

- le type de colonne RESOLUTE FM 140 (pour 140 mm de diamètre interne) de Pall, dont le système de package et le fonctionnement sont assez spécifiques pour faciliter le travail de préparation ;
- la capacité de la colonne, au moins dix fois supérieure à celle des colonnes de laboratoire XK 50/20 ;
- un système de vannes et dérivations qui permettent de modifier facilement les circulations des solutions dans l'installation (plusieurs trajets d'alimentation de la colonne, protection des équipements, purges, etc.) ;
- la métrologie en ligne, qui permet de suivre et d'enregistrer en ligne à l'entrée et à la sortie de la colonne : la pression, le pH, la conductivité et la température, quel que soit le sens d'alimentation ;
- la possibilité de mesurer et d'enregistrer le débit en ligne en sortie ou à l'entrée de la colonne ;



- trois pompes différentes permettent d'assurer les débits d'alimentation des solutions d'équilibration ou de lavage (pompe péristaltique), du jus (pompe à membrane) et de la solution d'élution (pompe péristaltique 2).

Pour la préparation du lit de résine à cette échelle, les instructions du fabricant ont été suivies (AMERSHAM 2000). Le tableau III.7 résume les principales informations caractérisant le lit constitué.

Tableau III.7 – Principales caractéristiques du lit fixe, conditions opératoires et paramètres du système étudié.

Variables opératoires	Paramètres du système
Hauteur du lit $H = 0,106$ m	Diamètre interne de colonne $D = 0,14$ m
Masse de résine humide introduite $M = 2,04$ kg	Section interne de colonne $S = 0,0154$ m <sup>2</sup>
Masse sèche de résine introduite $M_s = 0,290$ kg	Taille moyenne de particule $d_p = 9 \times 10^{-5}$ m
Facteur de compression $C = 1,20$	Volume mort à l'entrée $V_{Me} = 0,275$ L
Volume de lit $V = 1,63$ L	Masse volumique résine humide $\rho = 1,004$ kg.L <sup>-1</sup>

Une fois le package réalisé, il a été caractérisé par traçage chimique avec deux perturbations, une impulsion et un échelon négatif de concentration. Le tableau III.8 résume les conditions opératoires utilisées pour ces essais. La perturbation impulsion a permis la détermination de la HEPT (équation III.1), ou du ratio HEPT/ $d_p$ , et le facteur d'asymétrie ( $As$ ) (équation III.2), couramment utilisés pour la validation de packages. Puis, l'analyse de la perturbation échelon par la détermination de la fonction de Distribution de temps de séjour (DTS) a permis de caractériser plus globalement l'écoulement dans la colonne.

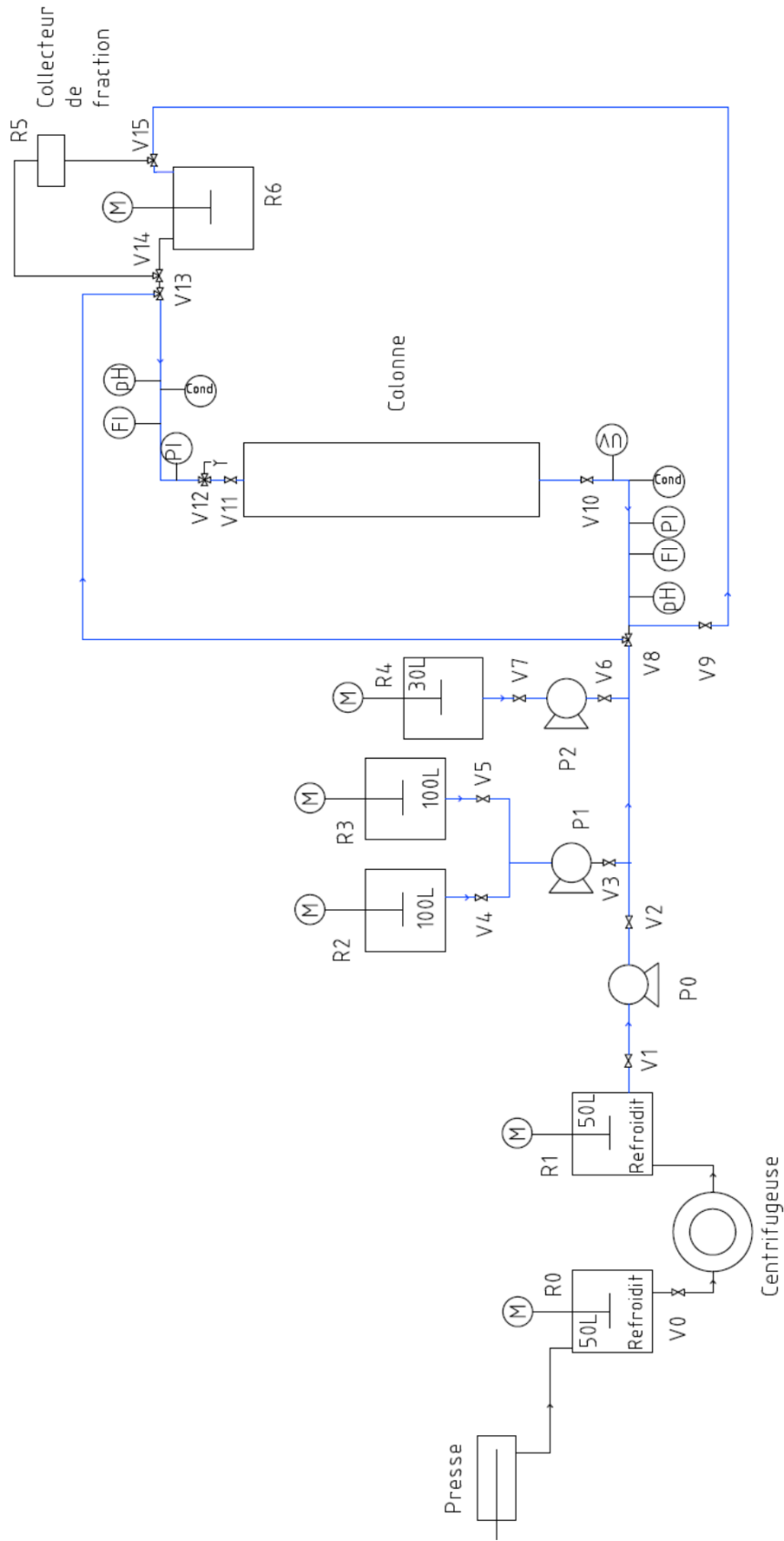
Tableau III.8 – Conditions opératoires utilisées dans les expériences de traçage

Expérience 1	Expérience 2
Perturbation impulsion	Perturbation échelon négatif de concentration
Solution NaCl 2 mol/L	Solution eau déminéralisée
Débit $Q = 11,2$ L · h <sup>-1</sup> = $3,14 \times 10^{-6}$ m <sup>3</sup> · s <sup>-1</sup>	Débit $Q = 12,8$ L · h <sup>-1</sup> = $3,56 \times 10^{-6}$ m <sup>3</sup> · s <sup>-1</sup>
Vitesse superficielle $u = Q/S = 2,04 \times 10^{-4}$ m · s <sup>-1</sup>	Vitesse superficielle $u = Q/S = 2,31 \times 10^{-4}$ m · s <sup>-1</sup>

### 2.3.1.i HEPT et facteur d'asymétrie

Le concept de HEPT est classiquement utilisé en génie chimique pour analyser l'efficacité d'un équipement. Pour une colonne d'une hauteur donnée, un plus grand nombre de plateaux théoriques implique des bandes plus étroites des pics chromatographiques, et donc une meilleure résolution. Par ailleurs, puisque idéalement la largeur des pics chromatographiques est due au phénomène aléatoire de diffusion des molécules, ceux-ci devraient suivre une forme gaussienne et donc être symétriques.

$$HEPT = \frac{L}{N} \quad \text{avec} \quad N = 5.54 \times \left( \frac{V_e}{Wh} \right)^2 \quad (\text{III.1})$$



- pH : Mesure du pH en ligne  
 Cond : Mesure de la conductivité en ligne  
 UV : Mesure UV en ligne  
 FI : Mesure du débit  
 PI : Mesure de la pression
- P0, P1, P2 : Pompes  
 R0, R1, R2, R3, R4, R5, R6 : Réservoirs  
 V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13, V14, V15 : Vannes

FIGURE III.7 – Schéma de l'installation pilote de chromatographie d'échange d'ions

Avec  $L$  : hauteur du lit

$N$  : nombre de plateaux théoriques

$V_e$  : volume d'éluion sur le chromatogramme (cm)

$Wh$  : largeur du pic à sa mi-hauteur (exprimée dans les mêmes unités que  $V_e$ )

$$As = \frac{b}{a} \quad (\text{III.2})$$

Avec  $a$  : largeur de la première moitié du pic à 10% de la hauteur du pic

$b$  : largeur de la deuxième moitié du pic à 10% de la hauteur du pic

La détermination de ces deux paramètres a été faite par injection d'une solution de NaCl 2 mol/L en forme d'une impulsion de volume égale à 1% du volume de colonne VC avec un suivi en sortie de la colonne par mesure de la conductivité. Dans la figure III.8, le pic obtenu est représenté en fonction du temps et les valeurs déterminées sont indiquées dans le tableau III.9.

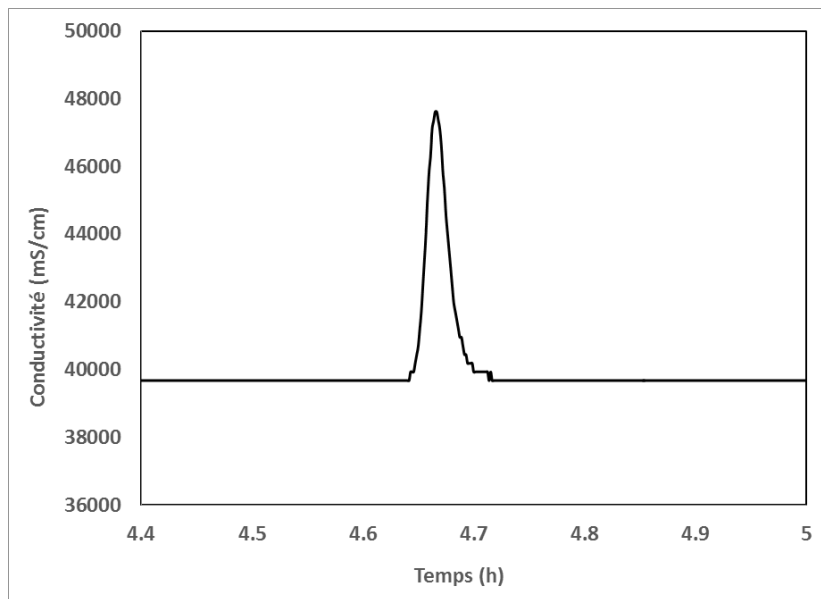


FIGURE III.8 – Évolution de la conductivité en sortie de la colonne Resolute FM 140 en réponse à une perturbation impulsion de NaCl 2 mol/L.

D'après le fabricant de la résine ANX Sepharose 4FF (HS), des valeurs de  $HEPT/d_p$  inférieures à 3 et de  $As$  entre 0,8 et 1,5 sont acceptables (AMERSHAM 2000).

Tableau III.9 – Résultats expérimentaux et calculs de détermination de HEPT/ $d_p$  et  $A_s$

Calcul de HEPT/d	Calcul du facteur d'asymétrie
$V_e = 7,75$ cm	$a=0,5$ cm
$W_h = 0,65$ cm	$b=0,7$ cm
$N = 787,57$	<b><math>A_s = 1,4</math></b>
HEPT = 0,013	
<b>HEPT/d = 1,5</b>	

### 2.3.1.ii Distribution de temps de séjour

La détermination de la DTS permet de caractériser macroscopiquement les écoulements dans un système ouvert. La méthode, basée sur un traçage des écoulements permettant d'identifier le temps réellement passé par un élément de volume de fluide dans la colonne, permet d'identifier des défauts de fonctionnement (courts-circuits ou zones mortes), mais aussi de caractériser de manière globale le degré de mélange axial du fluide dans le système. Ainsi, cette approche systémique a été largement utilisée dans les procédés en lit fixe pour estimer notamment la dispersion axiale, et donc l'impact de l'écoulement sur la séparation.

Les résultats de deux expériences de traçage réalisées, ont été traités afin d'extraire la courbe  $E(t)$  ou courbe de distribution des temps de séjour (VILLERMAUX 1982). Pour la perturbation impulsion, la courbe de sortie donne directement la courbe  $E(t)$  qu'il faut néanmoins adimensionner. Pour la perturbation échelon, la courbe des résultats correspond à la courbe  $F(t)$  de la DTS, et doit être dérivée numériquement afin d'obtenir la courbe  $E(t)$ . Enfin, les courbes  $E(t)$  ont été traitées par le modèle des mélangeurs en cascade afin de déterminer le nombre de mélangeurs qui est un bon indicateur de la dispersion axiale.

Les figures III.9-A et III.9-B montrent respectivement les courbes  $F(t)$  et  $E(t)$  obtenues pour l'expérience 2. La courbe de la perturbation (■) et la courbe réponse (●), représentent respectivement la conductivité en entrée et en sortie de la colonne. Dans les courbes réponses, les axes de temps ont été définis par rapport au moment où la perturbation est introduite dans le système.

A partir de ces données, les moments de la DTS, temps de séjour moyen (équation III.3) et variance (équation III.4) ont été déterminés :

Temps de séjour moyen :

$$\bar{t}_s = \frac{\int_0^{\infty} tE(t) dt}{\int_0^{\infty} E(t) dt} = \int_0^{\infty} tE(t) dt \quad (\text{III.3})$$

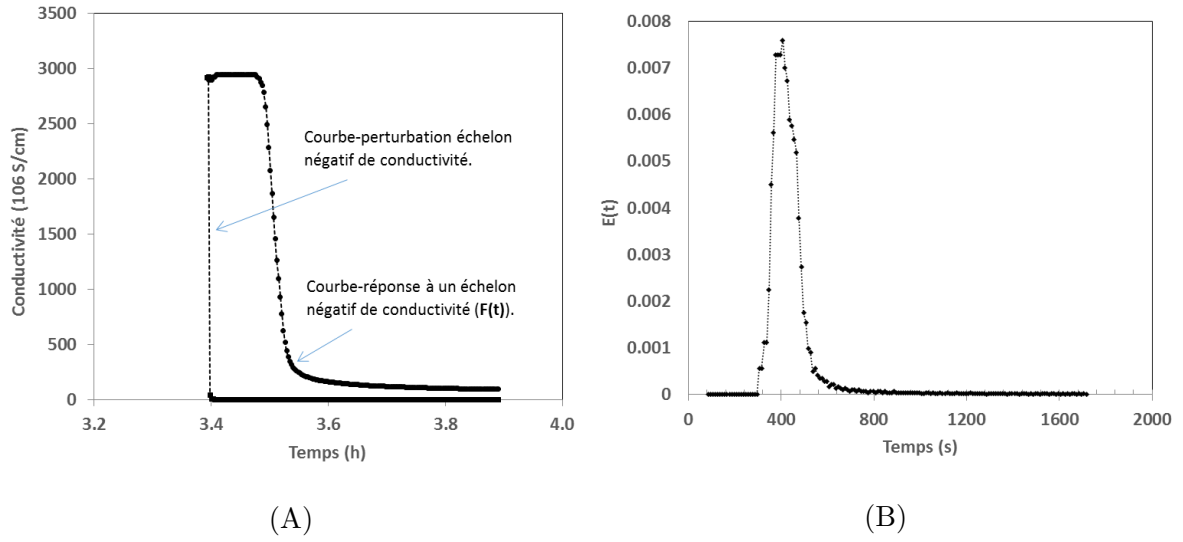


FIGURE III.9 – Courbes perturbation de la DTS obtenues à partir de l'expérience 2

Variance :

$$\sigma_t^2 = \frac{\int_0^\infty (t - \bar{t}_s)^2 E(t) dt}{\int_0^\infty E(t) dt} = \int_0^\infty t^2 E(t) dt - \bar{t}_s^2 \quad (\text{III.4})$$

Pour les expériences traitées ici, les valeurs moyennes du temps de séjour moyen ( $\bar{t}_s$ ) et de la variance ( $\sigma_t^2$ ) déterminées pour la colonne sont :

$$\bar{t}_s = 367 \text{ s} \quad \sigma_t^2 = 2854 \text{ s}^2$$

Dans un système comme la colonne chromatographique, fermé-fermé à la dispersion (la mesure des signaux s'effectue en amont et en aval du système), le temps de séjour moyen doit correspondre au temps de passage. C'est donc une manière précise de déterminer la porosité du système (III.5).

$$\tau = \frac{\varepsilon V}{Q} = \bar{t}_s \quad \varepsilon = \bar{t}_s \frac{Q}{V} \quad (\text{III.5})$$

Dans le système étudié, le calcul de la porosité conduit à une valeur de 0,8. Cette valeur est beaucoup plus élevée que celle déterminée habituellement dans les lits de particules et doit être considérée avec précaution. Elle est cependant cohérente avec celle déterminée par ANGELO et al. (2013) dans la caractérisation des lits de résine en matériau cellulosique, déterminée comme la somme des porosités inter et intra particulaire. Cette dernière en particulier semble (compte tenu de la structure de la résine, plutôt gel) totalement accessible au traceur, de sorte que l'analyse par DTS n'est pas capable de discerner les deux types de porosité. Cela

semble cohérent et peut être expliqué par la masse si faible que représente la matière sèche dans le lit.

Malheureusement, l'étude de DTS n'a pas été effectuée avec une molécule de grande taille, ce qui aurait permis de mieux caractériser la porosité externe du lit, plus représentative par ailleurs des conditions subies par la protéine.

Enfin, le modèle de mélangeurs en cascade, dont le seul paramètre est le nombre des mélangeurs de même volume en série ( $J$ ) a été utilisé pour quantifier le comportement hydrodynamique du lit. L'équation de la DTS correspondant au modèle (équation III.6) et le paramètre associé  $J$  sont :

$$E(t) = \frac{J^J}{(J-1)!} \Theta^{J-1} e^{-J\Theta} \frac{1}{\tau} \quad (\text{III.6})$$

$$\begin{aligned} \text{Avec } J = \frac{1}{\sigma^2} & : \text{ nombre de mélangeurs en cascade} \\ \Theta = \frac{t}{\tau} & : \text{ temps réduit ou adimensionnel} \end{aligned}$$

Par application du modèle aux résultats expérimentaux indiqués, le nombre de mélangeurs en série déterminés est de 47. L'optimisation des résultats montre des résultats très similaires pour des valeurs de  $J$  entre 47 et 50. La dispersion dans la colonne peut donc être considérée faible, l'écoulement à travers le lit pouvant s'assimiler à un écoulement piston. La figure III.10 montre les courbes de DTS expérimentales et théoriques pour les deux expériences de traçage. Ces résultats permettent donc de valider la méthode de package et plus globalement l'équipement, qui ne devrait pas altérer autrement les résultats de la séparation chromatographique.

### 2.3.2 Conditions opératoires des expériences de changement d'échelle

Les dimensions de trois lits fixes utilisés dans les études de changement d'échelle sont présentées dans le tableau III.10. La méthode utilisée pour le package est la même dans tous les cas. La notation associée aux essais correspond au numéro de l'essai et au type de colonne utilisée. Ainsi les essais à échelle laboratoire sont identifiés comme X\_16 pour les expériences réalisées dans la colonne de 16 mm de diamètre interne et X\_50 pour celles réalisées dans la colonne de 50 mm. Les expériences à l'échelle pilote dont la colonne avait un diamètre interne de 140 mm de diamètre sont identifiées par X\_140. Dans le tableau III.11, les conditions spécifiques d'équilibration, de charge et d'élution appliquées dans ces huit tests sont présentées. Dans toutes les expériences, la charge a été réalisée en mode ascensionnel, avec un lavage en fin de la charge en flux descendant, pour favoriser notamment le nettoyage des filtres, puis d'une élution en descendant avec une solution de NaCl 0,5 mol/L.

Pour l'étape d'équilibration de la résine, deux pH différents ont été évalués, 6 et 7,5. Compte tenu du caractère acido-basique de la résine, cela aura un impact non négligeable sur l'ionisation initiale des groupements fixes. Le pH a été choisi pour assurer une équilibra-

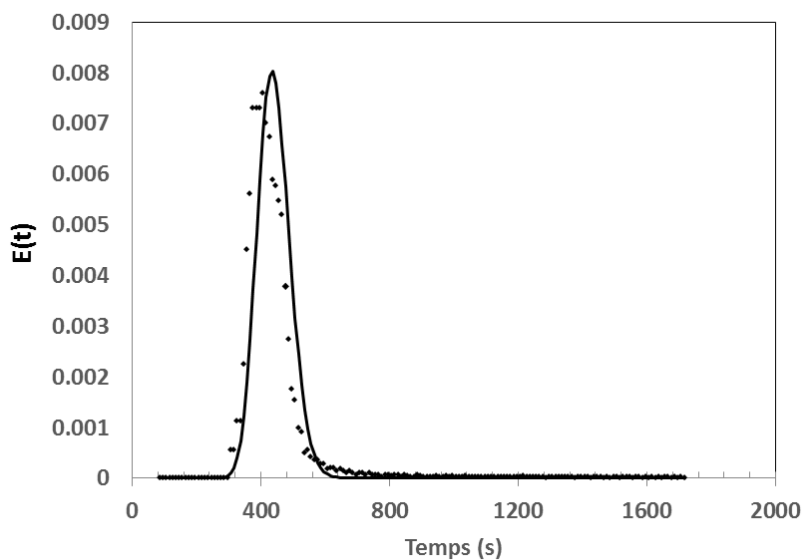


FIGURE III.10 – Comparaison des courbes de distribution de temps de séjour du lit fixe. Résultats expérimentaux (●) de l'expérience 2 et valeurs théoriques (-) selon le modèle des mélangeurs en cascade ( $J=47$ )

Tableau III.10 – Caractéristiques des lits fixes après package de la résine ANX Sepharose 4FF pour les colonnes XK 16/20, XK 50/20 et RESOLUTE FM 140

Colonne	Essai	Hauteur lit (cm)	Volume Lit (ml)
XK 16/20	1_16	10,0	20,1
XK 50/20	1_50	10,5	206
	2_50	12,5	245
	4_50	10,5	206
	5_50	10,5	206
Resolute FM 140	3_140	10,5	1600
	5_140	15,0	2300
	6_140	15,0	2300

Tableau III.11 – Conditions d'équilibration, de charge et d'élution utilisées dans les tests de changement d'échelle. L'élution a toujours été effectuée avec une solution de NaCl 0,5 mol/L à pH 6,3

Colonne	Essai	Conditions opératoires								
		Équilibration		Charge						Élution
		pH	Vitesse superficielle (cm/min)	Mode prétraitement du jus	Volume jus alimenté (L)	C <sub>0</sub> Rubisco (g/L)	pH	Cond (mS/cm)	Vitesse superficielle (cm/min)	Vitesse superficielle (cm/min)
XK 16/20	01_16	6,0	2,5	Congelé	0,25	5,9	6,0	14,5	2,8	1,5
XK 50/20	01_50	6,0	0,5	Congelé	0,86	1,4-0,7*	5,6	13,2	0,5	0,13
	02_50	6,0	0,5	Congelé/dilué à l'eau	0,80	1,9-1,1*	6,2	6,9	0,6	0,13
	04_50	7,5	0,5	Atomisé	0,85	3,3	5,8	15,3	0,76	0,15
	05_50	6,0	0,5	Atomisé	5,70	4,2	5,8	15,2	0,76	0,12
Resolute FM 140	03_140	7,5	1,08	Frais	6,20	2,1	6,6	13,5	0,6-0,05	0,32
	05_140	7,5	1,08	Atomisé	12,34	3,3	5,8	15,2	1,08	0,43
	06_140	7,5	1,08	Atomisé (pH ajusté)	28,55	4,1	7,5	12,1	0,7	0,21

\* Variation de la concentration observée durant toute la durée de l'alimentation du jus pendant la charge

tion du pH avec les jus alimentés. Le pH 7,5 peut favoriser la stabilité de la Rubisco. La concentration en Rubisco et le pH des jus ont été imposés par la production des jus et leur éventuel traitement ultérieur (cf. chapitre II). Seule l'expérience 06\_140 a été réalisée à un pH modifié, toujours dans l'objectif de stabiliser la protéine. Enfin, malgré les efforts réalisés pour travailler à vitesse superficielle constante, les différents jus utilisés présentaient souvent des propriétés d'écoulement différentes, et cette contrainte n'a pas pu être en général respectée. Cela rend difficile la comparaison des résultats, notamment à différentes échelles, car la vitesse superficielle modifie le temps de passage dans la colonne et conditionne en partie la largeur de la zone de transfert de la courbe de percée.

### 2.3.3 Résultats et discussion

L'ensemble des expériences réalisées a donné lieu à un très grand nombre de données. Elles n'ont pas été encore toutes exploitées totalement, car le temps de travail nécessaire est encore très important. Pour cette raison, il a été décidé que seule la concentration de Rubisco dans le système sera systématiquement présentée, les autres variables suivies étant présentées à titre d'exemple et pour faciliter la compréhension. C'est le cas par exemple de la pression, le pH ou la conductivité en entrée ou en sortie de colonne.

Par la suite, les résultats obtenus sont présentés et discutés. Ils seront présentés regroupés par taille de colonne, pour faciliter une première discussion. Une fois les différentes expériences présentées, les capacités de rétention et rendements d'élution, les facteurs de concentration et les temps de rétention seront présentés et discutés. Enfin, les chromatogrammes des échantillons obtenus lors de l'élution seront analysés.

Sur les courbes d'élution les temps de rétention de la Rubisco ont été indiqués. La résine étant la même dans toutes les expériences et les colonnes étant préparées de la même façon,



il sera possible de poser des hypothèses plausibles sur la porosité externe afin de vérifier la cohérence des différents résultats et d'estimer le facteur de rétention de la Rubisco.

La figure III.11 montre les courbes de percée et d'élution de la Rubisco obtenues pour l'expérience réalisée avec la colonne XK 16/20. D'après la courbe de percée, à la fin de l'expérience la résine est en équilibre avec la concentration en Rubisco de l'alimentation. La courbe d'élution présente une certaine trainée, qui impliquerait dans un procédé des pertes de Rubisco, puisque la concentration est trop faible pour envisager une récupération.

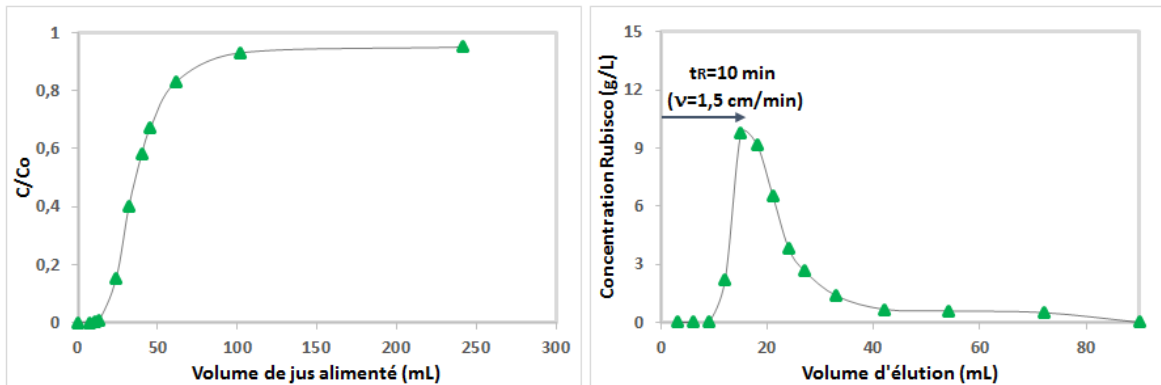


FIGURE III.11 – Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 1\_16

Dans les figures III.12, III.13, III.14 et III.15, les courbes de percée et d'élution de la Rubisco obtenues pour les expériences réalisées avec la colonne XK 50/20 sont représentées.

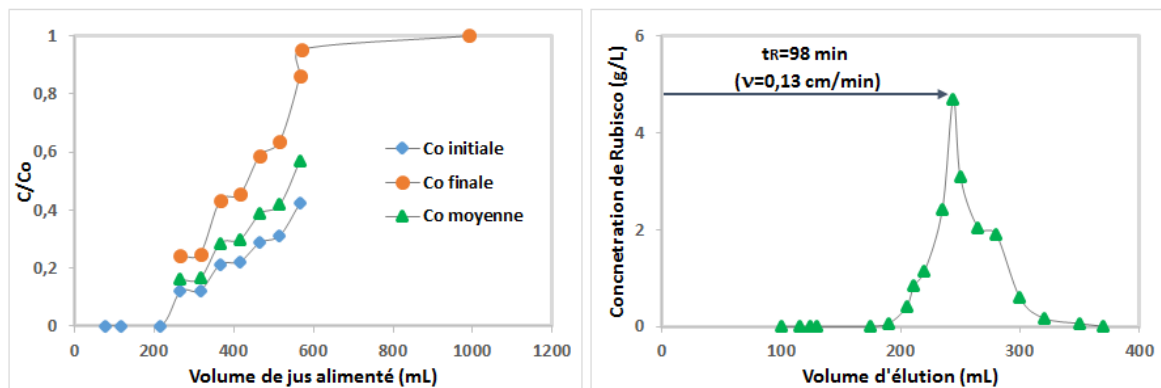


FIGURE III.12 – Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 1\_50

Les expériences représentées dans les figures III.12 et III.13, ayant été réalisées avec des jus décongelés, très instables (cf. chapitre II), une évolution de la concentration initiale en Rubisco a été observée en fin d'expérience, sans qu'on puisse déterminer précisément la forme de cette évolution. Ainsi, si les rapports  $C/Co$  sont certains au départ et à la fin de l'expérience, ils sont très incertains durant l'essai, pouvant conduire à des écarts supérieurs à 20%. La durée très inférieure de l'essai 1\_16, où des jus décongelés ont été aussi utilisés, a vraisemblablement atténué cette difficulté.

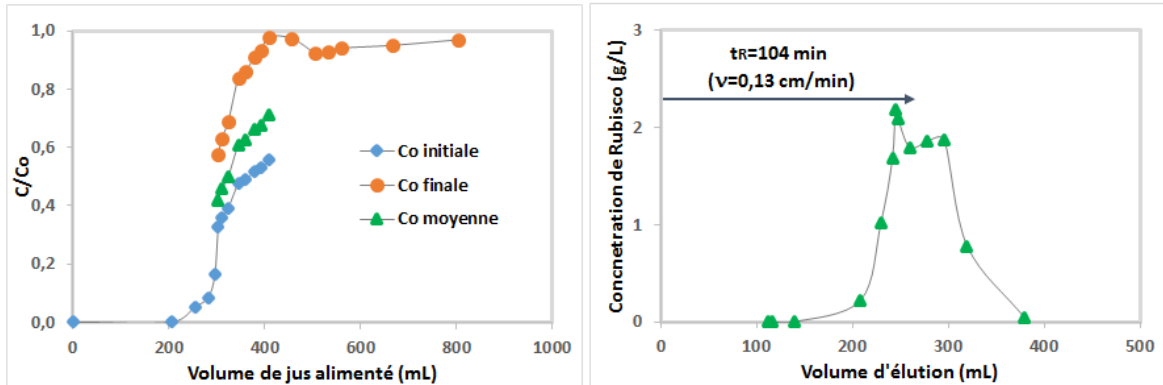


FIGURE III.13 – Courbe de percée et courbe d'élué de l'expérience 2\_50

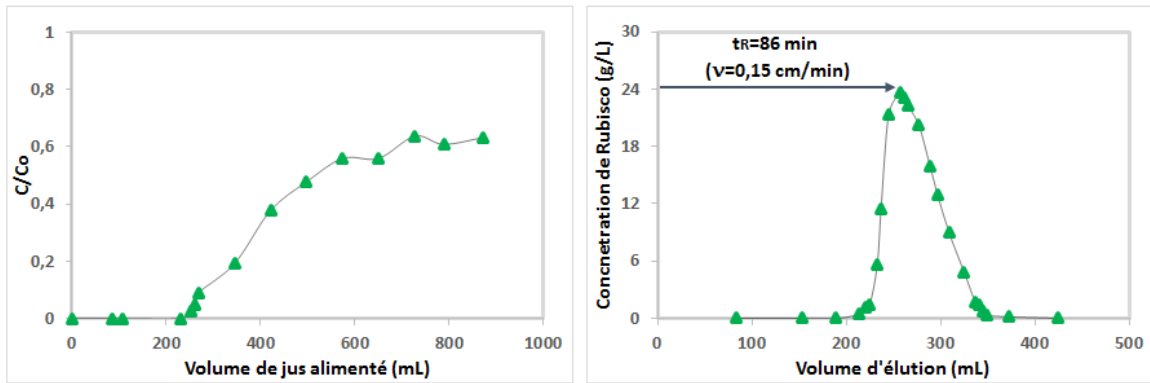


FIGURE III.14 – Courbe de percée (colonne non saturée) et courbe d'élué de l'expérience 4\_50

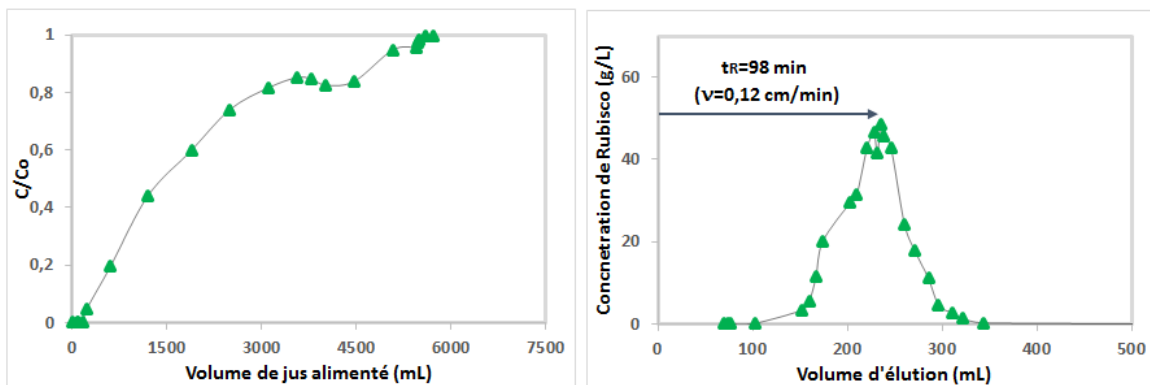


FIGURE III.15 – Courbe de percée et courbe d'élué de l'expérience 5\_50

Les expériences représentées dans les figures III.14 et III.15 ont été réalisées avec des jus atomisés. L'essai 4\_50 a dû s'arrêter sans arriver à la saturation de la colonne faute de jus à alimenter. On observe une grande similitude dans les évolutions des deux expériences, et une différence assez nette vis-à-vis de celles réalisées avec les jus décongelés.

Dans les figures III.16, III.17 et III.18 sont représentées les courbes de percée et d'élution de la Rubisco obtenues pour les expériences réalisées avec la colonne RESOLUTE FM 140. Durant ces expériences, un suivi automatique des variables comme la pression en entrée de la colonne et le pH et la conductivité en entrée et en sortie a été réalisé.

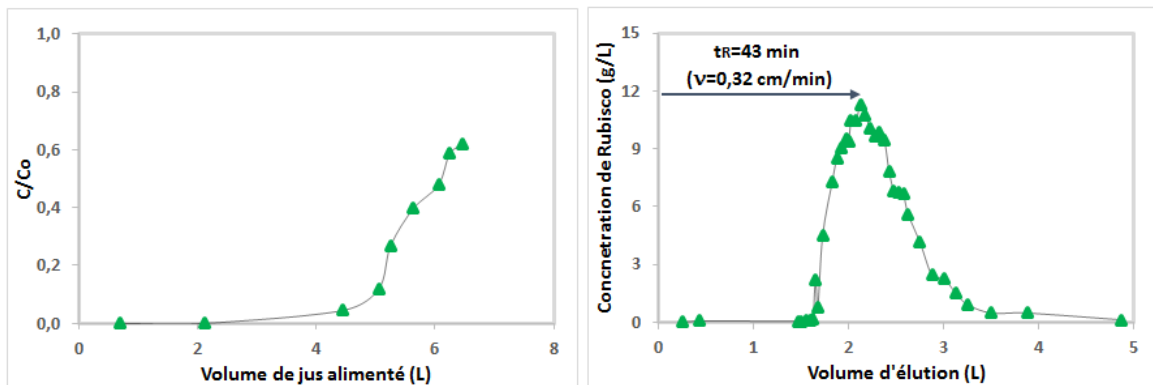


FIGURE III.16 – Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 3\_140

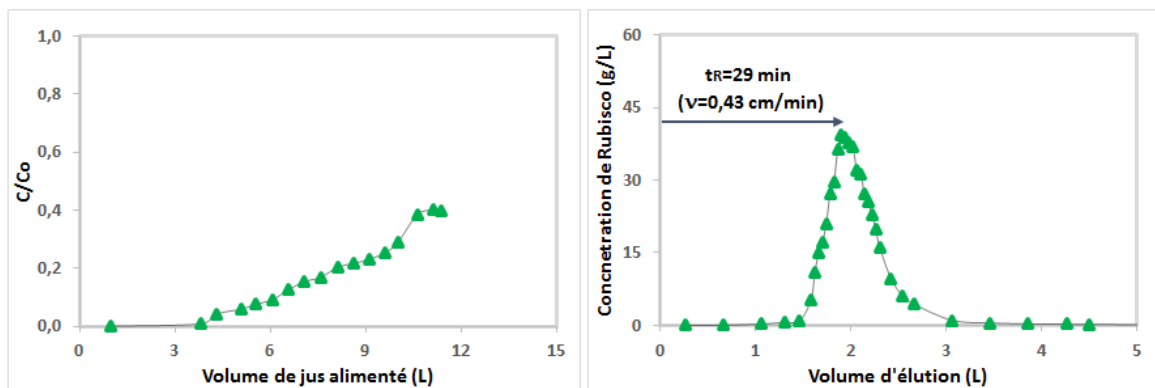


FIGURE III.17 – Courbe de percée (non saturée) et courbe d'élution de l'expérience 5\_140

L'expérience 3\_140, réalisée avec des jus frais, a dû être arrêtée assez rapidement car une augmentation très importante et rapide de la pression en entrée de la colonne a été mesurée. Elle est représentée dans la figure III.19. Afin de contrôler la pression, des réductions régulières du débit d'alimentation ont été effectuées mais elles n'ont pas eu un effet suffisant. La pression, oscillant en dents de scie, atteignait régulièrement les valeurs maximales admissibles par la colonne et finalement, la décision d'arrêter l'expérience a été prise. Cette augmentation de la pression a été aussi observée qualitativement (probablement en moindre mesure) à l'échelle laboratoire avec la colonne KX\_50.

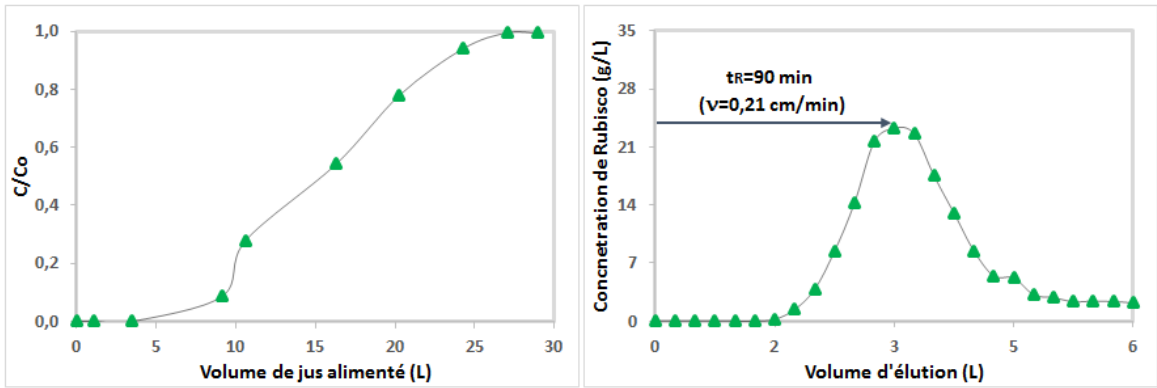


FIGURE III.18 – Courbe de percée et courbe d'élution de l'expérience 6\_140

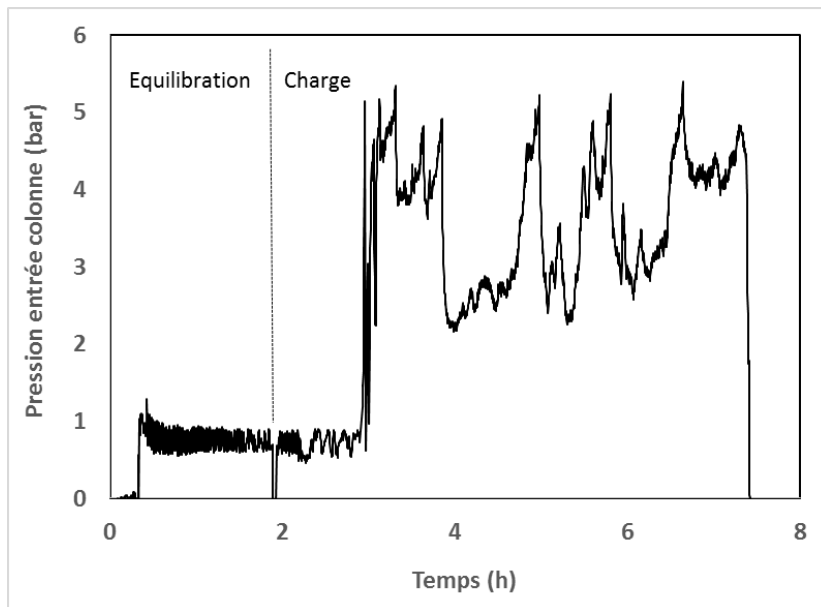


FIGURE III.19 – Évolution de la pression en entrée de la colonne lors de l'expérience 3\_140. Sur l'échelle du temps, les phases d'équilibration et le départ de la charge sont indiquées

Bien que l'étude de ce comportement n'ait pas été abordée dans ce travail, la présence de polysaccharides avec des propriétés adhésives ou la formation possible des émulsions protéine/polysaccharides dans les jus sont probablement à l'origine de ces difficultés, compte tenu du rôle majeur qu'ils peuvent jouer sur les écoulements (BOUYER et al. 2012). Cela avait été déjà avancé dans le chapitre II, dans le paragraphe 5.3.3 sur la caractérisation des jus atomisés. Cette expérience n'a donc pas été exploitée d'un point de vue quantitatif mais montre clairement la limite d'utilisation des colonnes chromatographiques en lit fixe pour ce système, limitations qui ont été étudiées dans la littérature pour d'autres milieux bruts avec des teneurs élevées en polysaccharides, comme les algues (WANG 2002 ; NIU et al. 2010).

L'utilisation des jus atomisés dans les expériences permet clairement d'éviter ce problème, comme le montre la figure III.20, dans laquelle la pression à l'entrée de la colonne lors de l'expérience 5\_140 est représentée durant les différentes étapes du procédé. Néanmoins, il a été constaté que lorsque l'expérience se déroule jusqu'à saturation de la résine, la pression à l'entrée de la colonne peut augmenter car la résine subit un gonflement modéré au cours de la charge. Pour l'éviter, un volume d'expansion d'environ 10% doit être prévu lors du package.

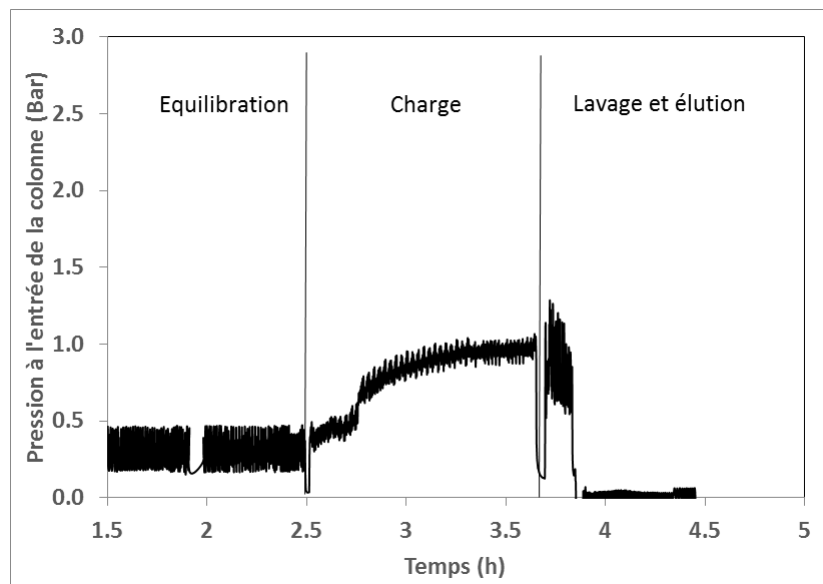
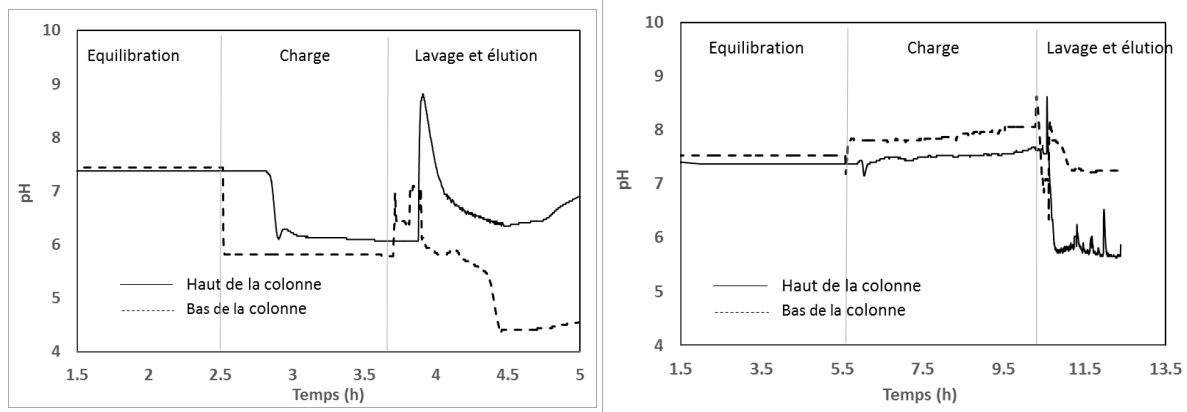


FIGURE III.20 – Évolution de la pression à l'entrée de la colonne lors des différentes étapes dans l'expérience 5\_140. L'élution se faisant en sens descendant, la pression en bas de la colonne reste faible

L'atomisation se confirme donc comme un procédé de prétraitement des jus qui, en plus de permettre une correcte conservation de la Rubisco, rend le jus compatible avec le procédé chromatographique. Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus en lit fixe par KERFAI (2011) sur la résine Q Hyper Z.

Dans les figures III.21-A et III.21-B, les évolutions du pH en bas et en haut de la colonne lors des expériences 5\_140 et 6\_140 sont présentées. Ce paramètre est particulièrement important car il détermine la capacité totale d'échange de la résine, la charge nette de la protéine, et la charge d'autres constituants du jus pouvant présenter des propriétés acido-basiques. Son



(A) Expérience 5\_140

(B) Expérience 6\_140

FIGURE III.21 – Évolution du pH en haut et en bas de la colonne lors de l'expérience 5\_140 (A) et 6\_140 (B)

analyse est alors d'autant plus compliquée que le système est complexe. On observe sur la figure III.21 que durant la charge le pH en sortie de la colonne reste constant, proche de celui du jus d'alimentation. Son évolution lors du lavage et de l'élution peut être très importante.

Ainsi, il a été observé que dans les échantillons d'élution de l'expérience 5\_140 la Rubisco était particulièrement instable, or le pH de ces échantillons arrive à des valeurs de pH très en dessous de ce que la protéine peut supporter. Dans l'expérience 6\_140, où le pH des jus est supérieur et où la résine a été totalement saturée, l'évolution du pH est limitée et reste dans l'intervalle de stabilité de la protéine.

L'ensemble des résultats de capacité, de rendement d'élution et de facteur de concentration obtenus pour les expériences présentées est résumé dans le tableau III.12.

Une fois de plus, il est constaté que l'utilisation des jus congelés ne permet pas d'obtenir des résultats concluants, et seuls les résultats obtenus avec des jus atomisés seront discutés.

D'une manière générale, la capacité de rétention de la résine est évaluée entre 24 et 35 g de Rubisco/L, et le facteur de concentration pouvant être atteint dans ces conditions est estimé à 10. La Rubisco fixée est en général correctement éluee. L'expérience 5\_50, montre un rendement d'élution faible. Pour autant, dans cette expérience, la vitesse d'élution était faible, et les autres conditions opératoires similaires à celles d'autres expériences. L'instabilité de la protéine dans les conditions de pH de l'élution, discutée précédemment, peut être à l'origine de ce résultat.

La capacité totale obtenue dans l'expérience 6\_140, avec un même pH d'équilibration et du jus de 7,5 (supérieur aux autres), est inférieure à celle obtenue avec les jus à leur pH naturel. La capacité supérieure de la colonne, ne profite donc pas à la Rubisco, mais plutôt à d'autres composés des jus. Il est ainsi probable que, dans l'intervalle de pH considéré de 6 à 7,5, les polyphénols (nombreux dans le jus) soient davantage chargés et deviennent plus compétitifs

Tableau III.12 – Résultats expérimentaux de charge et d'élution de la Rubisco à différentes échelles

Expérience		1_16	1_50	2_50	4_50	5_50	3_140	5_140	6_140
Charge	Masse alimentée (g)	1,48	0,9	1,2	2,8	23,9	13,0	40,7	117,0
	Masse fixée (g)	0,16	0,5	0,4	1,36	7,4	9,60**	28,5	55,1
Élution	Masse éluee (g)	0,14	0,2	0,2	1,55	3,9	10,4	25,0	41
	Facteur concentration maximale	1,66	4,4	1,5	7,39	11,1	5,26	11,3	5,7
Rendement élution (%)		87,5	41,7	45,5	<i>114,0</i>	52,8	<i>108</i>	87,7	74,4
$M_{\text{Rubisco}} / V_{\text{volume résine}}$ (g/L)		8,2*	2,3*	1,8*	6,5	<b>35,8*</b>	5,94	12,34	<b>23,9*</b>

\* Équilibre C/Co=1 atteint en sortie de la colonne. Les données de rendement d'élution ne peuvent pas être supérieures à 100%. Cependant, certaines valeurs sont supérieures dues aux erreurs expérimentales (en italique). On a préféré les montrer telles que données par les calculs

par les sites de la résine. Ainsi, le facteur de concentration obtenu est aussi moindre. Ce point sera davantage discuté au regard des chromatogrammes des échantillons d'élution.

Les meilleurs facteurs de concentration en élution ont été obtenus dans les expériences 4\_50, 5\_50 et 5\_140, avec des jus alimentés à leur pH naturel, relativement faible (5,8). Par contre, dans ces tests la Rubisco extraite s'est montrée moins stable. Cet effet, d'une manière générale, a été observé dans tous les échantillons où le pH était inférieur à 6,5.

Le tableau III.13 synthétise les valeurs estimées des facteurs de rétention,  $k$  (équation III.7), de chaque expérience. Au-delà de la valeur obtenue, c'est la cohérence des résultats obtenus qui est testée. L'estimation a été réalisée en posant une hypothèse sur la porosité externe du système, puisqu'elle n'est pas exactement connue.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (\text{III.7})$$

Avec  $t_R$  : temps de rétention, déterminé à l'intersection des tangentes à la courbe d'élution

$t_M$  : temps mort de la colonne

Le temps mort de la colonne est le temps de rétention d'une molécule qui n'est pas du tout retenue par la colonne. Pour une colonne donnée,  $t_M$  peut être mesuré expérimentalement ou déterminé selon l'équation III.8, puisqu'il correspond au temps de passage dans le volume poreux de la colonne.

$$t_M = \frac{V_p}{Q} = \frac{\varepsilon V_C}{Q} \quad (\text{III.8})$$

Tableau III.13 – Estimation du facteur de rétention  $k$  de la Rubisco (hypothèse posée sur la valeur de la porosité externe  $\varepsilon$  du lit)

Expérience	$t_R$ (min)	$v$ (cm/min)	$H$ (cm)	$t_M$ (min)	$k$ (= 0,4)	$k$ (= 0,3)	$k$ (= 0,5)
1_16	10	1,5	10	2,67	2,8	4,0	2,0
1_50	98	0,13	10,5	32,31	2,0	3,0	1,4
2_50	104	0,13	12,5	38,46	1,7	2,6	1,2
4_50	86	0,15	10,5	28,00	2,1	3,1	1,4
5_50	98	0,12	10,5	35,00	1,8	2,7	1,2
3_140	43	0,32	10,5	13,13	2,3	3,4	1,6
5_140	29	0,43	15	13,95	1,1	1,8	0,7
6_140	90	0,21	15	28,57	2,2	3,2	1,5
Valeur moyenne de $k$ estimée					2,0	3,0	1,4

Malgré des écarts, les valeurs de  $k$  ainsi estimées restent cohérentes entre les différentes expériences. Si l'on considère une porosité externe du lit d'environ 0,4, habituelle dans les lits fixes de particules sphériques monodisperses, le facteur de rétention de la Rubisco serait d'environ 2, ce qui est dans l'intervalle habituellement considéré comme adapté à la séparation chromatographique. Idéalement, la détermination des temps de rétention d'autres pics chromatographiques, permettrait d'évaluer le facteur de sélectivité de la Rubisco.

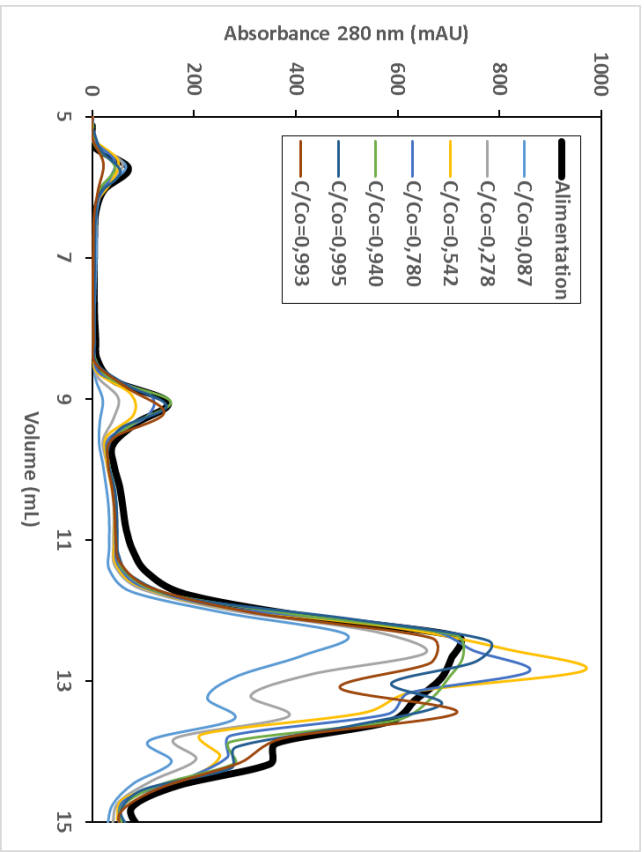
Les figures III.22 montrent l'évolution des chromatogrammes HPLC-SEC des échantillons obtenus lors de la charge (A) et lors de l'élution (B) dans l'expérience 6\_140. Dans chaque figure, le chromatogramme du jus d'alimentation est aussi indiqué comme référence.

Idéalement, l'étude de ces pics chromatographiques pourrait permettre d'établir des courbes d'élution pour les autres constituants, analysables en terme de temps de rétention, et pourrait nous permettre d'estimer un facteur de sélectivité pour la Rubisco. Cependant, ces chromatogrammes reflètent encore la présence de divers composés, non identifiés, donc cette démarche n'a pas été considérée adaptée et ces chromatogrammes ont été utilisés uniquement qualitativement dans le but de mieux comprendre le procédé et analyser ses performances.

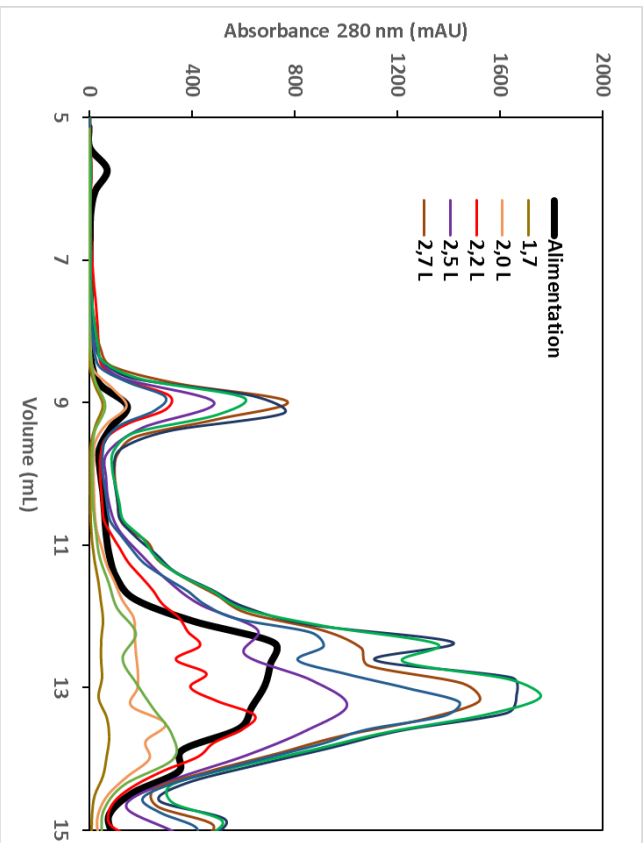
La figure III.22-A montre que la charge de la Rubisco dans la colonne se fait en parallèle de celle d'autres constituants, globalement représentés par un grand pic chromatographique (nommé pic 2). Il est remarqué que, comme l'avait identifié dans son travail KERFAI (2011), lorsque le rapport  $C/Co$  de la Rubisco arrive à des valeurs de l'ordre de 0,7, le pic correspondant aux autres constituants est plus important que celui de l'alimentation.

D'après la figure III.22-B, la surface du pic de la Rubisco dans les différents échantillons de l'élution est importante par rapport à celui de l'alimentation (le facteur de concentration maximal dans cette expérience était proche de 6), mais l'augmentation du pic 2, bien que moindre est aussi relativement important. Ce résultat confirme l'hypothèse émise au regard de la capacité de rétention, c'est-à-dire, qu'une augmentation du pH du jus favorise la fixation sur la résine d'autres constituants, de façon telle que l'augmentation de la capacité de la résine ne profite pas réellement à la Rubisco.





(A) Charge



(B) Éluition

FIGURE III.22 – Chromatogrammes HPLC-SEC des échantillons obtenus lors de la charge (A) et lors de l'éluition (B) dans l'expérience 6\_140 et comparaison avec celui du jus d'alimentation. Les solutions ont été diluées 5 fois pour analyse HPLC-SEC

La figure III.23 montre l'évolution des chromatogrammes HPLC-SEC des échantillons obtenus lors de l'élution dans l'expérience 4\_50. Contrairement à la 6\_140, dans l'expérience 4\_50 la charge n'a pas été complète. Si l'on compare les figures III.22-B et III.23, on observe que les ratios des hauteurs du pic de la Rubisco et du pic 2 sont très supérieurs (double) dans le cas de la figure III.22-B, c'est-à-dire, dans l'expérience 6\_140 où la résine a été saturée.

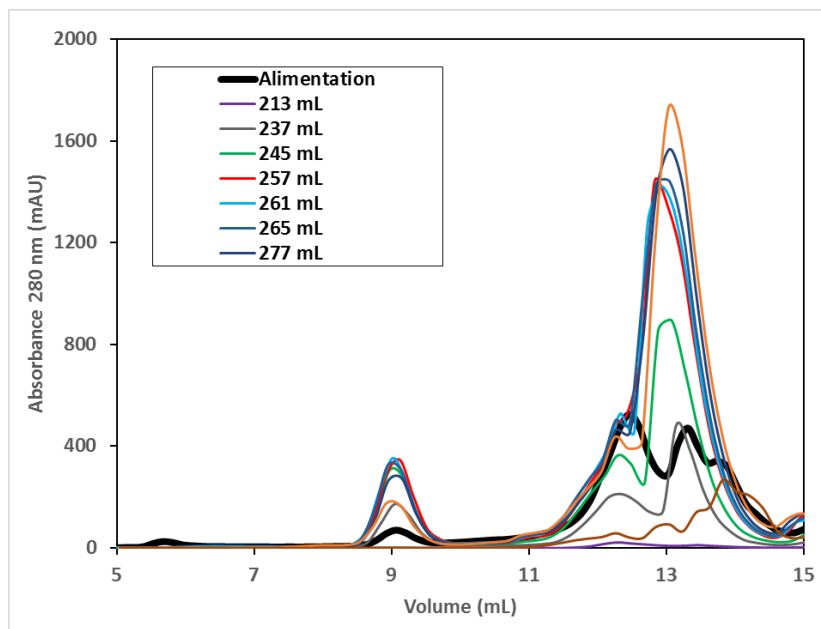


FIGURE III.23 – Chromatogramme HPLC-SEC des échantillons obtenus lors de l'élution dans l'expérience 4\_50 et comparaison avec celui du jus d'alimentation. Les solutions ont été diluées 10 fois pour analyse HPLC-SEC

Dans un premier effort d'identification des constituants du pic 2, la mesure de l'absorbance à 340 nm a été effectuée. Dans la figure III.24, ces résultats sont aussi indiqués pour l'expérience 6\_140.

La présence de polyphénols comme principaux contaminants des échantillons de la Rubisco est confirmée. La taille de ces constituants étant plus faible que celle de la protéine, il a été choisi d'évaluer la possibilité de finaliser la purification lors de l'étape suivante du procédé, l'ultrafiltration. En effet, la solution de protéine obtenue doit encore être dessalée.

La séparation chromatographique pourrait sûrement être encore améliorée, notamment par l'utilisation d'un gradient de concentration en sel pour l'élution. Ce point constitue donc une des perspectives majeures de ce projet.

## 2.4 Conclusions

La résine ANX Sepharose 4FF permet la récupération de la Rubisco des jus de luzerne. La capacité moyenne de la colonne se trouve autour de 30 g de Rubisco par litre de lit de

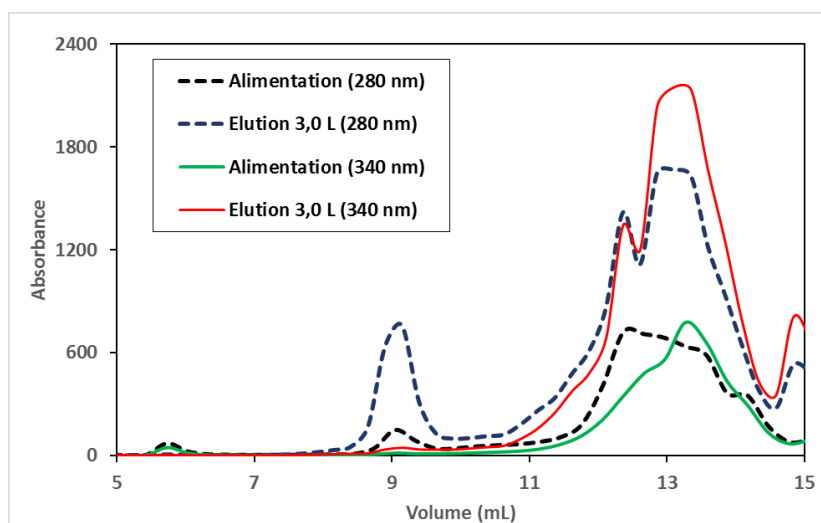


FIGURE III.24 – Exemple du chromatogramme d'un échantillon mesuré à 280 nm et à 340 nm. Le pic 2 est fortement représentatif des composés de type polyphénols.

résine. La séparation chromatographique, telle que décrite ici, permet d'obtenir une solution aqueuse de Rubisco jusqu'à 11 fois plus concentrée que l'alimentation. La solution riche en Rubisco n'est néanmoins pas pure, et doit encore être traitée.

Malgré la difficulté à formuler des conclusions, liée principalement à la difficulté de contrôler des conditions opératoires imposées par le milieu, des préconisations peuvent être émises à l'issue de l'étude du procédé chromatographique :

- La mise en œuvre de la séparation chromatographique à partir des jus de luzerne nécessite une étape préalable d'atomisation des jus, pour permettre leur écoulement dans la colonne jusqu'à saturation de celle-ci.
- Le pH est une variable essentielle de contrôle du procédé. Durant la charge, le pH reste constant et proche de celui de l'alimentation. Si le pH d'alimentation est trop élevé, le gain éventuel de capacité ne semble pas bénéficier à la Rubisco. Le contrôle du pH lors de l'élution est primordial pour assurer la stabilité de la protéine dans les éluats.
- Atteindre l'équilibration de la colonne avec l'alimentation durant la charge semble avoir une influence positive sur le procédé, notamment sur le facteur de concentration qui peut être atteint (l'effluent en sortie de la colonne et encore chargé en Rubisco peut être utilisé pour l'alimentation d'une deuxième colonne).
- L'élution peut se réaliser avec une solution NaCl 0,5 mol/L, mais elle n'est pas assez sélective et peut sans doute être optimisée. L'impossibilité de séparer chromatographiquement les constituants par élution isocratique montre un contrôle cinétique de la séparation, auquel cas l'élution avec un gradient est plus intéressante (RATHORE et VELAYUDHAN 2003).
- Le comportement du système reste similaire quelle que soit la taille de la colonne. Des facteurs de rétention similaires ont été déterminés pour tous les diamètres de colonnes.
- Parmi les constituants principaux des éluats, on retrouve les polyphénols. Il est pré-

conisé dans un premier temps de les séparer lors de l'étape suivante du procédé qui est l'ultrafiltration, mise en œuvre dans le but d'ajuster la salinité de la solution de Rubisco.

- Les solutions de Rubisco ainsi produites montrent les propriétés fonctionnelles recherchées dans le projet RUBIS (résultats non montrés, obtenus au centre RAPSODEE (Albi)).

Dans la dernière partie de ce chapitre, les premiers éléments d'étude du procédé membranaire pour la purification et le dessalement des solutions de Rubisco produites sont développés.

## 3 Purification et conditionnement

### 3.1 Introduction

L'étude de l'application des procédés membranaires pour le fractionnement ou la purification des protéines végétales est relativement ancienne, et a été souvent centrée autour de la valorisation du soja (CHERYAN 1980; KUMAR et al. 2003; ALIBHAI et al. 2006). Néanmoins, d'autres travaux ont permis de mettre au point des procédés pour la valorisation des protéines du tournesol (MAUBOIS et al. 1976) ou du colza (TZENG et al. 1988), associés en général à des phases d'extraction et de précipitation préalables des protéines. Dans ces procédés, l'ultrafiltration est en général utilisée pour l'élimination des composés indésirables des concentrés protéiques, dans le cadre des applications agro-alimentaires. Pour cela, des solutions diverses sont utilisées en tant que solutions de lavage, parfois en mode diafiltration.

A partir des années 2000, les travaux sur l'application de l'ultrafiltration pour la purification des protéines végétales s'intéressent aussi au comportement des protéines lors ou après les procédés. CHEW et al. (2003) ont étudié l'influence du procédé sur les propriétés des concentrés des protéines obtenus. Ils montrent par exemple que la solubilité des protéines est supérieure lorsqu'elles sont produites par ultrafiltration (par rapport à celles isolées par précipitation isoélectrique). ARAKAWA et al. (2017) ont étudié les difficultés pouvant se présenter dans les procédés comme conséquence des concentrations locales très importantes en protéine qui peuvent être rencontrées. Les procédés chromatographiques comme les membranaires sont abordés. L'ajout des additifs pour limiter des éventuelles interactions et difficultés est préconisé.

Des travaux plus récents confirment le potentiel des procédés membranaires dans la concentration et la purification des protéines d'origine végétale (RODRIGUES et al. 2012; CASTRO-MUÑOZ et FÍLA 2018), voire plus globalement dans la mise en place des bioraffineries (ABELS et al. 2013). Quelques travaux (GALIANO et al. 2018) abordent la question des matériaux constituant les membranes, question majeure dès lors que les applications visées sont alimentaires (ce qui est le cas le plus fréquent). De plus, de vraies stratégies de sélection des membranes (matériaux et taille de pore) peuvent être développées pour assurer les meilleures rendements de séparation (GALANAKIS 2015).

KOSCHUH et al. (2004) ont étudié l'application de l'ultrafiltration pour la séparation des protéines dans les jus de luzerne et de ray grass. Leurs résultats (rendement d'environ 50%) ont été fortement affectés par l'instabilité très importante de la protéine, conséquence de la congélation préalable à laquelle les jus ont été soumis et de la température et la durée importantes du traitement par ultrafiltration. Par ailleurs, ce travail ne fait pas état de difficultés particulières liées à l'adhésion ou au colmatage des membranes par le jus, ce qui pourrait être expliqué à nouveau par la congélation / décongélation des jus. En effet, les expériences que nous avons réalisées dans le cadre de cette étude avec des jus décongelés n'ont pas montré non plus de difficultés particulières liées à l'écoulement.

Plus récemment, des études ont été publiées visant la production de protéines de jus de luzerne décongelés par un procédé membranaire original (ZHANG et al. 2015; ZHANG et al. 2017). Le procédé appelé UF-RDM (Ultrafiltration Rotating Disk Membrane) est notamment comparé aux résultats d'ultrafiltration obtenus en cellules AMICON® comme celles utilisées dans ce travail. Dans le dispositif UF-RDM, une membrane plane d'ultrafiltration est placée dans un disque pouvant tourner jusqu'à 2500 rpm, générant un cisaillement important qui permet de limiter le phénomène de la polarisation de concentration et du colmatage de la colonne. Différentes membranes ont été testées, dont des membranes en Polyethersulfone (PES). L'effet de la congélation/décongélation sur le comportement des jus n'est pas discuté.

Parallèlement à ces travaux, les procédés membranaires, et en particulier, l'ultrafiltration a été souvent associée à des réactions enzymatiques pour la production de peptides naturels à partir des protéines végétales (D'ALVISE et al. 2000; PREVOT-D'ALVISE et al. 2004; KAPEL et al. 2006; GARCÍA et al. 2013; WANG et al. 2018). Certains ont l'intérêt d'aborder différentes échelles d'étude, mais l'objectif étant relativement éloigné de celui de ce travail, ils ne seront pas davantage développés ici.

Enfin, ces dernières années, une nouvelle approche de ce type de problèmes est assez largement traitée dans la littérature : les composés considérés dans les années 80 et 90 comme des contaminants des fractions protéiques sont devenus aujourd'hui l'objectif principal de la séparation. C'est particulièrement le cas des polyphénols, qui sont largement recherchés pour leurs propriétés antioxydants (CASTEL et al. 2014; CONIDI et al. 2015; CASTRO-MUÑOZ et al. 2016; PANJA 2017; SINICHI et al. 2018).

### 3.2 Objectif

L'étude présentée ici, répond à deux objectifs principaux :

- purifier la solution de Rubisco issue de l'étape de chromatographie d'échange d'ions en éliminant les constituants observables dans les chromatogrammes HPLC-SEC de taille inférieure à celle de la Rubisco (environ 560 kDa), tout en évitant de perdre de la protéine au cours de l'opération.
- conditionner la solution de Rubisco en remplaçant les sels de la solution d'élution (NaCl 0,5 mol/L) par des sels compatibles avec les applications potentielles. En outre, la composition de la solution de remplacement doit permettre de maintenir une certaine

force ionique et une valeur de pH, pour assurer la stabilité de la protéine.

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse représente une première approche sur la purification et le conditionnement de la Rubisco par la technique d'ultrafiltration/diafiltration. Les expériences réalisées et exploitées cherchent à poser les bases, en tant qu'étude préliminaire, afin de valider à petite échelle la viabilité de l'opération dans un premier temps en termes de sélectivité et dans un deuxième temps en évaluant la productivité du procédé.

Ainsi, dans ce travail, l'aspect du changement d'échelle de l'étape d'ultrafiltration ainsi que le fonctionnement en mode tangentiel n'ont pas été étudiés. L'évaluation des membranes est donc uniquement basée sur les résultats obtenus à partir d'expériences à l'échelle laboratoire et sur un mode de fonctionnement frontal.

### **3.3 Principe**

#### **3.3.1 Procédés de séparation membranaire**

Les procédés de séparation par membranes sont des procédés de filtration, qui utilisent une barrière perméable permettant le transfert de matière d'au moins une espèce entre deux milieux, sous l'effet d'une force motrice. Cette force motrice peut être soit un gradient de pression (cas de l'osmose inverse, de la nanofiltration, de l'ultrafiltration et de la microfiltration), un gradient de concentration (cas de la dialyse) ou un gradient de potentiel électrique (cas de l'électrodialyse).

Les opérations de filtration par membrane à gradient de pression peuvent être appliquées pour la séparation liquide / liquide ou particules / liquide en vue soit de purifier la phase liquide, soit de récupérer les espèces valorisables. Les membranes ont des structures poreuses ou denses permettant de laisser passer de manière sélective les composants d'une solution sous l'action d'une différence de pression entre l'amont et l'aval de la membrane. Deux fractions sont obtenues : le rétentat, qui contient les éléments retenus par la membrane, et le perméat, qui contient les éléments qui ont traversé la membrane.

Dans le cas de l'ultrafiltration (UF) les membranes utilisées sont des membranes microporeuses, dont les diamètres de pores sont compris entre 1 et 100 nm. La taille des molécules retenues par une membrane d'UF peut aller de 1 kDa à 300 kDa.

#### **3.3.2 Grandeurs caractéristiques**

Afin de mieux comprendre les phénomènes qui sont associés à une opération d'ultrafiltration, quelques définitions et notions fondamentales seront exposées et détaillées dans ce paragraphe. Néanmoins, les essais d'ultrafiltration menés dans cette thèse ne constituant qu'une étude préliminaire, certains de ces aspects théoriques n'ont pas été exploités. Cependant il est important de les aborder d'un point de vue conceptuel, car ils seront pris en compte dans la discussion des résultats, notamment dans les perspectives de ces travaux.

### 3.3.2.i Pression Trans-Membranaire

La Pression Trans-Membranaire (PTM) est la force motrice qui permet le transfert à travers la membrane. Elle peut être définie par la différence de pression entre les deux côtés de la membrane selon l'équation III.9 :

$$PTM = (P_{rétentat} - P_{perméat}) \quad (\text{III.9})$$

L'ultrafiltration (UF) est une opération dite à basse pression, car la PTM est de l'ordre de quelques dizaines de bars à quelques bars.

### 3.3.2.ii Densité de flux (J)

Dans l'évaluation d'un procédé de filtration la valeur de densité de flux (J) est associée au concept de productivité. En effet, J représente le débit qui peut traverser la membrane par unité de surface, pour une pression transmembranaire donnée.

La densité de flux (J) est le débit de perméat rapporté à la surface de la membrane, et est défini par l'équation III.10 :

$$J = \frac{Q}{S} \quad (\text{III.10})$$

Avec  $Q$  : débit de perméat en  $\text{L.h}^{-1}$  (ou  $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ )

$S$  : surface de la membrane en  $\text{m}^2$

$J$  : densité de flux en  $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  (ou  $\text{m}^3.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ )

### 3.3.2.iii Perméabilité hydraulique ( $L_p$ ) et résistance hydraulique ( $R_h$ )

En l'absence de toute matière retenue à la surface de la membrane (cas de la filtration de l'eau pure par exemple), la densité de flux de perméat est directement proportionnelle à la PTM appliquée. Par application de la loi de Darcy, la constante de proportionnalité est appelée perméabilité hydraulique de la membrane ( $L_p$ ) (équation III.11)

$$J = L_p \times PTM \quad (\text{III.11})$$

Avec  $PTM$  : en bar

$L_p$  : perméabilité hydraulique de la membrane en  $\text{L.bar}^{-1}.\text{h}^{-1}.\text{m}^2$

La perméabilité hydraulique  $L_p$  n'est pas une caractéristique intrinsèque de la membrane

car elle dépend de la viscosité du solvant, qui est fonction de la température et du type de fluide. Pour cette raison, il est nécessaire de préciser la température à laquelle sont réalisées les mesures.

Dans le cas de transfert d'eau pure au travers d'une membrane, on peut également écrire (équations III.12 et III.13) :

$$L_p = \frac{1}{\mu_{eau} \times R_h} \quad (\text{III.12})$$

Soit :

$$J = \frac{PTM}{\mu \times R_h} \quad (\text{III.13})$$

Cette relation permet de calculer expérimentalement la résistance hydraulique d'une membrane à partir des mesures de la densité de flux en fonction de la pression transmembranaire. La résistance de la membrane est la résistance que la membrane oppose au transfert du solvant. Elle est notée  $R_h$ , et est une caractéristique intrinsèque de la membrane, c'est-à-dire indépendante du solvant, contrairement à  $L_p$ .

### 3.3.2.iv Sélectivité : taux de rejet ou de rétention (TR) et taux de perte (TP%)

La sélectivité d'une membrane est en général caractérisée par le taux de rétention d'une espèce. Le taux de rétention, ou taux de rejet, caractérise la proportion d'une espèce qui est retenue par la membrane. Le taux de rejet permet donc de définir la sélectivité de la membrane par rapport à une espèce donnée et il est calculé d'après l'équation III.14 :

$$TR_i = \left(1 - \frac{C_{P_i}}{C_{R_i}}\right) \times 100 \quad (\text{III.14})$$

Avec  $C_{P_i}$  : concentration du constituant  $i$  dans le perméat

$C_{R_i}$  : concentration du constituant  $i$  dans le rétentat

$TR_i$  : taux de rétention en %

Dans le cas d'une rétention totale,  $TR = 100$  %.

Dans le cas spécifique de l'ultrafiltration, l'efficacité d'une membrane est caractérisée par le seuil de coupure. Il s'agit de la masse molaire (g/mol) d'une macromolécule donnée dont le taux de rétention par la membrane est de 90%.

Le taux de perte (TP%) permet de déterminer en termes de pourcentage la quantité de soluté qui passe dans le perméat par rapport à la quantité initiale de ce soluté dans la solution à traiter. Il peut être calculé par un bilan de matière, effectué soit sur le perméat, soit sur le rétentat.



Dans notre cas, le taux de perte sera calculé comme la différence entre la quantité de soluté initiale et la quantité de soluté retenu dans la cellule à la fin de la filtration (équation III.15).

$$TP(\%) = \frac{(C_0V_0 - C_RV_R)}{C_0V_0} \times 100 \quad (\text{III.15})$$

Avec  $C_0$  : concentration du soluté dans la solution à filtrer

$V_0$  : volume du soluté dans la solution à filtrer

$C_R$  : concentration du soluté dans le rétentat à la fin de la filtration

$V_R$  : volume du soluté dans le rétentat à la fin de la filtration

### 3.3.2.v Phénomènes limitants en ultrafiltration

**3.3.2.v.a Polarisation de concentration :** Sous l'effet de la pression, les espèces qui sont retenues par la membrane durant la filtration, vont s'accumuler progressivement à la surface de la membrane, créant un gradient de concentration entre cette surface et la solution d'alimentation. Ce phénomène appelé polarisation de concentration est considéré réversible, car il disparaît dès que la pression transmembranaire n'est plus exercée sur la membrane.

Une des conséquences de la polarisation de concentration est de réduire le flux de perméat ( $J$ ) en créant une contre-pression osmotique, et donc une diminution de la pression efficace appliquée sur la membrane (équation III.16).

$$\text{Pression efficace} = PTM - \Delta\Pi m \quad (\text{III.16})$$

La différence de pression osmotique,  $\Delta\Pi m$ , est la pression minimale qu'il faut dépasser pour qu'il y ait perméation du fluide (solvant et solutés non retenus) à travers les pores de la membrane. La pression osmotique est spécifique à chaque soluté et elle est d'autant plus forte que la masse molaire du soluté est faible et donc que sa vitesse de diffusion est rapide. L'effet de la pression osmotique est surtout sensible en osmose inverse ou en nanofiltration où les pressions osmotiques jouent un rôle important (AIMAR 2006)

**3.3.2.v.b Colmatage :** Le colmatage reste le facteur limitant majeur en séparation par membrane car il est inhérent à la filtration elle-même et souvent complexe. Le colmatage résulte du dépôt de matière à l'interface ou dans le milieu poreux, et engendre une résistance supplémentaire à l'écoulement qui se traduit, là aussi, par une chute du flux de perméat avec le temps, comme le montre la figure III.25.

Le colmatage d'une membrane peut résulter de différents mécanismes :

- Le dépôt de matière en surface, qui correspond à la formation d'une couche poreuse appelée gâteau de filtration ou dépôt lorsque la solution à traiter contient des matières

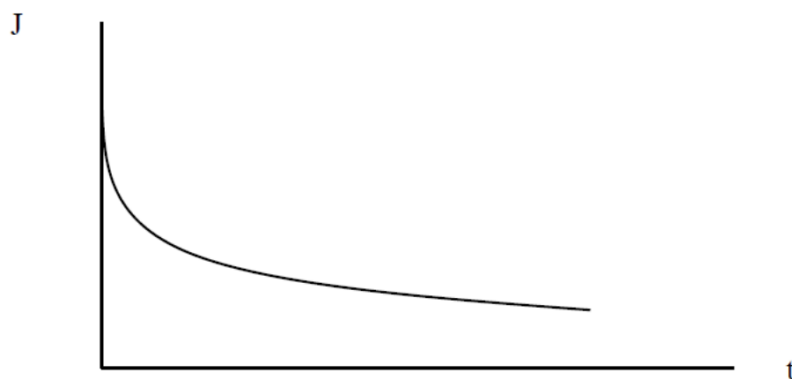


FIGURE III.25 – Effet du colmatage sur la variation du flux du perméat à une valeur de PTM constante

en suspension et/ou des colloïdes.

- Le blocage des pores, qui correspond à la pénétration et le blocage, partiel ou total, des pores de la membrane par les espèces présentes dont la taille est proche de celle des pores de la membrane.
- L'adsorption, qui correspond à la création de liaisons chimiques et/ou physiques entre des composés de l'alimentation ayant des affinités physico-chimiques pour les matériaux membranaires.

Dans le cas de la filtration de macromolécules, le flux de perméat n'évolue pas linéairement avec l'augmentation de la pression transmembranaire en raison de l'accumulation de matière à la surface de la membrane. Dans certains cas même, au-delà d'une certaine valeur de PTM, le flux devient indépendant de la pression et atteint une valeur maximale appelée flux limite  $J_{LIM}$ , représentée dans figure III.26 en fonction de la PTM appliquée.

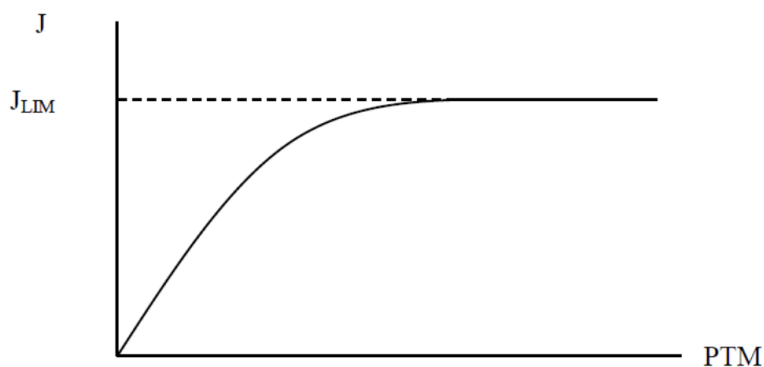


FIGURE III.26 – Evolution de  $J_{LIM}$  comme un effet du colmatage sur la variation du flux en fonction de PTM

Cela montre que la pression transmembranaire est un paramètre primordial à prendre en compte lors de considérations économiques, car le choix de sa valeur peut affecter le rapport entre l'énergie dépensée et la productivité.

La mesure de la résistance hydraulique avant et après l'essai d'ultrafiltration permet d'étudier l'effet du colmatage sur la membrane. La mesure de la résistance hydraulique finale caractérise l'état de la membrane vis-à-vis du transfert d'eau après ultrafiltration d'un fluide dans des conditions opératoires données. Ceci représente une manière de mesurer indirectement les modifications irréversibles générées par les substances non éliminées après le lavage de la membrane, entre deux utilisations.

### 3.3.3 Modes de filtration

Selon le type d'écoulement du procédé de filtration, deux modes de fonctionnement principaux existent : la filtration frontale et la filtration tangentielle.

#### 3.3.3.i Mode de fonctionnement frontal

Dans ce mode de fonctionnement, la solution à traiter est amenée perpendiculairement au média filtrant, tel que représentée sur la figure III.27. Une accumulation de matières se produit formant une couche qui augmente la résistance au transfert et, par conséquent, diminue le débit de filtration (MAUREL 1993). De ce fait, le système n'atteint jamais l'état stationnaire.

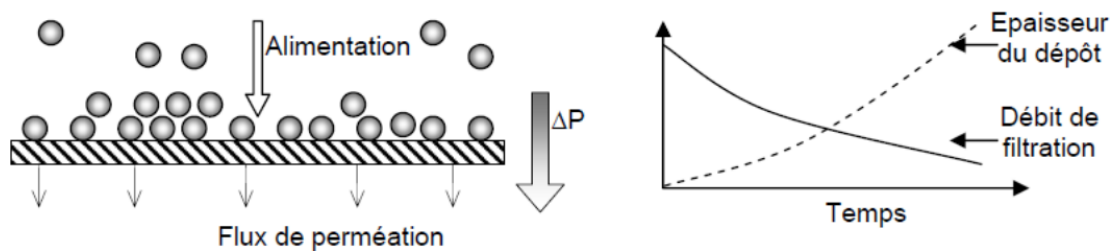


FIGURE III.27 – Représentation graphique du mode de filtration frontale  
(Source : ESPINASSE 2003)

La filtration en mode frontal est utilisée pour des applications où les solutions contiennent un faible taux de matière à traiter, comme par exemple les eaux de réseau ou dans le secteur médical.

#### 3.3.3.ii Mode de fonctionnement tangentiel

Dans ce mode de fonctionnement, l'écoulement du fluide à filtrer se fait en continu avec une circulation parallèle à la surface de la membrane comme cela est montré dans la figure III.28. L'objectif de l'écoulement tangentiel est d'éviter l'accumulation continue sur la membrane des espèces retenues par cette dernière. Toutefois, le flux de perméation du fluide (perpendiculaire à la surface de la membrane) permet que les espèces que l'on ne souhaite pas retenir, traversent la membrane.

Pour ce type de configuration le système atteint l'état stationnaire, une fois que la couche

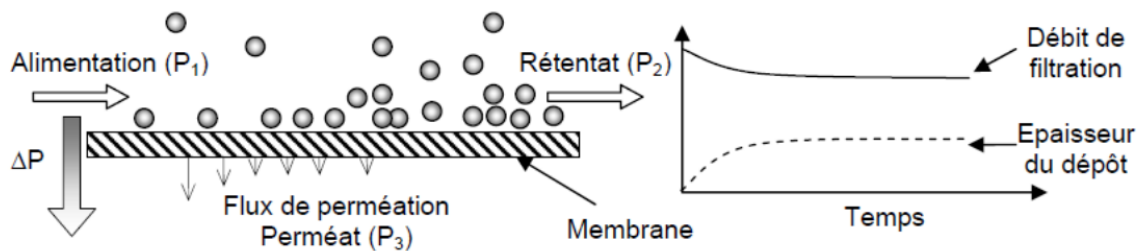


FIGURE III.28 – Représentation graphique du mode de filtration tangentielle  
(Source : ESPINASSE 2003)

de polarisation et le colmatage formés se stabilisent.

Le mode de fonctionnement tangentielle est couramment utilisé lorsque les solutions à traiter sont très chargées en solutés ou en matières en suspension.

### 3.3.4 Mode de configuration Diafiltration (DF)

La diafiltration (DF) est un mode de mise en œuvre du procédé de filtration, où la pression nécessaire à la séparation est exercée par une solution qui remplace dans le rétentat, le perméat qui passe à travers la membrane. Les caractéristiques de cette solution sont donc définies selon les objectifs de l'opération (eau pure, solution tampon, etc.).

Une analyse du bilan de matière établi durant la diafiltration permet de démontrer que quel que soit le mode de fonctionnement (frontal ou tangentielle) la concentration en espèces totalement retenues ne varie pas au cours du temps, alors que la concentration des espèces qui passent avec le perméat à travers la membrane diminue. Pour cette raison le procédé de diafiltration est assimilé à une extraction des molécules à travers la membrane qui permet la purification de la molécule retenue (AIMAR 2006).

Ainsi, les principaux paramètres qui peuvent influencer le comportement de l'ultrafiltration sont :

- le seuil de coupure de la membrane ;
- la PTM ;
- la concentration du soluté ;
- la vitesse de l'écoulement (dans le cas d'un écoulement tangentielle) ;
- la température.

## 3.4 Démarche expérimentale

Comme signalé précédemment, l'approche proposée dans cette étude consiste à poser les premières bases sur la problématique de la purification et du conditionnement d'une solution de Rubisco par ultrafiltration en mode de configuration de diafiltration. De ce fait, l'échelle de

travail choisie pour la réalisation des expériences est l'échelle laboratoire avec des dispositifs de cellule AMICON, (cellules AMICON à agitation, Merk-Millipore cf. 3.6.1.i de ce chapitre) de différentes capacités, adaptés au traitement de solutions de petits volumes (entre 10 et 400 mL).

Le mode de fonctionnement des cellules AMICON est un mode d'écoulement frontal, qui grâce au mécanisme d'agitation cherche à se rapprocher des conditions d'un écoulement tangentiel.

Le premier aspect abordé a été la sélection des membranes utilisées pour la réalisation des expériences, en prenant en compte comme principal critère de sélection la taille des pores de la membrane, ou plus précisément leur seuil de coupure, qui est en lien avec la sélectivité. Dans cette partie, deux seuils de coupure de membranes ont été testés : 100 et 300 kDa. Ensuite, les matériels et les protocoles utilisés, ainsi que les conditions opératoires pour les différentes expériences réalisées, sont présentés. Les expériences présentées dans un deuxième temps, ont été réalisées avec la membrane de 300 kDa. Enfin, les principaux résultats seront exposés et analysés afin d'identifier les premiers éléments de réponse et ses principales perspectives.

Les expériences ont été effectuées dans trois cellules de volumes différents : 10, 50 et 400 mL, correspondant aux faibles volumes de solution de Rubisco disponibles. Certaines de ces expériences n'ayant pas abouti à des résultats exploitables, elles ne seront donc pas présentées ici. L'utilisation de la cellule de 400 mL a été motivée par deux raisons : vérifier si le changement de volume avait une influence sur les résultats, et produire des quantités de protéine plus conséquentes, nécessaires pour la suite du projet.

### 3.5 Présélection des membranes

Les membranes en ultrafiltration sont classées principalement dans deux groupes selon le type de matériau qui les compose : les membranes minérales (ou inorganiques) et les membranes organiques.

Les membranes minérales sont utilisées généralement pour les séparations où interviennent des milieux agressifs ou non-aqueux, en raison de leur résistance mécanique, chimique et thermique (BACCHIN 2005), mais présentent l'inconvénient majeur d'une faible compacité (surface filtrante par rapport au volume occupé).

Les membranes organiques, quant à elles, sont fabriquées à base d'acétate de cellulose ou à partir de polymères de synthèse. La gamme de polymères disponibles permet d'avoir diverses applications ; en effet le matériau est choisi selon la problématique de la séparation donnée et les conditions de l'opération. Les types de conditionnement pour les membranes organiques sont très variés, la géométrie va de membranes planes à des modules spiralés permettant une compacité maximale du système. On trouve aussi des fibres creuses d'un diamètre d'environ 1 mm avec une couche active qui peut être à l'intérieur ou à l'extérieur (ESPINASSE 2003).

Les membranes organiques sont les plus utilisées malgré leurs résistances thermiques et

chimiques moins bonnes que celles des membranes inorganiques, car elles sont distinctement moins chères, ce qui leur permet l'accès à différents secteurs industriels et par conséquent d'augmenter le nombre d'applications (REMIGY et DESCLAUX 2007).

La sélection de la membrane se fait principalement par sa sélectivité. De façon générale la taille des pores doit être deux fois plus petite que l'espèce la plus petite à retenir. Ceci permet d'assurer la rétention de l'espèce, et en même temps de réduire l'obstruction de pores de la membrane due au colmatage en profondeur (BACCHIN 2005). Les autres facteurs à considérer sont les possibles interactions entre le matériau de la membrane et les différents solutés, les caractéristiques du fluide (pH, température) et le domaine d'application. Enfin, une évaluation économique du procédé doit déterminer que le coût de la membrane soit en accord avec la valeur ajoutée du produit final.

Compte tenu de la grande taille de la Rubisco (environ 560 kDa) et afin de favoriser la rétention de la molécule, la taille des pores des membranes sélectionnées se trouve dans la partie haute de la gamme pour les membranes utilisées en ultrafiltration (1 kDa à 300 kDa). Ainsi, les deux membranes sélectionnées sont une membrane à base de cellulose régénérée avec un seuil de coupure de 100 kDa (Membrane 1) et une deuxième membrane à base de PES de 300 kDa de seuil de coupure (Membrane 2).

Le tableau III.14 présente un résumé des principales caractéristiques des deux membranes étudiées (Membrane 1 et membrane 2). Le tableau III.15 présente les principaux avantages et inconvénients des deux membranes.

Tableau III.14 – Caractéristiques des membranes présélectionnées pour les expériences de diafiltration de la Rubisco (Source : AUDINOS 2000)

	Membrane 1	Membrane 2
Matériau	Cellulose régénérée (CR)	PES
Fabricant/Référence	Merk-Millipore/PLHK	Merk-Millipore/PBMK
Seuil de coupure (Dextran) (kDa)	100	300
Tenue en température (°C)	4 à 50	4 à 30 ou 40
pH	1 à 14	2 à 12
Pression maximale de travail conseillée (bar)	-	0,7

### 3.6 Expériences d'ultrafiltration/diafiltration à échelle laboratoire

Les différentes expériences ont été réalisées avec des solutions de Rubisco produites par l'étape de séparation chromatographique. Avant l'étape de diafiltration la solution est préfiltrée à l'aide d'un filtre de 0,45 µm.

Chaque expérience se déroule en deux étapes : (1) L'étape de caractérisation de la membrane afin de mesurer sa perméabilité initiale à l'eau pure et (2) L'étape de diafiltration de la solution contenant la Rubisco, afin de déterminer la sélectivité de la membrane et le flux de perméat (J) produit pour des conditions opératoires fixées, mais aussi pour purifier la protéine. Les deux étapes de l'expérience sont menées avec le même dispositif expérimental.

Tableau III.15 – Principaux avantages et inconvénients des membranes présélectionnées pour les expériences de diafiltration de la Rubisco (Source : REMIGY et DESCLAUX 2007)

	Cellulose et dérivés	Polyéthersulfone
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perméabilité élevée</li> <li>• Sélectivité élevée</li> <li>• Mise en œuvre assez aisée</li> <li>• Adsorption de protéines faibles (colmatage moindre)</li> <li>• Facilement disponible et bon marché</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bonne stabilité thermique et au pH</li> <li>• Résistance au chlore</li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensible à la température</li> <li>• Sensible au pH</li> <li>• Sensible au chlore</li> <li>• Sensible au compactage</li> <li>• Sensible aux micro-organismes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensible au compactage</li> <li>• Adsorption</li> </ul>

Tout d’abord un premier test a été réalisé sur chacune des deux membranes présélectionnées (100 et 300 kDa); par la suite les expériences ont été réalisées uniquement sur la membrane de 300 kDa. La justification du choix de la membrane est présentée dans la discussion de résultats de le paragraphe 3.6.2 de ce chapitre.

### 3.6.1 Matériels et méthodes

#### 3.6.1.i Dispositif expérimental : Description et aspects génériques

Toutes les expériences d’ultrafiltration ont été réalisées avec un dispositif expérimental composé d’une cellule de filtration agitée (Amicon, Merck Millipore), présentée sur le schéma de la figure III.29. Un réservoir pressurisé de 5 L (Sartorius, France) connecte la cellule au circuit d’air comprimé permettant d’appliquer des PTM constantes entre 0,1 et 2,5 bars. La masse du perméat est mesurée au cours du temps et suivie par une balance électronique (Sartorius 1500S, France), connectée à un système d’acquisition de données.

La cellule de filtration est composée d’un support qui maintient la membrane, des pièces de raccordement, d’un réservoir pour la solution à filtrer, d’un couvercle permettant l’entrée de la solution tampon et d’un agitateur magnétique (l’agitateur n’est pas en contact avec la membrane). L’agitation par barreau aimanté minimise la formation d’une couche de polarisation et la dénaturation de la protéine par cisaillement.

Pour les trois tailles de cellules AMICON utilisées (10 mL, 50 mL et 400 mL), les surfaces de membrane correspondantes sont précisées dans le tableau III.16.

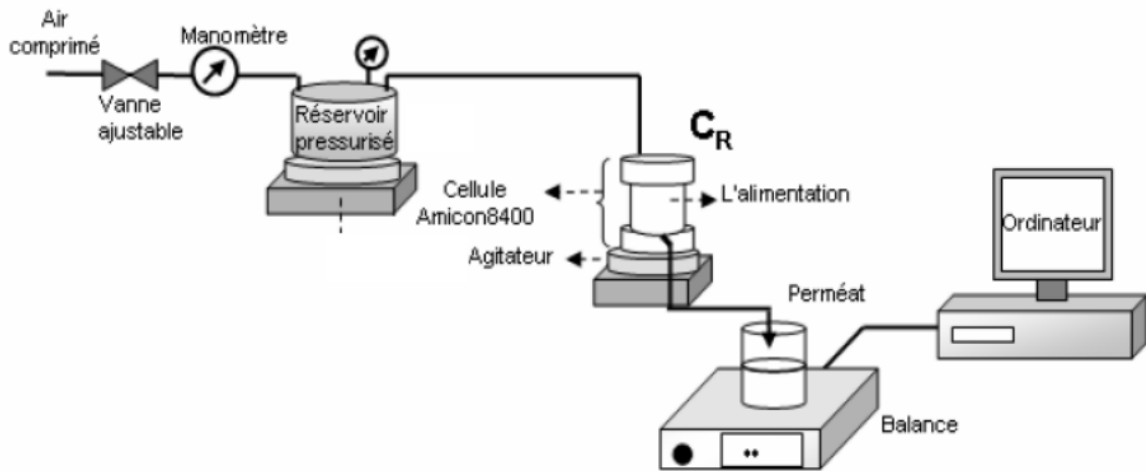


FIGURE III.29 – Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la diafiltration de la Rubisco dans une cellule AMICON. Source : MONNOT 2015

### 3.6.1.ii Caractérisation de la membrane : détermination expérimentale de la perméabilité à l'eau pure

Pour chaque expérience de diafiltration, une membrane neuve est déconditionnée et préparée pour l'étape de caractérisation. Pour cela, la membrane est rincée et laissée dans l'eau pendant une nuit à 4°C dans le but d'éliminer les restes de produits chimiques dans lesquels elle a été conditionnée et d'humidifier les pores.

Après installation de la membrane dans la cellule, le système est rempli avec de l'eau ultra pure grâce au réservoir, et une forte pression (au moins 0,1 bar supérieure à la PTM appliquée pour la diafiltration, (cf. tableau III.17)) est maintenue pendant 10 min afin de compacter la membrane et de bien humidifier les pores.

Afin de mesurer la perméabilité de la membrane à l'eau pure, des mesures de densité de flux ( $J$ ) sont effectuées en filtrant de l'eau ultra pure à des valeurs de PTM croissantes, puis décroissantes. Chaque valeur de pression est maintenue pendant au moins 5 minutes. Les valeurs de PTM vont de 0,1 à 0,7 bar.

Le flux instantané à l'eau est déterminé en mesurant la masse de perméat récupérée dans un espace de temps donné (fixé en secondes par le système d'acquisition), selon l'équation III.17.

$$J_{T^{\circ}C} = \frac{1}{\rho_{T^{\circ}C} \times S} \frac{\Delta m}{\Delta t} \quad (\text{III.17})$$



Avec  $J_{T^{\circ}C}$  : Flux de perméat à  $T^{\circ}C$  ( $L.h^{-1}.m^{-2}$ )

$\rho_{T^{\circ}C}$  : Masse volumique de l'eau à  $T^{\circ}C$  ( $g.L^{-1}$ )

$S$  : Surface active de filtration de la membrane ( $m^2$ )

$\Delta m$  : Masse de perméat recueilli (g) pendant un intervalle de temps  $\Delta t$  (h)

La perméabilité  $Lp_0$  ( $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ ) est déterminée par régression linéaire du flux (J) en fonction de la PTM (en passant par l'origine), tel que présenté dans la figure III.30.

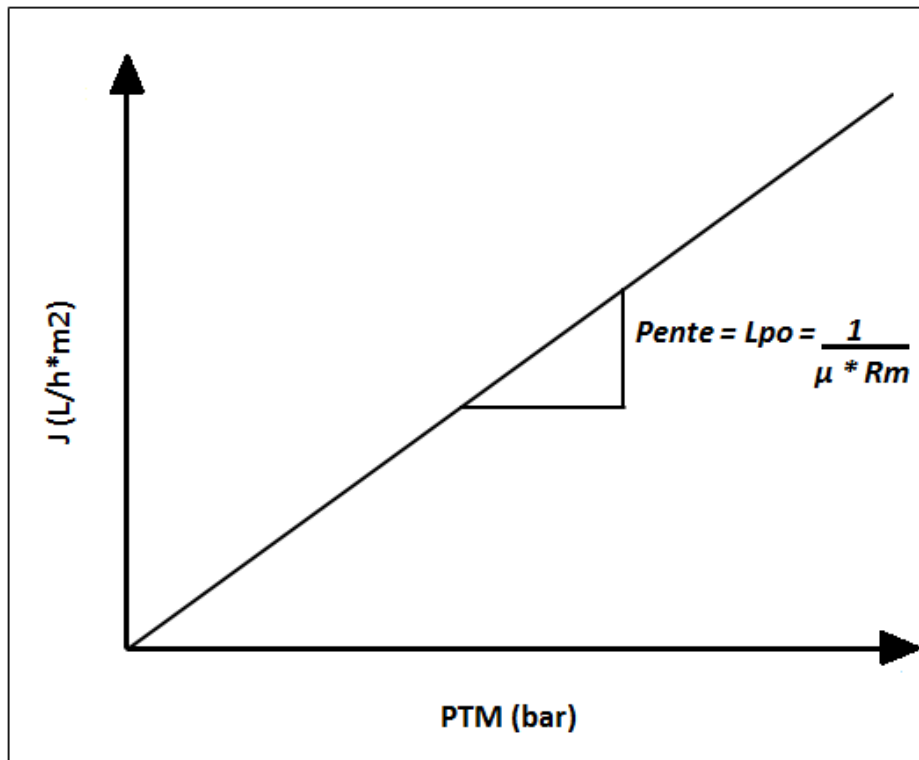


FIGURE III.30 – Flux de perméat (J) de l'eau pure en fonction de PTM

Pour obtenir des valeurs de perméabilité comparables, il est nécessaire d'exprimer la perméabilité pour une température donnée, par exemple à  $20^{\circ}C$  (équation III.18)

$$Lp_{20^{\circ}C} = \left( \frac{\mu_{T^{\circ}C}}{\mu_{20^{\circ}C}} \right) \times Lp_{T^{\circ}C} \quad (III.18)$$

La viscosité de l'eau ultra pure à  $T^{\circ}C$  est calculée par la relation III.19 :

$$\mu_{T^{\circ}C} = \mu_{20^{\circ}C} \times \exp \left( 3,056 \left( \frac{20 - T^{\circ}C}{T^{\circ}C + 105} \right) \right) \quad (III.19)$$

Avec  $\mu_{T^{\circ}C}$  : Viscosité de l'eau ultrapure à T°C

$\mu_{20^{\circ}C}$  : Viscosité de l'eau ultrapure à 20°C (= 1,02 cP)

### 3.6.1.iii Détermination de la densité de flux (J) et de la perméabilité (Lp) pour des solutions de Rubisco à PTM constante

Au total, quatorze essais ont été réalisés avec des solutions de Rubisco issues de l'étape de séparation chromatographique. La notation associée aux essais correspond au numéro de l'essai et à la taille de la cellule utilisée. Ainsi, nous identifions de 1\_10 à 8\_10 les essais réalisés dans la cellule de 10 mL de volume, de 1\_50 à 3\_50 les essais réalisés dans la cellule de 50 mL de volume et de 1\_400 à 3\_400 les essais réalisés dans la cellule de 400 mL. Le protocole expérimental commun à tous les essais et les conditions opératoires appliquées pour chaque essai sont présentés.

Tableau III.16 – Caractéristiques des cellules AMICON utilisées pour le dessalement et la purification des solutions de Rubisco par ultrafiltration-diafiltration

Volume cellule* (mL)	Diamètre de la membrane (mm)	Surface de membrane efficace (cm <sup>2</sup> )	Volume total** (mL)
10	25,0	4,1	12,5
50	44,5	13,4	85,0
400	76,0	41,8	430,0

\*Volume correspondant au réservoir de la cellule. \*\*Volume équivalent au remplissage total de la cellule (volume du réservoir plus couvercle)

Pour chaque expérience, la solution de Rubisco a été tout d'abord analysée par HPLC-SEC afin de déterminer sa teneur en Rubisco initiale. Cette analyse permet aussi de connaître le profil global HPLC-SEC de l'échantillon, caractérisé par la présence d'autres pics associés aux composés que l'on souhaite éliminer. Une comparaison des profils chromatographiques de la solution initiale et des prélèvements de perméat, réalisés tout au long de l'expérience, permet de suivre l'expérience et de vérifier la sélectivité de la membrane. De plus, le rétentat obtenu à la fin de l'expérience a été aussi analysé par HPLC-SEC.

Des mesures de pH et de conductivité ont été réalisées sur le rétentat obtenu à la fin de l'opération, afin de vérifier que les caractéristiques de la solution finale correspondent à celle de la solution tampon utilisée pour la diafiltration.

Toutes les expériences de diafiltration ici présentées, ont été réalisées à pression constante. Pour cela, la cellule est remplie complètement (volume total) avec la solution de Rubisco. Un volume d'environ 4 L de solution tampon phosphate 50 mmol/L à pH 7,5 est placé dans le réservoir d'alimentation et sa température est mesurée. Une fois le montage effectué, la cellule est mise en agitation et la valeur de PTM souhaitée est appliquée et maintenue constante tout au long de la filtration.

La masse de perméat récupérée est suivie par le système d'acquisition durant toute la durée de la filtration. Le flux instantané de la solution filtrée est calculé avec l'équation III.17, en prenant comme valeur de la masse volumique de la solution, celle de l'eau pure à la température de travail.

Une fraction de 0,5 mL du perméat est prélevée au tout début de la filtration, puis toutes les heures afin d'être analysées par HPLC-SEC. La filtration est arrêtée lorsque l'analyse des prélèvements du perméat indique qu'il n'y a plus d'espèces transmises dans le perméat.

La solution contenue dans la cellule est récupérée et une petite fraction est utilisée pour analyse. La conservation de la solution se fait à une température de 4°C.

Les conditions opératoires en termes de volume de la cellule, de pression transmembranaire appliquée et de concentration en Rubisco de la solution traitée, pour les quatorze expériences réalisées, sont présentées dans le tableau III.17. Toutes les expériences ont été réalisées dans un intervalle de température de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Seule l'expérience 1\_10 a été réalisée avec la membrane de 100 kDa, les autres expériences ont été réalisées avec la membrane de 300 kDa. Pour toutes les expériences la vitesse d'agitation a été fixée à la valeur maximale donnée par l'équipement de travail, c'est-à-dire 1200 rpm.

Tableau III.17 – Résumé des conditions opératoires pour les expériences de diafiltration des solutions de Rubisco, réalisées dans des cellules AMICON

Volume Cellule (mL)	Essai	PTM (bar)	Conc. Rubisco solution initiale (g/L)
10	1_10*	0,7	1,0
	2_10	0,7	7,9
	3_10	0,7	1,0
	4_10	0,5	1,3
	5_10	0,9	0,9
	6_10	0,7	16,0
	7_10	0,7	20,0
	8_10	0,7	20,0
50	1_50	0,7	0,6
	2_50	0,5	1,4
	3_50	0,9	1,1
400	1_400	0,7	7,7
	2_400	0,7	10,5
	3_400	0,7	16,5

\* Expérience réalisée avec la membrane en AC de 100 kD de taille de pores. Les autres expériences sont réalisées avec la membrane en PES de 300 kDa.

### 3.6.2 Résultats et discussion

#### 3.6.2.i Caractérisation des membranes : Détermination de la perméabilité à l'eau pure

Le tableau III.18 présente un résumé des différentes valeurs de perméabilité à l'eau pure (L<sub>po</sub>) obtenues pour les deux types de membranes utilisées. Pour le cas de la membrane de 300 kDa de seuil de coupure, une valeur de L<sub>po</sub> est calculée pour chaque taille de cellule utilisée, ces valeurs ont été calculées comme les moyennes de toutes les expériences réalisées avec la même taille de cellule.

Tableau III.18 – Valeurs de perméabilité à l'eau pure à 20°C

Seuil de coupure de la membrane (kDa)/Matériau	Taille cellule (mL) / surface effective de la membrane (cm <sup>2</sup> )	L <sub>po</sub> à l'eau pure à 20°C (L.bar-1.h-1.m <sup>-2</sup> )	L <sub>po</sub> à l'eau pure Référence (L.bar-1.h-1.m <sup>-2</sup> )
100 /Acétate de cellulose	10 /4,1	261,0	230 + 30 <sup>(a)</sup>
300 /PES	10 /4,1	1234,8 ± 112,1 (n=6)	1700 <sup>(b)</sup>
	50 /13,4	1114,2 ± 94,3 (n=4)	
	400 /41,8	1939,7 ± 200,6 (n=4)	

(a) BESSIERE 2005 ; (b) MONNOT 2015

Pour la membrane en acétate de cellulose et un seuil de coupure de 100 kDa une seule mesure a été réalisée donnant une valeur de perméabilité de 261 L/h.m<sup>2</sup>.bar, d'autres mesures seront nécessaires afin de confirmer cette valeur. Toutefois, BESSIERE (2005) a obtenu une valeur identique lors de la caractérisation d'une membrane (fibres creuses) du même matériau et seuil de coupure, utilisée dans une installation pilote pour la purification de l'eau potable en mode de fonctionnement frontal.

Dans le cas de la membrane de 300 kDa, des valeurs de L<sub>po</sub> très proches sont obtenues avec les cellules de 10 et 50 mL (1235 et 1114 L.bar<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>2</sup> respectivement), tandis que pour la cellule de 400 mL la valeur de L<sub>po</sub> obtenue est presque le double (1939 L.bar<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>2</sup>). Pour les trois tailles de cellule, l'incertitude de la mesure (incertitude type A) est d'environ 10% de la valeur mesurée. Une valeur du même ordre de grandeur est obtenue par MONNOT (2015), avec une membrane de mêmes caractéristiques, utilisée dans le même type de dispositif que celui employé pour ces expériences. Une comparaison des différentes valeurs obtenues et la valeur trouvée dans la littérature (MONNOT 2015) permettrait d'affirmer que pour cette membrane la détermination de la perméabilité à l'eau est peu répétable, avec des valeurs se situant entre 1000 et 2000 L.bar<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.m<sup>2</sup>. Cette très grande variabilité observée sur la valeur de perméabilité initiale à l'eau de la membrane de 300 kDa peut être à l'origine d'écarts importants de comportement, d'un échantillon de membrane à l'autre, en termes de flux de perméat, mais aussi de sélectivité de la membrane.

### 3.6.2.ii Résultats de diafiltration de la Rubisco en mode frontal

Les résultats de différentes expériences réalisées sont présentés et discutés selon deux aspects principaux : la sélectivité des membranes d'ultrafiltration utilisées, et la productivité espérée du procédé, indiquée par les flux de perméat obtenus lors des essais.

**3.6.2.ii.a Étude de la sélectivité des membranes utilisées** Tout d'abord, une analyse qualitative des résultats sera présentée et discutée à l'aide des analyses HPLC-SEC des différents échantillons prélevés lors de la réalisation des expériences. Dans un second temps, les taux de rétention et les taux de pertes déterminés expérimentalement seront présentés et discutés.

Comme précisé par ailleurs, pour toutes les expériences, la concentration en Rubisco du perméat a été suivie, en réalisant des petits prélèvements (environ 0,5 mL) de manière régulière, dans le but de vérifier que la Rubisco ne se filtrait pas. Ce suivi a permis de constater que, pour toutes les expériences réalisées, une fraction de Rubisco sortait dans le perméat uniquement au début de l'expérience, et qu'à partir d'un certain temps (de courte durée par rapport à la durée des expériences, entre 15 et 30 minutes) la protéine était complètement retenue par la membrane.

La figure III.31 montre un exemple du suivi du perméat réalisé par analyse HPLC-SEC des différents prélèvements effectués pour l'expérience 2\_10. Afin de pouvoir comparer toutes les expériences, sans tenir compte de la taille de la cellule, le suivi de l'opération de filtration est réalisé non pas en temps ou en volume filtré, mais en nombre de volumes de cellule passés dans le perméat (nombre de fois que le volume de la cellule est renouvelé avec la solution tampon alimentée). Ainsi pour la figure III.31, les chromatogrammes présentés correspondent à des prélèvements effectués lorsque le volume de perméat filtré était égal à 0,2 – 0,5 – 1,2 – 2,3 – 3 fois le volume de la cellule Amicon (Vcel).

Dans la figure III.31 on observe la présence du pic de la Rubisco (9,05 mL) lors de l'analyse de la solution initiale (alimentation) et en proportion moindre dans le profil du prélèvement réalisé à 0,2 volumes de cellule (premier prélèvement analysé). On observe donc la perte d'une petite quantité de Rubisco dans le premier échantillon de perméat, qui s'arrête par la suite.

On observe aussi pour tous les prélèvements et pour la solution initiale la présence des différents pics (élus à partir de 11,0 mL) associés aux composés que l'on souhaite éliminer et dont les valeurs de masses molaires sont estimées égales ou inférieures à 50 kDa. Ces pics se trouvent en proportion plus importante dans les premiers prélèvements, diminuent progressivement, jusqu'à pratiquement ne plus être détectés (prélèvement effectué à 3 volumes de cellule passés). Ce suivi a permis de déterminer à quel moment tous les composés que l'on souhaitait éliminer n'étaient plus présents dans la cellule.

Dans les figures III.32, III.33, III.34, III.35, III.36 sont présentés les chromatogrammes obtenus par analyse HPLC-SEC des rétentats pour les expériences 1\_10, 2\_10, 6\_10, 7\_10 et 3\_400. Ces profils sont comparés à ceux des solutions initiales et du premier prélèvement

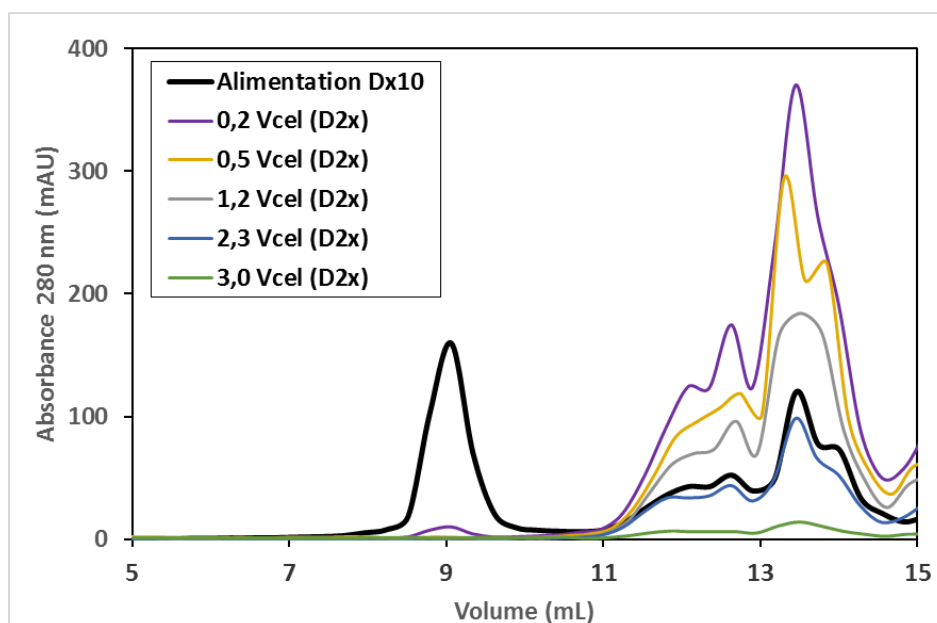


FIGURE III.31 – Chromatogrammes de la solution de Rubisco initiale et des différents prélèvements du perméat obtenu lors de l'expérience 2\_10. Chaque prélèvement est associé à un nombre de volumes de cellule (Nb Vcel =  $V_{\text{perméat}} / V_{\text{cellule}}$ )

de perméat effectué pour chaque essai.

D'après la figure III.32 pour l'expérience 1\_10, la seule réalisée avec une membrane de 100 kDa, des pics associés aux composés indésirables sont encore présents dans le profil du rétentat après avoir passé l'équivalent de 4 volumes de cellule du perméat. La courbe du premier prélèvement ne montre pas, par contre, de pic de Rubisco ce qui voudrait dire que la protéine a été bien retenue dans la cellule. En effet, les pics de Rubisco dans l'alimentation et dans le rétentat final sont parfaitement superposés.

Pour l'expérience 2\_10, déjà analysée dans la figure III.31, le profil du rétentat analysé par HPLC-SEC (figure III.33) montre uniquement le pic de la Rubisco.

Les figures III.34, III.35, III.36 présentent les profils chromatographiques pour les expériences 6\_10, 7\_10 et 3\_400, réalisées avec des solutions de Rubisco de concentration initiale 16,0; 20,0 et 16,5 g/L respectivement. Dans les chromatogrammes des rétentats des trois expériences seul le pic de Rubisco est détecté. Par contre, pour les deux expériences réalisées dans la cellule de 10 mL, une différence d'intensité de signal non négligeable est observée entre les pics de Rubisco des rétentats et des solutions initiales. Au contraire, dans l'expérience réalisée dans la cellule de 400 mL, les deux pics se superposent, indiquant que les teneurs en Rubisco au début et à la fin de la filtration sont très proches.

Une fois l'analyse qualitative effectuée, la caractérisation des membranes nécessite de déterminer le Taux de rétention (TR) et le Taux de perte (TP) de la molécule que l'on

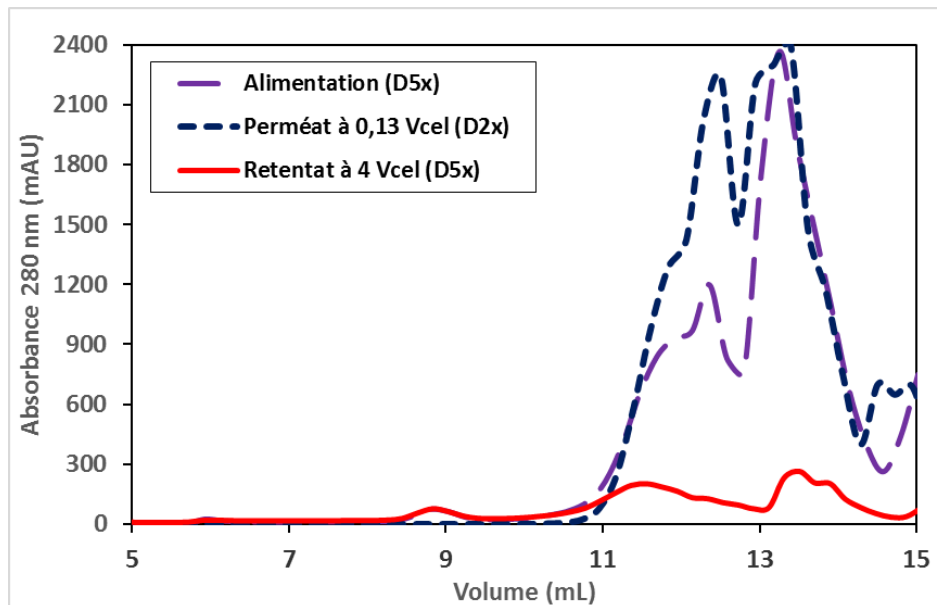


FIGURE III.32 – Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 1\_10

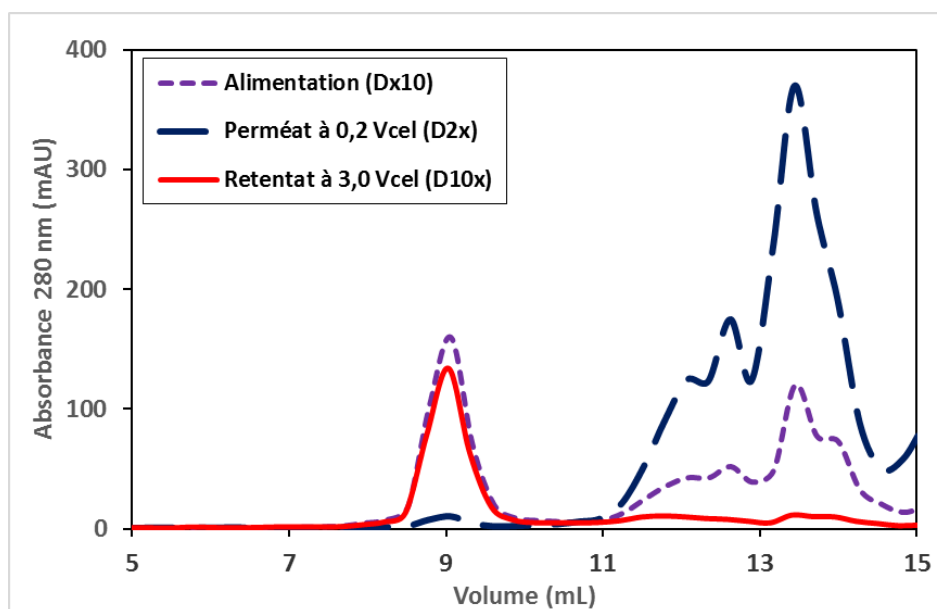


FIGURE III.33 – Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 2\_10

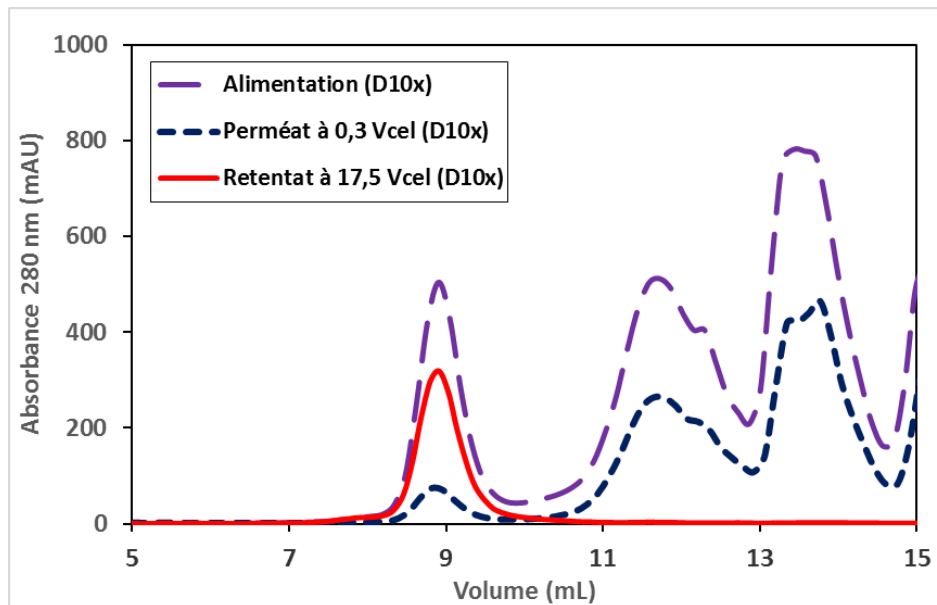


FIGURE III.34 – Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 6\_10

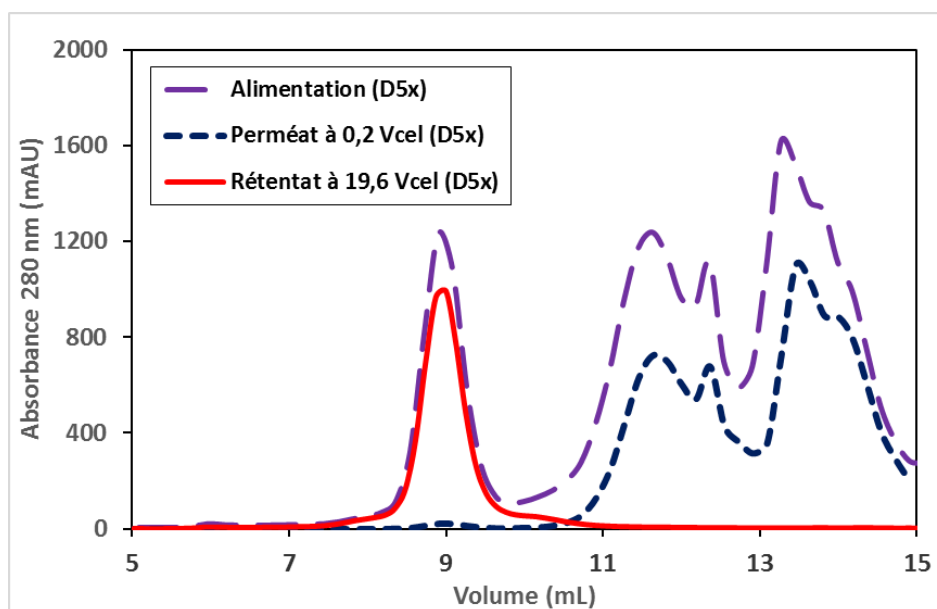


FIGURE III.35 – Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 7\_10



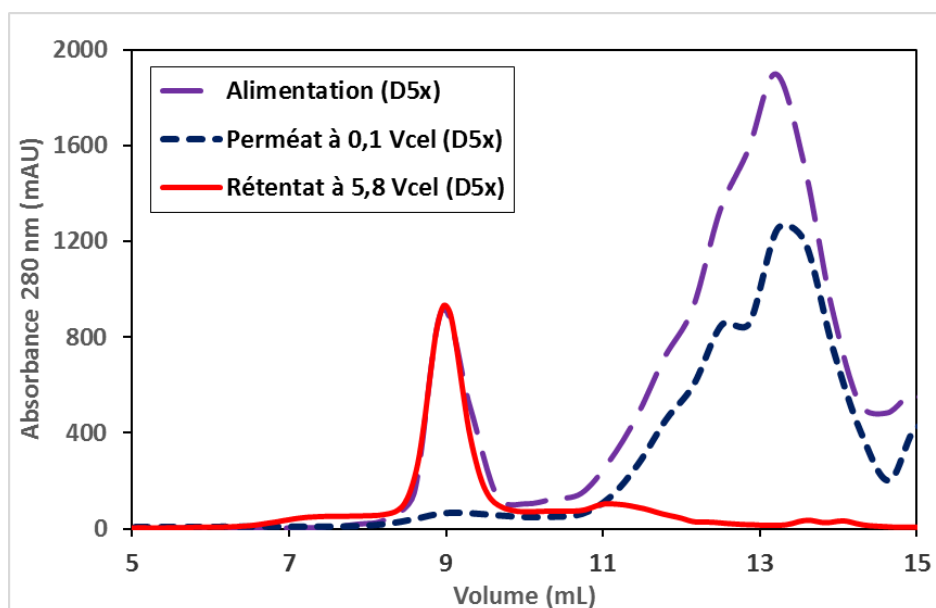


FIGURE III.36 – Chromatogrammes obtenus par HPLC-SEC de la solution de Rubisco initiale, du premier prélèvement du perméat et du rétentat obtenu à la fin de la filtration pour l'expérience 3\_400

souhaite retenir.

De par sa définition, le calcul du TR implique de déterminer simultanément les valeurs de concentration du soluté dans le rétentat et le perméat durant la séparation. Comme montré dans l'analyse qualitative, la concentration de Rubisco dans le rétentat n'a été mesurée qu'à la fin de l'expérience, et pas du tout suivie tout au long de l'expérience. De ce fait, il n'a pas été possible de déterminer le taux de rétention de la Rubisco par la membrane au cours de la filtration et seule une valeur finale peut être proposée. Dans tous les cas, la concentration en Rubisco dans le perméat étant proche de 0, le taux de rétention en fin de filtration est toujours proche de 100%.

En ce qui concerne le taux de perte, le bilan de matière de la Rubisco a été fait par rapport à la différence entre la quantité de Rubisco initiale et finale dans la cellule. Ainsi, un taux de perte a été calculé, à partir de l'équation III.31 (cf. grandeurs caractéristiques).

Pour toutes les expériences de diafiltration, les valeurs de concentration de Rubisco initiales et finales, ainsi que le taux de perte associé sont présentés dans le tableau III.19.

Le tableau III.19 montre des valeurs de taux de perte allant de 2 à 32%. Le plus faible taux de perte (2%) est obtenu pour l'expérience 1\_10 avec la membrane de 100 kDa de seuil de coupure. Ce résultat semble cohérent du fait que le rapport entre la taille de la molécule (560 kDa) et la taille de pores de la membrane est plus élevé que pour la deuxième membrane.

Une comparaison des expériences réalisées à différentes valeurs de PTM, ayant des concentrations initiales voisines de 1 g/L, montre des taux de pertes relativement proches et infé-

Tableau III.19 – Concentrations en Rubisco initiales (Co) et finales (CR) et taux de perte (TP)

Expérience	Co (g/L)	CR (g/L)	TP (%)
1_10*	1,0	0,9	2,0
2_10	7,9	7,2	8,3
3_10	1,0	0,9	5,0
4_10	1,3	1,2	7,7
5_10	0,9	0,7	22,2
6_10	16,0	11,0	31,2
7_10	20,0	16,7	16,5
8_10	20,0	16	20,0
1_50	0,8	0,7	12,5
2_50	1,4	1,2	12,1
3_50	1,1	0,7	31,8
1_400	7,0	6,5	7,7
2_400	10,5	9,5	9,4
3_400	16,5	15,4	6,4

\*Expérience réalisée avec une membrane de 100 kDa de seuil de coupure.

rieures à 12,5% pour les expériences réalisées à 0,5 (expériences 4\_10 et 2\_50) et 0,7 bar (expérience 3\_10 et 1\_50). En revanche, des valeurs de taux de perte beaucoup plus importantes, de 22 et 32%, sont obtenues lorsque la PTM appliquée est de 0,9 bar (expériences 5\_10 et 3\_50). Ceci permet de confirmer que le fait de travailler à une valeur de PTM égale à la pression maximale (0,7 bar) n'implique pas une augmentation de taux de perte, cependant cette valeur limite doit être respectée afin de s'assurer du bon fonctionnement de la membrane et de maintenir sa sélectivité.

Concernant l'effet de la concentration, les expériences 6\_10, 7\_10 et 8\_10 réalisées avec des solutions de concentration élevées (de 16 à 20 g/L), à même pression transmembranaire (0,7 bar), donnent des taux de perte élevés (entre 16 et 32%), avec la cellule de 10 mL. Ces taux de perte élevés avec des solutions concentrées pourraient s'expliquer par des phénomènes d'adsorption de la molécule de Rubisco sur le matériau membranaire. Cependant l'expérience 3\_400, qui a été faite aussi avec une solution de concentration élevée (16,5 g/L), à 0,7 bar, mais dans la cellule de 400 mL, donne un taux de perte plus faible (6,4%).

Ces essais préliminaires ne permettent pas de conclure de façon certaine sur les phénomènes mis en jeu. En effet, concernant le phénomène d'adsorption de la Rubisco sur le matériau membranaire, il aurait été intéressant d'immerger d'abord la membrane un certain temps dans la solution, en l'absence de filtration, et de vérifier si la concentration de la protéine en solution diminuait. Cette étude pourra faire l'objet d'un futur travail afin de mieux comprendre les pertes en Rubisco observées pour certaines expérimentations.

De plus, comme dit précédemment, la très grande variabilité des échantillons de membrane

étudiés (variabilité observée sur les mesures de perméabilité à l'eau) peut aussi expliquer en partie certains écarts obtenus dans le taux de perte. Par exemple, les expériences 6\_10 et 7\_10, menées dans la même cellule, à même pression transmembranaire, et à des concentrations très proches, donnent des valeurs de taux de perte très différentes (31% pour l'essai 6\_10 à 16 g/L et 16% pour l'essai 7\_10 à 20g/L).

En conclusion, les résultats quantitatifs présentés ici nécessitent d'être répétés, et approfondis afin de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. Cependant, ils ont permis de démontrer l'intérêt et la pertinence de l'ultrafiltration/diafiltration pour la purification des solutions de Rubisco.

**3.6.2.ii.b Détermination de la densité de flux (J) et de la perméabilité (Lp) pour des solutions de Rubisco à PTM constante** Pour chacune des expériences, la courbe de densité de flux (J) en fonction du volume de perméat à pression constante a été tracée. La perméabilité Lp pour chacune des solutions traitées est déterminée à partir de la valeur moyenne du flux (J) ramené à 20°C et de la valeur de PTM appliquée. Les valeurs de densité de flux (J) moyenne et de perméabilités calculées pour les quatorze expériences sont résumées dans le tableau III.20. La figure III.37 présente les courbes de  $J=f(V)$  pour les expériences 1\_10 et 3\_10.

Tableau III.20 – Densités de flux (J) en  $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$  et perméabilité Lp, ramenées à 20°C pour les quatorze expériences de diafiltration de la Rubisco, réalisées en mode frontal.

Expérience	J à 20°C (L/h.m2)	Lp à 20°C (L/h.m2.bar)
1_10*	24,2	34,6
2_10	12,8	18,2
3_10	52,8	75,4
4_10	47,6	95,3
5_10	62,5	69,5
6_10	27,6	39,5
7_10	61,6	88,0
8_10	66,5	95,0
1_50	30,0	42,8
2_50	27,8	55,6
3_50	33,7	37,5
1_400	22,9	32,7
2_400	12,9	18,5
3_400	13,7	19,5

Les courbes obtenues pour les expériences 1\_10 et 3\_10 montrent que pour les 2 types de membranes, la densité de flux (J) décroît très rapidement au début de la filtration mais à partir d'un certain volume de perméat passé, elle se maintient constante. Ce comportement de l'écoulement est plus proche d'un écoulement tangentiel que d'un écoulement frontal. En effet, il semblerait que le fait de travailler avec une agitation permanente dans la cellule, favorise une

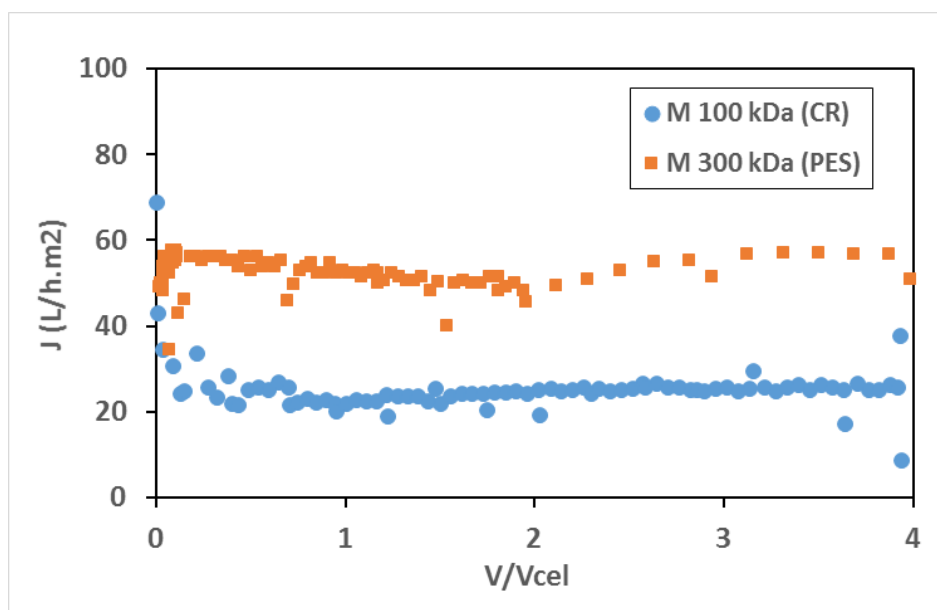


FIGURE III.37 – Variation du flux en fonction du nombre de  $V_{cel}$  de perméat passés, pour des expériences réalisées avec deux membranes différentes (PTM = 0,7 bar)

diminution de l'épaisseur de la couche de polarisation et du dépôt de particules en suspension qui peuvent encore être présentes dans la solution, conditions de fonctionnement proches du mode tangentiel, puisque un cisaillement est produit sur la membrane.

Dans le cas de l'expérience avec la membrane de seuil de coupure de 100 kDa on observe que le flux ( $J$ ) est deux fois plus faible que pour l'expérience réalisée avec la membrane de 300 kDa, pour la filtration d'une solution de même concentration initiale (1 g/L). Ce résultat est tout à fait cohérent avec les valeurs de perméabilité de la membrane présentées dans le tableau III.18.

Malgré un taux de perte très faible, la membrane de 100 kDa ne permet pas de séparer complètement les composés que l'on souhaite éliminer de la solution de Rubisco, comme cela a été montré dans la figure III.32. De plus elle présente des valeurs de flux plus faibles (même avec des solutions de faible concentration en Rubisco). Pour ces raisons, la membrane de 100 kDa n'a pas été retenue. Ainsi, la suite des expériences sera menée exclusivement avec la membrane de 300 kDa. Elles avaient pour objectif d'évaluer l'effet de la PTM et de la concentration initiale sur la densité de flux, présentées par la suite.

### Effet PTM sur $J$

La figure III.38 montre la variation de la densité de flux en fonction du nombre de  $V_{cel}$  de perméat passés, obtenues à 3 valeurs de PTM, pour des expériences réalisées dans les cellules de 10 mL (A) et de 50 mL (B).

Pour toutes les expériences, à partir d'un certain volume de perméat passé, la valeur de  $J$

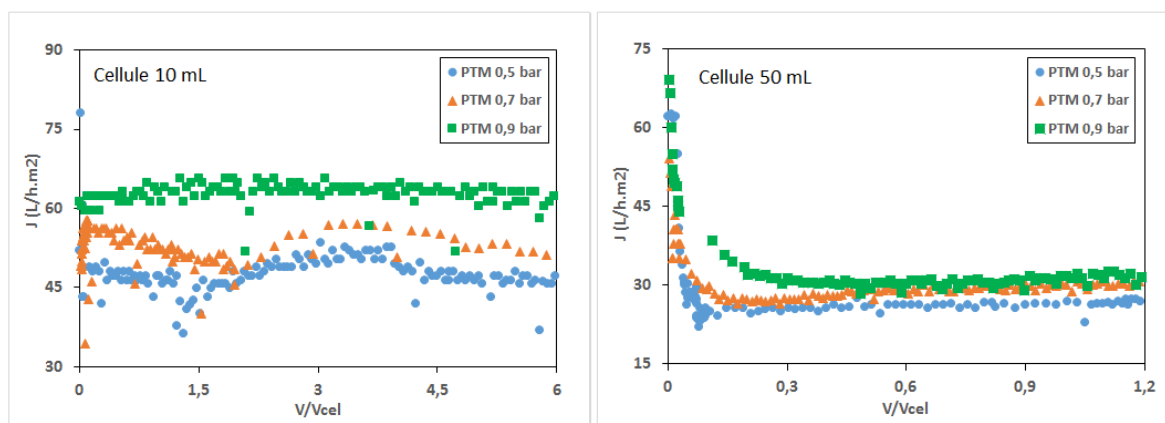


FIGURE III.38 – Variation de la densité de flux en fonction du nombre de  $V_{cel}$  de perméat passés, pour des expériences réalisées à des valeurs de PTM différentes. (A) Expériences en cellule de 10 mL. (B) Expériences en cellule de 50 mL.

se maintient constante (mise en place d'un état stationnaire). Le phénomène est plus visible pour les expériences réalisées dans la cellule de 50 mL. Pour la cellule de 10 mL la valeur de  $J$  fluctue dans le temps mais on n'observe pas de tendance décroissante. Comme attendu, un effet de la pression transmembranaire sur le flux de perméat est observé, avec des valeurs de flux d'autant plus grandes que la PTM est élevée.

La figure III.39 présente la variation de la densité de flux (valeurs moyennes) en fonction de la pression transmembranaire pour des expériences réalisées dans deux cellules différentes (10 et 50 mL) pour des solutions de Rubisco à des concentrations comprises entre 0,8 et 1,4 g/L. A titre d'exemple, les valeurs obtenues sont comparées aux valeurs données par TADDEI et al. (1986) pour l'ultrafiltration des protéines du lait (la  $\beta$ -lactoglobuline de MW de 36 kDa et l' $\alpha$ -lactalbumine de MW de 14 kDa) réalisée à des pressions transmembranaires similaires (1 bar), pour une teneur en protéine de 6 g/L, en filtration tangentielle avec une membrane minérale de seuil de coupure de 40 kDa.

La variation de  $J$  en fonction de PTM montre que, pour les deux types de cellules, l'apparition d'une valeur limite ( $J_{lim}$ ) n'a pas été observée. Etant donné que les valeurs de pression maximale ont été dépassées, la valeur de PTM ne peut pas être augmentée. Ainsi, pour déterminer éventuellement un  $J_{lim}$ , il serait nécessaire de réaliser les mêmes expériences avec des solutions de concentration plus élevées.

### Effet de la concentration initiale de la solution

La figure III.40 montre la variation de la densité de flux en fonction du nombre de  $V_{cel}$  de perméat passés, obtenues avec différentes concentrations de Rubisco dans la solution traitée.

Sur les courbes de la figure III.40 on observe encore une fois que la densité de flux se stabilise au cours du temps, même quand des solutions de concentrations élevées de Rubisco sont traitées.

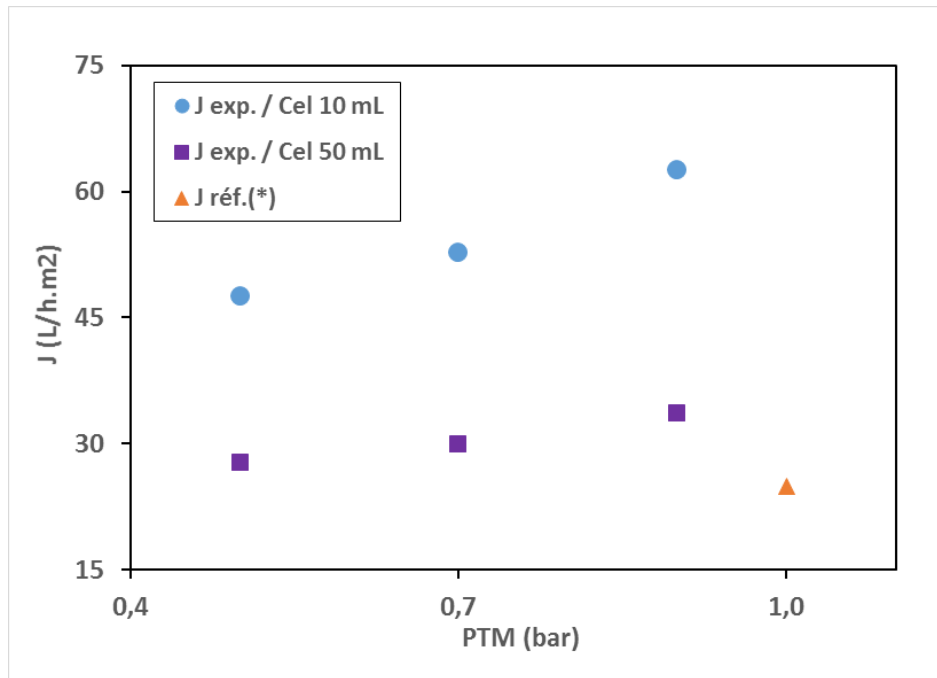


FIGURE III.39 – Effet de variation de la PTM sur la densité de flux (J). (\*)TADDEI et al. 1986

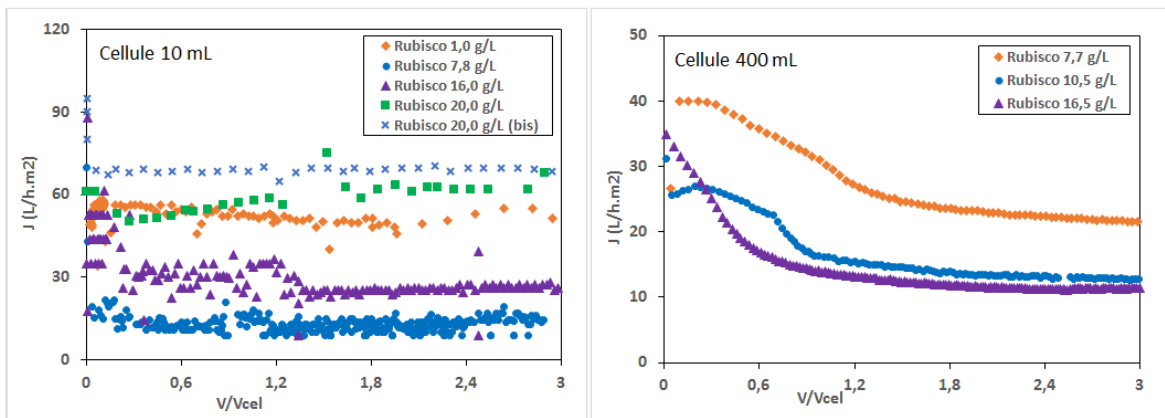


FIGURE III.40 – Variation de la densité de flux en fonction du nombre de Vcel de perméat passés, pour des expériences réalisées avec des solutions de Rubisco de différentes concentrations. (A) Expériences en cellule de 10 mL. (B) Expériences en cellule de 400 mL (PTM = 0,7 bar)

Dans le cas de la cellule de 400 mL, on observe une décroissance de la densité de flux puis une stabilisation à des valeurs cohérentes avec les valeurs de concentration. En effet, un flux plus faible est obtenu lorsque la concentration en protéine augmente, ce qui traduit certainement la mise en place d'un dépôt d'autant plus important que la concentration est élevée.

Dans le cas de la cellule de 10 mL, les résultats ne suivent pas cette logique. Les valeurs de flux obtenues avec des solutions de 20 g/L sont proches de celle de l'expérience avec une solution de 1 g/L, alors que pour les solutions de concentration « intermédiaire » (de 7,8 et 16 g/L) les valeurs de flux sont faibles. Ces écarts pourraient trouver une explication dans la variabilité des échantillons de membrane, comme déjà évoqué précédemment, puisque des valeurs de perméabilité initiale à l'eau différant d'un facteur 2 se traduisent ensuite par des valeurs de flux du même écart, à même pression appliquée.

Encore une fois, ces résultats préliminaires nécessitent des études plus poussées, en particulier en faisant le lien entre perméabilité initiale de la membrane, taux de perte obtenu et flux de perméat observé. Notamment, il serait intéressant d'identifier les phénomènes limitants mis en jeu et de procéder à une mesure de perméabilité à l'eau de la membrane en fin de filtration. En effet, cela permettrait de vérifier la réversibilité de la chute de flux observée, et de conclure quant à la présence d'une polarisation de concentration (phénomène réversible) ou d'un colmatage (phénomène irréversible par simple arrêt de la filtration). Cependant les premiers résultats obtenus conduisent à des résultats tout à fait acceptables pour envisager un procédé industriel.

### 3.7 Conclusion

Une étude préliminaire sur l'ultrafiltration en mode diafiltration a été réalisée sur des solutions de Rubisco issues du procédé chromatographique. Deux objectifs ont été recherchés : proposer un procédé permettant de déplacer le sel présent dans les solutions et de réduire sa concentration, sans diluer la Rubisco, et progresser dans la purification de la protéine. Des expériences de filtration frontale en cellule agitée ont été réalisées avec deux membranes de seuil de coupure différent, au préalable caractérisées sur la base de leur taux de rétention et de perte.

Les résultats ont été assez différents pour les deux membranes : lorsque la taille de pore est plus faible (100 kDa), la purification des solutions n'est pas complète mais le taux de perte de la Rubisco est très faible. A contrario, la membrane avec la taille de pore la plus élevée (300 kDa) permet une totale élimination des composés indésirables mais présente des taux de pertes plus irrégulières et élevées pour la Rubisco. Ce dernier résultat est peut-être à mettre en parallèle avec les valeurs irrégulières déterminées de la perméabilité de la membrane à l'eau, mais il pourrait y avoir aussi d'autres phénomènes non évalués. Cette dernière membrane est retenue pour une étude préliminaire visant à déterminer la productivité qui pourrait être obtenue.

Pour cela, la densité de flux obtenue dans les cellules a été étudiée en fonction de la

pression transmembranaire utilisée et la concentration initiale des solutions de Rubisco. Les résultats obtenus sont cohérents avec d'autres systèmes similaires décrits dans la littérature, sans que l'on puisse encore déterminer l'origine des limitations. Ainsi, l'ultrafiltration en mode diafiltration paraît un procédé tout à fait adapté au traitement des solutions de Rubisco car des résultats intéressants en termes de pureté et de production ont été atteints. Cependant, des travaux sont encore nécessaires afin de mieux comprendre le comportement du système pour une optimisation et un changement d'échelle.





# Conclusion et perspectives

La Rubisco est une protéine qui réveille l'intérêt scientifique pour sa production industrielle depuis de nombreuses années, dû en grande partie à ses propriétés nutritionnelles et fonctionnelles. Malgré cela, plusieurs tentatives pour la mise en place d'une filière de production à grande échelle n'ont pas abouti en raison des inconvénients d'ordre technique ou économique.

Dans ce travail l'objectif a été d'étudier un procédé de purification de la Rubisco qui soit simple, robuste, et avec des technologies douces, en partant de matières premières végétales dont les cultures puissent s'insérer dans une dynamique d'agriculture durable. Tout d'abord une sélection de matières premières a été réalisée, en partant de la luzerne comme une référence, compte tenu de ses avantages agronomiques et de sa teneur en Rubisco. Parmi les différents lots de plantes testés, le ray-grass et le trèfle violet se sont avérés comme étant de possibles alternatives. La production des jus végétaux a été mise en place dans une presse à vis. Les facteurs liés à la récolte de la plante, ainsi que les conditions opératoires du procédé, sont ceux qui ont présenté un effet plus important sur le rendement de production de jus.

Afin de caractériser les jus produits, notamment leur concentration en Rubisco, deux méthodes analytiques spécifiques ont été considérées et validées. La première, l'HPLC-SEC, a permis d'identifier dans les jus produits la Rubisco sous la forme monomère (560 kDa), mais aussi sous formes d'oligomère, dont la taille n'a pas été déterminée. La deuxième méthode de dosage de la Rubisco, la biolayer Interferometry, s'est avérée une technique rapide et sensible utilisable, pour le moment, sur des solutions de Rubisco purifiée.

Du fait que les jus végétaux évoluent dans le temps, mais aussi pour faciliter leur gestion, la conservation des jus produits a été abordée. Le pH s'avère une variable très importante pour la stabilité de la protéine, une valeur autour de 7 permettant de la conserver à 4°C durant des périodes assez longues. Deux méthodes de conservation des jus bruts ont été étudiées : la congélation, qui malgré l'effet négatif sur la protéine cité dans la littérature, se présente comme l'alternative la plus simple et rapide à mettre en place, et le séchage par atomisation. Ce dernier répond non seulement au besoin de conservation, mais permet en plus d'améliorer les propriétés mécaniques des jus pour les rendre compatibles avec le procédé. Tous les jus ont été centrifugés pour leur traitement ultérieur.

Deux procédés de séparation ont été alors étudiés. Leur application successive aux jus reconstitués et centrifugés constitue la base principale du procédé.

1. L'extraction de la protéine des jus par chromatographie d'échange d'ions en lit fixe a été d'abord étudiée. Premièrement, la résine ANX Sepharose 4FF a été sélectionnée. La capacité de rétention de la Rubisco a été estimée à 30 g/L. Des expériences réalisées à plusieurs échelles de travail (20 mL, 200 mL et 1600 mL de volume de lit) ont permis d'évaluer la faisabilité du procédé et d'analyser l'influence de certaines conditions opératoires sur son efficacité. Parmi les principales conclusions, la nécessité de l'atomisation comme opération préalable sur les jus est

particulièrement importante. Les meilleurs résultats en termes de facteur de concentration ont été obtenus lorsque la résine atteint l'équilibre par rapport à la concentration de l'alimentation. Ce résultat qui avait été obtenu dans des travaux précédents se confirme ici : la protéine alimentée déplace des constituants chargés dans la colonne lorsqu'elle arrive à saturation. Dans ces conditions, des valeurs de concentration en Rubisco des éluats jusqu'à 11 fois supérieures à l'alimentation ont été obtenues. Les rendements de récupération de la protéine fixée sont proches de 100%. Par contre, les solutions de Rubisco produites, contiennent encore d'autres composants qu'il est nécessaire d'éliminer, et doivent être conditionnées car leur teneur en sel est peu compatible avec des usages envisagés.

2. Le conditionnement et la purification de la solution par ultrafiltration dans une configuration de diafiltration ont été alors analysés. Les expériences ont été réalisées dans un dispositif de cellule AMICON, en mode frontale mais avec agitation (proche du mode tangentielle). Deux membranes avec deux seuils de coupure différents ont été testées ; la membrane retenue présente un seuil de coupure de 300 kDa, mais sa perméabilité semble soumise à des variations ce qui induit parfois des taux de perte élevés. Par contre, de manière générale les résultats montrent que la diafiltration est un procédé viable pour la purification de la Rubisco, et que des densités de flux compatibles avec une application industrielle peuvent être obtenues. Des travaux sont encore à faire afin de mieux comprendre les phénomènes qui interviennent dans la productivité du procédé, en visant le changement d'échelle.

En parallèle avec ce travail, tout le long du projet, des échantillons de Rubisco ont été produits afin de permettre aux partenaires du projet RUBIS de déterminer leurs propriétés fonctionnelles. Les valeurs déterminées sont tout à fait en accord avec celles indiquées dans la littérature. On peut donc considérer que le procédé répond aux objectifs pour lesquels il a été conçu. A ce stade, les rendements de chaque opération peuvent être proposés. Ils peuvent être considérés élevés pour la séparation chromatographique (à condition de réutiliser les jus jusqu'à leur épuisement en Rubisco) et pour l'ultrafiltration, qui doit être néanmoins améliorée. Par contre, le rendement de production des jus est actuellement moindre de par la formation des agrégats de Rubisco au moment de la production. C'est actuellement le point le plus critique du procédé.

Pour finir, ce travail permet d'envisager de nombreuses perspectives. Certaines sont nécessaires pour progresser vers un développement industriel, d'autres ouvrent de nouvelles portes pour une meilleure valorisation de la matière végétale. Dans un premier temps, progresser dans la maîtrise des méthodes analytiques paraît essentiel pour mieux caractériser les milieux complexes que sont les jus d'origine végétale et mieux les exploiter. Ainsi disposer d'une droite d'étalonnage adaptée à la mesure des agrégats de Rubisco permettrait d'étudier les conditions de leur formation, et éventuellement de leur désagrégation pour former la Rubisco monomère. Plus globalement, l'adaptation des mesures en BLI à tous les échantillons contenant de la Rubisco serait une grande avancée, pour le gain de temps, mais aussi parce que la méthode est plus sensible.

Il serait aussi intéressant d'approfondir l'étude de la composition biochimique des jus, et lien avec leurs propriétés mécaniques. Cela permettrait de mieux maîtriser le fonctionnement des procédés, voire d'anticiper des mélanges favorisant une utilisation plus globale de

la biomasse verte.

Dans un deuxième temps, lors de la séparation de la Rubisco par résines d'échange d'ions, une optimisation essentielle reste à faire en étudiant l'élution en mode gradient. Une optimisation du pH de travail paraît aussi importante : un pH entre 7 et 8 paraît idéal pour la stabilité de la protéine, mais favorise la rétention dans la colonne des composés indésirables comme les polyphénols. De plus, les interactions entre la Rubisco et les autres solutés dépendent aussi du pH.

Cette étape nécessite aussi une étude visant à déterminer la durée de vie de la résine. Dans ce travail, plusieurs cycles ont été réalisés avec la résine pacquée dans la colonne à l'échelle pilote, sans différence apparente de résultats, mais il est important de mieux l'évaluer, car c'est une des étapes les plus chères du procédé.

Enfin, dans le procédé étudié, le conditionnement et la purification de la Rubisco par ultrafiltration en mode diafiltration doivent être approfondis sur différents aspects. Notamment, l'étude sur la sélectivité de la membrane est importante afin d'évaluer, et surtout d'identifier, les conditions qui permettent de minimiser les pertes. La taille des pores de la membrane proposée pourrait aussi être remise en cause, bien que son intérêt principal réside dans les densités de flux importantes qui sont obtenues. Dans tous les cas, identifier le type de résistance (concentration de polarisation ou colmatage) qui a lieu au cours de l'ultrafiltration est nécessaire pour progresser dans le changement d'échelle.

Parmi les questions nouvelles que ce travail propose comme perspective, trois sont apparues particulièrement intéressantes :

- mieux évaluer, en croisant des méthodes analytiques poussées, la pureté de la protéine produite ;
- évaluer la possibilité de concentrer par ultrafiltration davantage les solutions de Rubisco pour consommer moins d'énergie lors de l'atomisation, tout en évitant l'agrégation qui peut modifier ses propriétés ;
- évaluer la possibilité de produire en parallèle des polyphénols, dont les propriétés antioxydantes sont très recherchées.



# Bibliographie

## A

- ABELS, C., F. CARSTENSEN et M. WESSLING (2013). « Membrane processes in biorefinery applications ». In : *Journal of Membrane Science* 444, p. 285–317 (cf. p. 159).
- AFNOR (1997). *Association Française de Normalisation, Qualité de l'eau : Recueil de normes françaises* (cf. p. 90).
- AIMAR, P. (2006). « Filtration membranaire (OI, NF, UF) : Mise en œuvre et performances ». In : *Techniques de l'ingénieur. Technologies de l'eau* 2.W4110 (cf. p. 164, 167).
- ALIBHAI, Z., M. MONDOR, C. MORESOLI, D. IPPERSIEL et F. LAMARCHE (2006). « Production of soy protein concentrates/isolates : traditional and membrane technologies ». In : *Desalination* 191.1-3, p. 351–358 (cf. p. 159).
- AMERSHAM, Biosciences (2000). *Instructions ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)* (cf. p. 137, 140, 142).
- ANDERSEN, M. et P. KIEL (2000). « Integrated utilisation of green biomass in the green biorefinery ». In : *Industrial Crops and Products* 11.2-3, p. 129–137 (cf. p. 46).
- ANDERSSON, I. et A. BACKLUND (2008). « Structure and function of Rubisco ». In : *Plant Physiology and Biochemistry* 46(3).n/a, p. 275–291 (cf. p. 5, 9, 10).
- ANDERSSON, J. et B. MATTIASSON (2006). « Simulated moving bed technology with a simplified approach for protein purification : separation of lactoperoxidase and lactoferrin from whey protein concentrate ». In : *Journal of Chromatography A* 1107.1-2, p. 88–95 (cf. p. 95, 119).
- ANGELO, J. M., A. CVETKOVIC, R. GANTIER et A. M. LENHOFF (2013). « Characterization of cross-linked cellulosic ion-exchange adsorbents : 1. Structural properties ». In : *Journal of Chromatography A* 1319, p. 46–56 (cf. p. 133, 136, 144).
- (2016). « Characterization of cross-linked cellulosic ion-exchange adsorbents : 2. Protein sorption and transport ». In : *Journal of Chromatography A* 1438, p. 100–112 (cf. p. 118, 136).
- ANIHOVI, P. P., S. DANTHINE, G. KARAMOKO et C. BLECKER (2012). « Les crèmes végétales : une alternative aux crèmes laitières ». In : *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(3).n/a, p. 344–359 (cf. p. 13).
- ARAKAWA, T., D. EJIMA et T. AKUTA (2017). « Protein aggregation under high concentration/density state during chromatographic and ultrafiltration processes ». In : *International journal of biological macromolecules* 95, p. 1153–1158 (cf. p. 116, 159).
- ARANJUELO, I., G. MOLERO, G. ERICE, J-C. AVICE et S. NOGUÉS (2010). « Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.) » In : *Journal of Experimental Botany* 62.1, p. 111–123 (cf. p. 48).
- ARLABOSSE, P., M. BLANC, S. KERFAÏ et A. FERNANDEZ (2011). « Production of green juice with an intensive thermo-mechanical fractionation process. Part I : Effects of processing conditions on the dewatering kinetics ». In : *Chemical Engineering Journal* 168.2, p. 586–592 (cf. p. 46, 60).

AUDINOS, R. (2000). *Membranes semi-perméables - Membranes d'ultrafiltration*. Réf : K364v1 (cf. p. 169).

AVILA OSPINA, L. A. (2014). « Autophagy, senescence and nitrogen remobilization in barley ». Thèse de doct. Université Paris Sud-Paris XI (cf. p. 48, 91).

## B

BACCHIN, P (2005). « Principes de base des Technologies à Membranes ». In : (cf. p. 168, 169).

BAHR, J. T., D. P. BOURQUE et H. J. SMITH (1977). « Solubility properties of fraction I proteins of maize, cotton, spinach, and tobacco ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25(4).n/a, p. 783–789 (cf. p. 11).

BARBEAU, W. E. et J. E. KINSELLA (1988). « Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) from green leaves-potential as a food protein ». In : *Food Reviews International* 4(1).n/a, p. 93–127 (cf. p. 18, 46, 48, 65, 99, 101).

BARRANDE, M, I BEURROIES, R DENOYEL, I TATÁROVÁ, M GRAMBLIČKA, M POLAKOVIČ, M JOEHNCK et M SCHULTE (2009). « Characterisation of porous materials for bioseparation ». In : *Journal of Chromatography A* 1216.41, p. 6906–6916 (cf. p. 118).

BAUMEISTER, A., S. VOGELMANN et L. FISCHER (2003). « Concentration and purification of orotic acid directly from whey with an expanded bed adsorption system ». In : *Journal of Chromatography A* 1006.1-2, p. 261–265 (cf. p. 119).

BESSIERE, Y (2005). « Filtration frontale sur membrane : mise en évidence du volume filtré critique pour l'anticipation et le contrôle du colmatage ». Thèse de doct. Université Paul Sabatier-Toulouse III (cf. p. 175).

BHAT, J. Y., G. MILIČIĆ, G. THIEULIN-PARDO, A. BRACHER, A. MAXWELL, S. CINIANSKY, O. MUELLER-CAJAR, J. R. ENGEN, F. U. HARTL, P. WENDLER et al. (2017). « Mechanism of enzyme repair by the AAA+ chaperone Rubisco activase ». In : *Molecular cell* 67.5, p. 744–756 (cf. p. 10).

BIAZUS, JPM, JB SEVERO JR, JCC SANTANA, RR SOUZA et EB TAMBOURGI (2006). « Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography ». In : *Process Biochemistry* 41.8, p. 1786–1791 (cf. p. 119).

BICKOFF, E. M., D. DE FREMERY, R. H. EDWARDS, B. E. KNUCKLES, G. O. KOHLER et R. E. MILLER (1976). « Preparation of soluble edible protein from leafy green crops ». Patent US 3,959,246 (cf. p. 18, 21).

BŁASZCZYK, A., L. SIRKO, M. J. HAWKESFORD et A. SIRKO (2002). « Biochemical analysis of transgenic tobacco lines producing bacterial serine acetyltransferase ». In : *Plant Science* 162.4, p. 589–597 (cf. p. 51).

BOSCHETTI, E (1994). « Advanced sorbents for preparative protein separation purposes ». In : *Journal of Chromatography A* 658.2, p. 207–236 (cf. p. 123).

BOTA, J., J. FLEXAS, A. J. KEYS, J. LOVELAND, M. A. J. PARRY et H. MEDRANO (2002). « CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity factor of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in grapevines (*Vitis vinifera* L.) : First in vitro determination and comparison to in vivo estimations ». In : *Vitis* 41(4).n/a, p. 163–168 (cf. p. 26, 137).

- BOUYER, E., G. MEKHOLOUFI, V. ROSILIO, JL. GROSSIORD et F. AGNELY (2012). « Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions : alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field ? » In : *International journal of pharmaceuticals* 436.1-2, p. 359–378 (cf. p. 69, 97, 152).
- BRAY, W. J. et C. HUMPHRIES (1978). « Solvent Fractionation of Leaf Juice to Prepare Green and White Protein Products ». In : *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29.n/a, p. 839–846 (cf. p. 18, 21).

## C

- CARMO-SILVA A. E. and Barta, C. et M. E. SALVUCCI (2011). « Photosynthesis Research Protocols. Methods in Molecular Biology ». In : sous la dir. de Carpentier R. (EDS). T. 684. n/a. Humana Press, Totowa, NJ. Chap. Isolation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Leaves (cf. p. 26, 63, 101).
- CARVALHO, R. S.H., D. A. IANZER, L. MALAVOLTA, M. M. RODRIGUES, E. M. CILLI et C. R. NAKAIE (2005). « Polystyrene-type resin used for peptide synthesis : application for anion-exchange and affinity chromatography ». In : *Journal of Chromatography B* 817.2, p. 231–238 (cf. p. 118).
- CASTEL, V., O. ANDRICH, F. M NETTO, L. G. SANTIAGO et C. R. CARRARA (2014). « Total phenolic content and antioxidant activity of different streams resulting from pilot-plant processes to obtain *Amaranthus mantegazzianus* protein concentrates ». In : *Journal of Food Engineering* 122, p. 62–67 (cf. p. 160).
- CASTRO-MUÑOZ, R. et V. FÍLA (2018). « MEMBRANE-BASED technologies as an emerging tool for separating high-added-value compounds from natural products ». In : *Trends in Food Science & Technology* (cf. p. 159).
- CASTRO-MUÑOZ, R., J. YANEZ-FERNANDEZ et V. FÍLA (2016). « Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies : an overview ». In : *Food chemistry* 213, p. 753–762 (cf. p. 160).
- CATT, JW et P MILLARD (1988). « The Measurement of Ribulose 1, 5-bis phosphate Carboxylase/Oxygenase Concentration in the Leaves of Potato Plants by Enzyme Linked Immunosorbtion Assays ». In : *Journal of Experimental Botany* 39.2, p. 157–164 (cf. p. 63, 80).
- CHAKRABARTI, S., S. BHATTACHARYA et S. K. BHATTACHARYA (2002). « A nonradioactive assay method for determination of enzymatic activity of d-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) ». In : *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 52(3).n/a, p. 179–187 (cf. p. 12).
- CHAMPAGNE, J., A. CVETKOVIC, G. BALLUET, S. BENGIO, M. TOUEILLE et R. GANTIER (2013a). « A salt-tolerant anion-exchange chromatography sorbent for flexible process development ». In : *BioProcess Int* 11.6 (cf. p. 136).
- CHAMPAGNE, J., G. BALLUET, R. GANTIER et M. TOUEILLE (2013b). « “Salt tolerant” anion exchange chromatography for direct capture of an acidic protein from CHO cell culture ». In : *Protein expression and purification* 89.2, p. 117–123 (cf. p. 136).



- CHAN, P. H., K. SAKANO, S. SINGH et S. G. WILDMAN (1972). « Crystalline fraction I protein : preparation in large yield ». In : *Science* 176.4039, p. 1145–1146 (cf. p. 24, 51).
- CHEN, W-D, Y-D WANG, L-H ZHA, G-H MA et Z-G SU (2004). « Single-step recovery of ephedrine hydrochloride from raw materials using expanded bed adsorption ». In : *Bio-technology letters* 26.15, p. 1233–1236 (cf. p. 116).
- CHERYAN, M. (1980). « Vegetable Protein Isolates and Concentrates by Ultrafiltration ». In : *Ultrafiltration Membranes and Applications*. Springer, p. 343–352 (cf. p. 159).
- CHEW, P.G., A. J. CASEY et S. K JOHNSON (2003). « Protein quality and physico-functionality of Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius* cv. Gunguru) protein concentrates prepared by isoelectric precipitation or ultrafiltration ». In : *Food chemistry* 83.4, p. 575–583 (cf. p. 159).
- COLAS, D. (2012). « Etude de la bioraffinerie des plantes vertes : Application au fractionnement des protéines de luzerne par extrusion bi-vis et chromatographie hydrophobe ». Thèse de doct. INPT (cf. p. 46, 52, 56, 58).
- CONIDI, Carmela, AD RODRIGUEZ-LOPEZ, Esperanza M GARCIA-CASTELLO et Alfredo CASANO (2015). « Purification of artichoke polyphenols by using membrane filtration and polymeric resins ». In : *Separation and Purification Technology* 144, p. 153–161 (cf. p. 160).
- Contaminant Removal by Anion Exchange on Salt Tolerant HyperCel™ STAR AX Sorbent Prior to Downstream Purification of Recombinant Interleukin 7* (2011). Réf. USD 2870. Pall (cf. p. 136).
- COSTES, Claude (1981). *Protéines foliaires et alimentation*. Bordas (cf. p. 92).

## D

- DAYNE, D (2012). « BioLayer Interferometry (BLI)—How does it work ». In : *FortéBio newsletter In Interactions* 5. [https://www.fortebio.com/interactions/Spring\\_2012/page5.html](https://www.fortebio.com/interactions/Spring_2012/page5.html), consulté le 20.11.2017, p. 8–9 (cf. p. 81).
- DE FREMERY, D., R. E. MILLER, R. H. EDWARDS, B. E. KNUCKLES, E. M. BICKOFF et G. O. KOHLER (1973). « Centrifugal separation of white and green protein fractions from alfalfa juice following controlled heating ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21(5).n/a, p. 886–889 (cf. p. 8).
- DE JONG, G. A. H., P. GEERDING, P. J. T. BUSSMANN et N. HYLKEMA (2015). « Economical process for the isolation of functional protein from plants ». Patent US 2015/0335043 A1 (cf. p. 16, 22, 35, 36, 39, 40, 63, 64, 97).
- DE RESENDE, J. (2017). *Rapport interne projet RUBIS, Occitanie, CLE 2015-2018 Recent developments in protein quality evaluation* (cf. p. 14).
- DE WIT, JN (1998). « Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products ». In : *Journal of dairy science* 81.3, p. 597–608 (cf. p. 95).
- DELIS, B. (2015). « Bio-layer interferometry : méthode d'intérêt dans les procédés de fabrication et pour le contrôle des préparations hospitalières à base d'anticorps monoclonaux thérapeutiques. » Thèse de doct. Université de Bordeaux U.F.R des Sciences Pharmaceutiques (cf. p. 64, 81, 82, 84).

- DEPHILLIPS, P. et A. M. LENHOFF (2001). « Determinants of protein retention characteristics on cation-exchange adsorbents ». In : *Journal of Chromatography A* 933.1-2, p. 57–72 (cf. p. 117).
- DESAI, U. A., G. SUR, S. DAUNERT, R. BABBITT et Q. LI (2002). « Expression and affinity purification of recombinant proteins from plants ». In : *Protein expression and purification* 25.1, p. 195–202 (cf. p. 51).
- DICKINSON, E. (2012). « Emulsion gels : The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets (review) ». In : *Food Hydrocolloids* 28.n/a, p. 224–241 (cf. p. 13).
- DIEDERICH, P., M. HOFFMANN et J. HUBBUCH (2015). « High-throughput process development of purification alternatives for the protein avidin ». In : *Biotechnology progress* 31.4, p. 957–973 (cf. p. 117).
- DO, T., F. HO, B. HEIDECKER, K. WITTE, L. CHANG et L. LERNER (2008). « A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins ». In : *Protein expression and purification* 60.2, p. 147–150 (cf. p. 79).
- DONG, W., A. SUN, Y. ZHANG et R. LIU (2013). « Isolation and purification of active components from the Chinese medicinal herb *Polygonum Cuspidatum* Sieb. Et Zucc by adsorption chromatography on 12% cross-linked agarose gel media ». In : *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 36.8, p. 1096–1104 (cf. p. 124).
- DOUILLARD, R. (1986). « Purification et caractérisation électrophorétique de la Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase de Luzerne ». In : *Sciences des Aliments* 6.n/a, p. 81–91 (cf. p. 12).
- DOUILLARD, R. (1996). « Les protéines végétales ». In : n/a. Ed. Godon, Lavoisier, Technique et Documentation. Chap. Les protéines de feuilles de Rubisco, p. 173–222 (cf. p. 7, 56).
- DOUILLARD, R. et O. DE MATHAN (1994). « New and developing sources of food proteins ». In : sous la dir. de B. J. HUDSON. n/a. London : Chapman et Hall. Chap. Leaf proteins for food use : Potential of Rubisco, p. 307–342 (cf. p. 6, 9, 11, 13, 14, 46, 63, 91, 99, 104, 108).
- DOUILLARD, R. et T. SONGRILLAY KONGPHET (1990). « Propriétés tensioactives de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase de luzerne native et maltolysée ». In : *Sciences des Aliments* 10.n/a, p. 175–187 (cf. p. 11).
- DOUILLARD, R., A. PORCHERON, M. LILA, P. GUY, G. GENIER, F. ALLARD et J.P. COMPOINT (1990). « Teneur en ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase des feuilles de luzerne (*Medicago sativa* L). Facteurs de variation génétiques et agronomiques ». In : *Agronomie, EDP Sciences* 10.n/a, p. 273–284 (cf. p. 77, 95).
- DURU, M., A. GIBON et PL. OSTY (1988). « Pour une approche renouvelée du système fourrager ». In : *Communication colloque DMDR, Paris, 13 p* (cf. p. 45).
- D’ALVISE, N, C LESUEUR-LAMBERT, B FERTIN, P DHULSTER et D GUILLOCHON (2000). « Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate ». In : *Enzyme and microbial technology* 27.3-5, p. 286–294 (cf. p. 160).

## E

- EDWARDS, R. H., R. E. MILLER, D. DE FREMERY, B. E. KNUCKLES, E. M. BICKOFF et G. O. KOHLER (1975). « Pilot plant production of an edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23(4).n/a, p. 620–626 (cf. p. 19, 20).
- ESPINASSE, B. (2003). « Approche théorique et expérimentale de la filtration tangentielle de colloïdes : flux critique et colmatage ». Thèse de doct. Université Paul Sabatier-Toulouse III (cf. p. 166–168).

## F

- FAO/WHO/UNU (1985). *Energy and protein requirement*. T. 724 (cf. p. 7).
- FELLER, U., I. ANDERS et T. MAE (2007). « Rubiscolytics : fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated ». In : *Journal of experimental botany* 59.7, p. 1615–1624 (cf. p. 80).
- FERNANDEZ, M. A. et G. CARTA (1996). « Characterization of protein adsorption by composite silica-polyacrylamide gel anion exchangers I. Equilibrium and mass transfer in agitated contactors ». In : *Journal of Chromatography A* 746.2, p. 169–183 (cf. p. 123).
- FIRDAOUS, L., B. FERTIN, O. KHELISSA, M. DHAINAUT, N. NEDJAR, G. CHATAIGNÉ, L. OUHOUD, Lutin F. et P. DHULSTER (2017). « Adsorptive removal of polyphenols from an alfalfa white proteins concentrate : Adsorbent screening, adsorption kinetics and equilibrium study ». In : *Separation and Purification Technology* 178.n/a, p. 29–39 (cf. p. 8, 16).
- FORTEBIO.COM, Site. *ForteBio\_App\_Note\_14.pdf*. [www.fortebio.com/literature.html](http://www.fortebio.com/literature.html), consulté le 2018-08-01 (cf. p. 80).
- *ForteBio\_App\_Note\_14.pdf*. [www.fortebio.com/literature.html](http://www.fortebio.com/literature.html), consulté le 2018-08-01 (cf. p. 84).

## G

- GALANAKIS, C. M. (2015). « Separation of functional macromolecules and micromolecules : from ultrafiltration to the border of nanofiltration ». In : *Trends in Food Science & Technology* 42.1, p. 44–63 (cf. p. 159).
- GALIANO, F., K. BRICEÑO, T. MARINO, A. MOLINO, K. V. CHRISTENSEN et A. FIGOLI (2018). « Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications ». In : *Journal of Membrane Science* (cf. p. 159).
- GALMÉS, J., J. FLEXAS, A. J. KEYS, J. CIFRE, R. A. C. MITCHELL, P. J. MADGWICK, R. P. HASLAM, H. MEDRANO et M. A. J. PARRY (2005). « Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves ». In : *Plant, Cell et Environment* 28.n/a, p. 571–579 (cf. p. 9, 16, 26, 62, 63, 97, 137).

- GARCÍA, MC, P PUCHALSKA, C ESTEVE et ML MARINA (2013). « Vegetable foods : A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities ». In : *Talanta* 106, p. 328–349 (cf. p. 160).
- GATENBY, A. A. et R. J. ELLIS (1990). « Chaperone Function : The Assembly of Ribulose Biphosphate Carboxylase-Oxygenase ». In : *Annual Review of Cell Biology* 6.n/a, p. 125–149 (cf. p. 9).
- GODIN, B., F. GHYSEL, R. AGNEESSENS, T. SCHMIT, S. GOFFLOT, S. LAMAUDIÈRE, G. SINNAEVE, J.P. GOFFART, P. A. GERIN, D. STILMANT et Delcarte J. (2010). « Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération ». In : *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 14.s2, p. 549–560 (cf. p. 97).
- GONZÁLEZ-PÉREZ, S. et J.B. ARELLANO (2009). « Handbook of Hydrocolloids (Second edition) ». In : n/a. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology et Nutrition. Chap. Vegetable protein isolates, p. 383–419 (cf. p. 17).
- GROSS, U. (2003). *Rubisco : Easy Purification and Immunochemical Determination*. Universitätsbibliothek (cf. p. 24).
- GROSS, U., F. GILLES, L. BENDER, P. BERGHÖFER et K-H. NEUMANN (1993). « The influence of sucrose and an elevated CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L.) cell cultures ». In : *Plant cell, tissue and organ culture* 33.2, p. 143–150 (cf. p. 63).
- GUADALUPE-MEDINA, V., H. W. WISSELINK, M. AH. LUTTIK, E. de HULSTER, J-M. DARAN, J. T. PRONK et A. JA. van MARIS (2013). « Carbon dioxide fixation by Calvin-Cycle enzymes improves ethanol yield in yeast ». In : *Biotechnology for biofuels* 6.1, p. 125 (cf. p. 80).
- GUPTA, R. et H.S. MURALIDHARA (2001). « Interfacial challenges in the food industry : a review ». In : *Trends in Food Science & Technology* 12.n/a, p. 382–391 (cf. p. 13).

## H

- HANSEN, S., V. B. VOLLAN, E. HOUGH et K. ANDERSEN (1999). « The crystal structure of Rubisco from *Alcaligenes eutrophus* reveals a novel central eight-stranded  $\beta$ -barrel formed by  $\beta$ -strands from four subunits<sup>1</sup> ». In : *Journal of molecular biology* 288.4, p. 609–621 (cf. p. 12).
- HASSAN, S., C. J. VAN DOLLEWEERD, F. IOAKEIMIDIS, E. KESHAVARZ-MOORE et J. K. C. MA (2008). « Considerations for extraction of monoclonal antibodies targeted to different subcellular compartments in transgenic tobacco plants ». In : *Plant biotechnology journal* 6.7, p. 733–748 (cf. p. 51).
- HEDA, D. et M. T. MADIGAN (1989). « Purification and characterization of the thermostable ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the thermophilic purple bacterium *Chromatium tepidum* ». In : *European Journal of Biochemistry* 184(2).n/a, p. 313–319 (cf. p. 9).
- HELFFERICH, F. G. (1962). *Ion exchange chromatography*. McGraw-Hill (cf. p. 118).

- HERNANDEZ, A., T. HERNANDEZ et C. MARTINEZ (1998). « Production and chemical composition of alfalfa protein concentrate obtained by freezing ». In : *Animal Feed Science and Technology* 72.n/a, p. 169–174 (cf. p. 23).
- HICKETIER, M et K BUCHHOLZ (2002). « Fluidized bed adsorption of Cephalosporin C ». In : *Journal of biotechnology* 93.3, p. 253–268 (cf. p. 116, 119).
- HOLLO, J., I. ZAGYVAI et L. KOCH (1971). « Process for the production of fiberless green plant concentrate of full biological value ». Patent US 3,637,396 (cf. p. 18, 19).
- HORIGOME, T. et M. KANDATSU (1968). « Biological value of proteins allowed to react with phenolic compounds in presence of o-diphenol oxidase ». In : *Agricultural and Biological Chemistry* 32.9, p. 1093–1102 (cf. p. 91).
- HUYGHE, C. (2005). *Prairies et cultures fourragères en France : Entre logiques de production et enjeux territoriaux*. Editions Quae (cf. p. 45).

## I

- IBARRA-HERRERA, C. C., O. AGUILAR MARCO et R. PALOMARES (2011). « Application of an aqueous two-phase systems strategy for the potential recovery of a recombinant protein from alfalfa (*Medicago sativa*) ». In : *Separation and Purification Technology* 77(1).n/a, p. 94–98 (cf. p. 8).
- INCAMPS, A., F. HÉLY-JOLY, P. CHAGVARDIEFF, J-C. RAMBOURG, A. DEDIEU, E. LINARES et E. QUÉMÉNEUR (2005). « Industrial process proteomics : alfalfa protein patterns during wet fractionation processing ». In : *Biotechnology and bioengineering* 91.4, p. 447–459 (cf. p. 77).

## J

- JANSON, J-C (2012). *Protein purification : principles, high resolution methods, and applications*. T. 151. John Wiley & Sons (cf. p. 65).
- JARRIGE, R, M.T. BEAUFORT, J. JUNG et C. LE GALLO (1963). « Les constituants membranaires des plantes fourragères ». In : *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*. T. 3. 2. EDP Sciences, p. 143–190 (cf. p. 45, 50, 97).
- JERVIS, L. et W. S. PIERPOINT (1989). « Purification technologies for plant proteins ». In : *Journal of Biotechnology* 11.2-3, p. 161–198 (cf. p. 15, 69, 91, 101, 104).
- JOHAL, S. (1982). « Preparation and crystallization of Fraction I protein from plant sources ». Patent 4,334,024 (cf. p. 16, 22, 63).
- (1983). « Preparation and crystallization of Fraction I protein from plant sources ». Brev. US Patent 4,400,471 (cf. p. 22).
- JUNGBAUER, A. (2005). « Chromatographic media for bioseparation ». In : *Journal of Chromatography A* 1065.1, p. 3–12 (cf. p. 123).

## K

- KAPEL, R. (2005). « Amélioration d'un procédé de production d'un concentré de protéines blanches de luzerne semi-industriel et valorisation du concentré protéique dans le domaine des adhésifs et des nutraceutiques ». Thèse de doct. Thèse de doctorat en Sciences et Technologie, Université de Lille 1 (cf. p. 8).
- KAPEL, R., A. CHABEAU, J. LESAGE, G. RIVIERE, R. RAVALLEC-PLE, D. LECOUTURIER, M. WARTELLE, D. GUILLOCHON et P. DHULSTER (2006). « Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfalfa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities ». In : *Food chemistry* 98.1, p. 120–126 (cf. p. 46, 77, 160).
- KELLEY, S. S., T. G. RIALS et W. G. GLASSER (1987). « Relaxation behaviour of the amorphous components of wood ». In : *Journal of materials science* 22.2, p. 617–624 (cf. p. 110).
- KELLOGG, E. A. et N. D. JULIANO (1997). « The structure and function of Rubisco and their Implications for Systematic Studies ». In : *American Journal of Botany* 84(3).n/a, p. 413–428 (cf. p. 10).
- KERFAI, S. (2011). « Etude d'un procédé chromatographique d'échange d'ions pour la séparation de la Ribulose 1, 5-Biphosphate Carboxylase Oxygénase (Rubisco) dans le cadre de la valorisation d'un sous produit agricole ». Thèse de doct. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (cf. p. 46, 64, 70, 108, 109, 123, 130, 152, 155).
- KERFAI, S., S. MATHEÉ, S. ALFENORE et A. FERNANDEZ (2011a). « Intensive ion exchange process for soluble proteins recovery from industrial alfalfa green juice ». In : *Chemical Engineering Transactions* 25, p. 1061–1066 (cf. p. 63, 80).
- KERFAI, S., A. FERNÁNDEZ, S. MATHÉ, S. ALFENORE et P. ARLABOSSE (2011b). « Production of green juice with an intensive thermo-mechanical fractionation process. Part II : Effect of processing conditions on the liquid fraction properties ». In : *Chemical engineering journal* 167.1, p. 132–139 (cf. p. 46, 63, 64, 67–69, 80, 99).
- KHAEMBAH, E. N. (2009). « Leaf Rubisco turnover variation in a perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) population : analysis of quantitative trait loci, implications for productivity, and potential for manipulation : a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Plant Science, Massey University, Institute of Natural Resources, College of Sciences, Palmerston North, New Zealand ». Thèse de doct. Massey University (cf. p. 48).
- KHAEMBAH, E. N., P. C. BEUKES, P. GREGORINI, A. J. ROMERA, S. L. WOODWARD et D. F. CHAPMAN (2014). « The potential of diverse pastures to reduce nitrogen leaching on New Zealand dairy farms ». In : *Nutrient management for the farm, catchment and community*. <http://flrc.massey.ac.nz/publications.html>. *Occasional Report* 27 (cf. p. 48).
- KISHIMA, Y., T. MIKAMI, A. HIRAI, M. SUGIURA et T. KINOSHITA (1987). « Beta chloroplast genomes : analysis of fraction I protein and chloroplast DNA variation ». In : *Theoretical and applied genetics* 73.3, p. 330–336 (cf. p. 9).
- KLEINKOPF, G. E., R. C. HUFFAKER et A. MATHESON (1970). « A Simplified Purification and Some Properties of Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase from Barley ». In : *Plant Physiology* 46.n/a, p. 204–207 (cf. p. 12).

- KNOPF, J. A. et M. SHAPIRA (2005). « Degradation of Rubisco SSU during oxidative stress triggers aggregation of Rubisco particles in *Chlamydomonas reinhardtii* ». In : *Planta* 222.5, p. 787–793 (cf. p. 12).
- KNUCKLES, B. E., D. DE FREMERY, E. M. BICKOFF et G. O. KOHLER (1975). « Soluble protein from alfalfa juice by membrane filtration ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23(2).n/a, p. 209–212 (cf. p. 8, 97).
- KNUCKLES, B. E., D. de FREMERY et G. O. KOHLER (1982). « Gel Filtration Chromatography of Protein Extracts from Lucerne (Alfalfa) ». In : *Journal of the Science of Food and Agriculture* 3.n/a, p. 128–132 (cf. p. 14, 24).
- KOSCHUH, W., G. POVODEN, V. H. THANG, S. KROMUS, K. D. KULBE, S. NOVALIN et C. KROTSHECK (2004). « Production of leaf protein concentrate from ryegrass (*Lolium perenne* x *multiflorum*) and alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa*). Comparison between heat coagulation/centrifugation and ultrafiltration ». In : *Desalination* 163.n/a, p. 253–259 (cf. p. 23, 63, 104, 160).
- KRALOVA, I. et J. SJOBLUM (2009). « Surfactants Used in Food Industry : A review ». In : *J. of Dispersion Science and Technology* 30(9).n/a, p. 1363–1383 (cf. p. 13).
- KUMAR, NS Krishna, MK YEA et M CHERYAN (2003). « Soy protein concentrates by ultrafiltration ». In : *Journal of food science* 68.7, p. 2278–2283 (cf. p. 159).
- KUNG, S. D. (1976). « Tobacco Fraction 1 Protein : A Unique Genetic Marker ». In : *Science* 191.n/a, p. 429–434 (cf. p. 24).

## L

- LACOOOPERATIONAGRICOLE.ORG, Site Web. *Coop de France Deshydratation : Chiffres clés*. <https://www.lacooperationagricole.coop/fr/coop-de-france-deshydratation-corporate>, consulté le 16-07-2018 (cf. p. 50).
- LAGERLUND, I., E. LARSSON, J. GUSTAVSSON, J. FÄRENMARK et A. HEIJBEL (1998). « Characterisation of ANX Sepharose® 4 Fast Flow media ». In : *Journal of Chromatography A* 796.1, p. 129–140 (cf. p. 137, 138).
- LAMSAL, B.P. et S. KOEGEL R.G. an Gunasekaran (2007). « Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins ». In : *LWT* 40.n/a, p. 1520–1526 (cf. p. 11, 14).
- LAN, Y. et K. A. MOTT (1991). « Determination of apparent Km values for ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase using the spectrophotometric assay of Rubisco activity ». In : *Plant physiology* 95.2, p. 604–609 (cf. p. 80).
- LEBLANC, C, G. LEMAIRE et G. MANDRET (1994). « Relation entre production de matière sèche et quantité de rayonnement intercepté par une culture de sorgho fourrager au Sénégal ». In : *Fourrages* 138, p. 135–144 (cf. p. 93).
- LENHOFF, A. M. (2011). « Protein adsorption and transport in polymer-functionalized ion-exchangers ». In : *Journal of Chromatography A* 1218.49, p. 8748–8759 (cf. p. 117).
- LEVESQUE, D. et J.C. RAMBOURG (2002). « Method for processing the raw juice produced from pressing a protein-leaf rich material such as alfalfa ». Patent WO 02/058482 (cf. p. 7, 16, 29, 31, 46).

- LI, Y. et Y. SUN (2014). « Poly (4-vinylpyridine) : a polymeric ligand for mixed-mode protein chromatography ». In : *Journal of Chromatography A* 1373, p. 97–105 (cf. p. 117).
- LIBOUGA, D. G., V. AGUIÉ-BÉGHIN et R. DOUILLARD (1996). « Thermal denaturation and gelation of Rubisco : effects of pH and ions ». In : *International Journal of Biological Macromolecules* 19(4).n/a, p. 271–277 (cf. p. 11, 14).
- LILLEY, R McC et DA WALKER (1974). « An improved spectrophotometric assay for ribulosebiphosphate carboxylase ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 358.1, p. 226–229 (cf. p. 62, 80).
- LOJEWSKA, E., T. KOWALCZYK, S. OLEJNICZAK et T. SAKOWICZ (2016). « Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins ». In : *Protein expression and purification* 120, p. 110–117 (cf. p. 117).
- LU, P. et J. E. KINSELLA (1972). « Extractability and properties of protein from alfalfa leaf meal ». In : *Journal of Food Science* 37(1).n/a, p. 94–99 (cf. p. 12).
- LUO, S., Z. WANG, M. KOBAYASHI et T. NOZAWA (2000). « The Dimerization of Folded Monomers of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase ». In : *Journal of Biological Chemistry* 276.n/a, p. 7023–7026 (cf. p. 12).
- LUZERNE.ORG, Site Web. *Chiffres clés sur Luzerne.org*. <http://www.luzernes.org/?q=d%C3%A9couverte-de-la-luzerne/chiffres-clés>, consulté le 15-01-2018 (cf. p. 46).
- *Luzerne et Nutrition : De nouveaux débouchés*. <http://www.luzernes.org/?q=luzerne-et-nutrition/de-nouveaux-d%C3%A9bouch%C3%A9>, consulté le 08-01-2018 (cf. p. 46).

## M

- MAKINO, Amane (2003). « Rubisco and nitrogen relationships in rice : leaf photosynthesis and plant growth ». In : *Soil Science and Plant Nutrition* 49.3, p. 319–327 (cf. p. 48).
- MAKONI, N.F., M.A.G. von KEYSERLINGK, J.A. SHELFORD, L.J. FISHER et R. PUCHALAA (1993). « Fractionation of fresh, wilted and ensiled alfalfa proteins ». In : *Animal Feed Science and Technology* 41(1).n/a, p. 01–13 (cf. p. 9).
- MARAGOS, C. M. (2011). « Detection of deoxynivalenol using biolayer interferometry ». In : *Mycotoxin research* 27.3, p. 157–165 (cf. p. 82, 84).
- MARTIN, A. H., M. NIEUWLAND et G. A. H. de JONG (2014). « Characterization of Heat-Set Gels from Rubisco in Comparison to Those from Other Proteins ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62.n/a, p. 10783–10791 (cf. p. 11, 14, 28, 63, 69, 137).
- MATSUI, M., Y. KIYOZUMI, Y. MIZUSHINA, K. SAKAGUCHI et F. MIZUKAMI (2015). « Adsorption and desorption behavior of basic proteins on zeolites ». In : *Separation and Purification Technology* 149, p. 103–109 (cf. p. 118).
- MAUBOIS, Jean-Louis Joseph, Joseph CULIOLI, Alain CHOPIN et Marie-Christine CHOPIN (1976). *Ultrafiltration process for obtaining protein isolates of vegetable origin*. US Patent 3,993,636 (cf. p. 159).
- MAUREL, A. (1993). « Techniques séparatives à membranes : Osmose inverse, nanofiltration, ultrafiltration, microfiltration tangentielle considérations théoriques ». In : (cf. p. 166).



- MERODIO, C. et B. SABATER (1988). « Preparation and Properties of a White Protein Fraction in High Yield from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L) Leaves ». In : *Journal of the Science of Food and Agriculture* 44.n/a, p. 237–243 (cf. p. 16, 23, 63).
- METODIEV, M et K DEMIREVSKA-KEPOVA (1992). « Rubisco quantitation in leaves of different barley varieties by enzyme-linked immunosorbent assay ». In : *Journal of Experimental Botany* 43.2, p. 155–158 (cf. p. 63, 80).
- MILLER, H. (1952). « Method of processing alfalfa ». Patent US 2,600,903 (cf. p. 18).
- MONNOT, M. (2015). « Conception d’une filière intensifiée par membrane pour le dessalement autonome d’eau de mer : étude du prétraitement et de son effet sur le biocolmatage ». Thèse de doct. INSA de Toulouse (cf. p. 171, 175).
- MÜLLER, E. (2005). « Properties and characterization of high capacity resins for biochromatography ». In : *Chemical Engineering & Technology : Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology* 28.11, p. 1295–1305 (cf. p. 117).
- MURRAY, B. S. (2002). « Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins ». In : *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7(5-6).n/a, p. 426–431 (cf. p. 13).

## N

- NICOLAS-SIMONNOT, MO. (1991). « Contribution à l’étude de la chromatographie frontale des protéines par échange d’anions : Application à l’albumine du serum bovin ». Thèse de doct. Vandoeuvre-les-Nancy, INPL (cf. p. 117, 118, 123).
- NIU, J.F., Z.F. CHEN, G.C. WANG et B.C. ZHOU (2010). « Purification of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) using expanded bed absorption ». In : *Journal of applied phycology* 22.1, p. 25–31 (cf. p. 45, 152).
- NWEKE, M. C., R. G. MCCARTNEY et D. G. BRACEWELL (2017). « Mechanical characterization of agarose-based chromatography resins for biopharmaceutical manufacture ». In : *Journal of Chromatography A* 1530, p. 129–137 (cf. p. 123).

## P

- PANJA, Palash (2017). « Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials ». In : *Current Opinion in Food Science* (cf. p. 160).
- PAPADOPOULOU, A. et Frazier R. A. (2004). « Characterization of protein–polyphenol interactions ». In : *Trends in Food Science & Technology* 15(3-4).n/a, p. 186–190 (cf. p. 15).
- PEREZ, J., J. Y. CAVAILLE et J. TATIBOUET (1990). « La transition vitreuse dans les polymères amorphes ». In : *Journal de chimie physique* 87, p. 1923–1967 (cf. p. 109).
- PEZZINI, J. (2011). « La chromatographie en mode mixte pour la purification de protéines recombinantes à visée santé : caractérisation des interactions impliquées dans les supports de chromatographie HyperCel®, modélisation et applications. » Thèse de doct. Bordeaux 2 (cf. p. 117).
- PICCIRILLI, A. (2012). « Procédé d’obtention d’un extrait protéique de luzerne et de co-produits valorisables ». Patent WO 2012/150421A1 (cf. p. 32, 34).

- PIERPOINT, W. S. (1983). « Leaf Protein Concentrates ». In : sous la dir. de L. TELEK et H.D. (Eds.) GRAHAM. n/a. Avi Publishing Co. Chap. Reaction of phenolic compounds with proteins, p. 235–267 (cf. p. 15).
- PLANCQUAERT, P. (1971). « Variation de la quantité et de la teneur en matières azotées des feuilles et des tiges de quelques variétés de luzerne ». In : *Fourrages* 46, p. 15–26 (cf. p. 95).
- PREVOT-D'ALVISE, N, C LESUEUR-LAMBERT, A FERTIN-BAZUS, B FERTIN, P DHULSTER et D GUILLOCHON (2004). « Continuous enzymatic solubilization of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor ». In : *Enzyme and microbial technology* 34.5, p. 380–391 (cf. p. 160).

## R

- RACKIS, JJ, RL ANDERSON, HA SASAME, AK SMITH et CH VANETTEN (1961). « Soybean amino acids, amino acids in soybean hulls and oil meal fractions ». In : *Journal of agricultural and food chemistry* 9.5, p. 409–412 (cf. p. 7).
- RAMBOURG, J. C. et B. MONTIES (1983). « Determination of polyphenolic compounds in leaf protein concentrates of luzerne and their effect on the nutritional value ». In : *Plant Foods for Human Nutrition* 33(2-3).n/a, p. 169–172 (cf. p. 15, 69).
- RATHORE, A. et A. VELAYUDHAN (2003). « Guidelines for optimization and scale-up in preparative chromatography ». In : *Biopharm international* 16.1, p. 34–42 (cf. p. 120, 121, 158).
- RAWEL, H. M., J. KROLL et S. KULLING (2007). « Effect of non-protein components on the degradability of proteins ». In : *Biotechnology Advances* 25.6, p. 611–613 (cf. p. 69).
- REMIGY, JC. et S. DESCLAUX (2007). « Filtration membranaire (OI, NF, UF)-Présentation des membranes et modules ». In : (cf. p. 169, 170).
- RIGAL, L (1996). *Technologie d'extrusion bi-vis et fractionnement de la matière végétale. Recueil des conférences 40 ans d'extrusion bi-vis chez Cletral* (cf. p. 52).
- RNBIO, Site Web. *La photosynthèse des plantes CAM*. Site des Ressources Numériques en Biologie [https://rnbio.upmc.fr/physio\\_veg\\_photosynthese\\_23\\_CAM\\_1](https://rnbio.upmc.fr/physio_veg_photosynthese_23_CAM_1), consulté le 2018-07-15 (cf. p. 6).
- *La photosynthèse en C4*. Site des Ressources Numériques en Biologie [https://rnbio.upmc.fr/physio\\_veg\\_photosynthese\\_22\\_C4\\_1](https://rnbio.upmc.fr/physio_veg_photosynthese_22_C4_1), consulté le 2018-07-15 (cf. p. 6).
- RODRIGUES, I. M., J. FJ. COELHO et M. G. VS CARVALHO (2012). « Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants : Methods, limitations and potential ». In : *Journal of Food Engineering* 109.3, p. 337–346 (cf. p. 159).
- RONKART, S. N., C. S. BLECKER, C. DEROANNE et M. PAQUOT (2009). « Phénomène de la transition vitreuse appliquée aux glucides alimentaires amorphes à l'état de poudre ». In : *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 13.1, p. 177–186 (cf. p. 110).

## S

- SALEHI, N. et C.-A. PENG (2016). « Purification of CD47-streptavidin fusion protein from bacterial lysate using biotin-agarose affinity chromatography ». In : *Biotechnology progress* 32.4, p. 949–958 (cf. p. 124).

- SALVUCCI, M. E., A. R. PORTIS JR et W. L. OGREN (1986). « Purification of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/Oxygenase with High Specific Activity by Fast Protein Liquid Chromatography ». In : *Analytical Biochemistry* 153(1).n/a, p. 97–101 (cf. p. 25, 62, 63).
- SALVUCCI, M. E., K. W. OSTERYOUNG, S. J. CRAFTS-BRANDNER et E. VIERLING (2001). « Exceptional Sensitivity of Rubisco Activase to Thermal Denaturation in Vitro and in Vivo ». In : *Plant Physiology* 127.n/a, p. 1053–1064 (cf. p. 16).
- SANAGI, M. M., S. H. LOH, W. N. WAN IBRAHIM, N. POURMAND, A. SALISU, Wan A. WAN IBRAHIM et I. ALI (2016). « Agarose-and alginate-based biopolymers for sample preparation : Excellent green extraction tools for this century ». In : *Journal of separation science* 39.6, p. 1152–1159 (cf. p. 123).
- SARKAR, S. K., R. E. HOWARTH, M. HIKICHI et J. M. MCARTHUR (1975). « Soluble proteins of alfalfa (*Medicago sativa*) herbage. Fractionation by ammonium sulfate and gel chromatography ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23(4).n/a, p. 626–630 (cf. p. 24, 101).
- SARMENTO, M. R., J. C. OLIVEIRA et R. B. BOULTON (2000). « Selection of low swelling materials for protein adsorption from white wines ». In : *International journal of food science & technology* 35.1, p. 41–47 (cf. p. 118).
- SATZER, P., M. WELLHOEFER et A. JUNGBAUER (2014). « Continuous separation of protein loaded nanoparticles by simulated moving bed chromatography ». In : *Journal of Chromatography A* 1349, p. 44–49 (cf. p. 119).
- SAUGIER, B. (1983). « Aspects écologiques de la photosynthèse ». In : *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques* 130(1).n/a, p. 113–128 (cf. p. 6).
- SELMANE, D. (2010). « Étude de l'Extraction des Protéines de Coproduits d'Abattage et de leur Valorisation comme Ingrédients Fonctionnels ». Thèse de doct. Thèse de Doctorat de l'Université Blaise Pascal, spécialité Génie des Procédés Alimentaires (cf. p. 13).
- SHARWOOD, R. E., S. von CAEMMERER, P. MALIGA et S. M. WHITNEY (2008). « The Catalytic Properties of Hybrid Rubisco Comprising Tobacco Small and Sunflower Large Subunits Mirror the Kinetically Equivalent Source Rubiscos and Can Support Tobacco Growth ». In : *Plant Physiology* 146.n/a, p. 83–96 (cf. p. 26).
- SINGER, S. J., L. EGGMAN, J.M. CAMPBELL et S. G. WILDMAN (1952). « The proteins of green leaves : IV. A high molecular weight protein comprising a large part of the cytoplasmic proteins ». In : *Journal of Biological Chemistry* 197.n/a, p. 233–239 (cf. p. 8).
- SINICHI, S., A. V. L. SIAÑEZ et L. L. DIOSADY (2018). « Recovery of phenolic compounds from the by-products of yellow mustard protein isolation ». In : *Food Research International* (cf. p. 160).
- Size Exclusion Chromatography : Principles and Methods* (2014). Réf. 18-1022-18 AL. GE Healthcare Bio-Sciences AB (cf. p. 24).
- SPENCER, C. M., Y. CAI, R. MARTIN, S. H. GAFFNEY, P. N. GOULDING, D. MAGNOLATO, T. H. LILLEY et E. HASLAM (1988). « Polyphenol complexation—some thoughts and observations ». In : *Phytochemistry* 27.8, p. 2397–2409 (cf. p. 15).
- SPENCER, R. R., A. C. MOTTOLA, E. M. BICKOFF, J. P. CLARK et G. O. KOHLER (1971). « The PRO-XAN Process : The Design and Evaluation of a Pilot Plant System for the Coagulation and Separation of the Leaf Protein from Alfalfa Juice ». In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19(3).n/a, p. 504–507 (cf. p. 18, 19).

- STEINKE, F.H., E.E. PRESCHER et D.T HOPKINS (1980). « Nutritional evaluation (PER) of isolated soybean protein and combinations of food proteins ». In : *Journal of Food Science* 45.n/a, p. 323–327 (cf. p. 7).
- STONE, M. C. et G. CARTA (2007). « Protein adsorption and transport in agarose and dextran-grafted agarose media for ion exchange chromatography ». In : *Journal of Chromatography A* 1146.2, p. 202–215 (cf. p. 117).
- STONE, M. C., Y. TAO et G. CARTA (2009). « Protein adsorption and transport in agarose and dextran-grafted agarose media for ion exchange chromatography : Effect of ionic strength and protein characteristics ». In : *Journal of Chromatography A* 1216.20, p. 4465–4474 (cf. p. 124).
- SUAREZ, R., M. MIRÓ, V. CERDÀ, J. A. PERDOMO et J. GALMÉS (2011). « Automated flow-based anion-exchange method for high-throughput isolation and real-time monitoring of Rubisco in plant extracts ». In : *Talanta* 84.n/a, p. 1259–1266 (cf. p. 16, 26, 27, 63, 97, 137).
- SUÁREZ, R., M. MIRÓ, V. CERDÀ, J.A. PERDOMO et J. GALMÉS (2011). « Automated flow-based anion-exchange method for high-throughput isolation and real-time monitoring of Rubisco in plant extracts ». In : *Talanta* 84.5, p. 1259–1266 (cf. p. 80, 101).
- SUAREZ RUIZ, C.A., C. VAN DEN BERG, R.H. WIJFFELS et M.H.M. EPPINK (2018). « Rubisco separation using biocompatible aqueous two-phase systems ». In : *Separation and Purification Technology* 196.n/a, p. 254–261 (cf. p. 12).
- SULTANA, A. et J. E. LEE (2015). « Measuring Protein-Protein and Protein-Nucleic Acid Interactions by Biolayer Interferometry ». In : *Current protocols in protein science* 79.1, p. 19–25 (cf. p. 81).
- SUYAMA, H., S.E. BENES, P.H. ROBINSON, S.R. GRATAN, C.M. GRIEVE et G. GETACHEW (2007). « Forage yield and quality under irrigation with saline-sodic drainage water : Greenhouse evaluation ». In : *Agricultural water management* 88.1-3, p. 159–172 (cf. p. 46).
- SUZUKI, Y., A. MAKINO et T. MAE (2001). « Changes in the turnover of Rubisco and levels of mRNAs of rbcL and rbcS in rice leaves from emergence to senescence ». In : *Plant, Cell & Environment* 24.12, p. 1353–1360 (cf. p. 48).
- SYNGE, RLM (1975). « Interactions of polyphenols with proteins in plants and plant products ». In : *Qualitas Plantarum* 24.3-4, p. 337–350 (cf. p. 69).

## T

- TADDEI, C., P. AIMAR, G DAUFIN et V SANCHEZ (1986). « Etude du transfert de matière lors de l'ultrafiltration de lactosérum doux sur membrane minérale ». In : *Le Lait* 66.4, p. 371–390 (cf. p. 184, 185).
- TAN, N. H. (1982). « Gel Filtration Fractionation of Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) Proteins ». In : *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34(2).n/a, p. 203–208 (cf. p. 16, 24).
- TANGKA, J. K. (2003). « Analysis of the thermal energy requirements for the extraction of leaf protein concentrate from some green plants ». In : *Biosystems engineering* 86.4, p. 473–479 (cf. p. 51).

- TELEK, L. (1983). « Leaf Protein Extraction From Tropical Plants ». In : *Plants : The Potentials for Extracting Protein, Medicines, and Other Useful Chemicals*, p. 78–110 (cf. p. 22).
- TOMIMATSU, Y. (1980). « Macromolecular properties and subunit interactions of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from alfalfa ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 622(1).n/a, p. 85–93 (cf. p. 10, 11).
- TOMIMATSU, Y. et J. W. DONOVAN (1981). « Effect of pH, Mg<sup>2+</sup>, CO<sub>2</sub> and mercurials on the circular dichroism, thermal stability and light scattering of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylases from alfalfa, spinach and tobacco ». In : *Plant physiology* 68.4, p. 808–813 (cf. p. 99).
- TONDEUR, D. (1994). *Processus et procédés chromatographiques*. ENSIC (cf. p. 116).
- TYN, M. T. et T. W. GUSEK (1990). « Prediction of diffusion coefficients of proteins ». In : *Biotechnology and bioengineering* 35.4, p. 327–338 (cf. p. 118).
- TZENG, YM, LL DIOSADY et LJ RUBIN (1988). « Preparation of rapeseed protein isolates using ultrafiltration, precipitation and diafiltration1 ». In : *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 21.4, p. 419–424 (cf. p. 159).

## U

- UDENIGWE, C. C., C. L. OKOLIE, H. QIAN, I. C. OHANENYE, D. AGYEI et R. E. ALUKO (2017). « Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications ». In : *Trends in Food Science & Technology* 69.n/a, p. 74–82 (cf. p. 8, 91).
- UEMURA, K., Y. SUZUKI, T. SHIKANAI, A. WADANO, R. G. JENSEN, W. CHMARA et A. YOKOTA (1996). « A rapid and Sensitive Method for Determination of Relative Specificity of Rubisco from various Species by Anion-Exchange Chromatography ». In : *Plant and Cell Physiology* 37(3).n/a, p. 325–331 (cf. p. 24).

## V

- VAN BOXTEL, E. L., G. A. VAN KONINGSVELD, S. J. KOPPELMAN, L. AM vVan den BROEK, A. GJ VORAGEN et H. GRUPPEN (2006). « Expanded bed adsorption as a fast technique for the large-scale purification of the complete isoform pool of Ber e 1, the major allergen from Brazil nuts ». In : *Molecular nutrition & food research* 50.3, p. 275–281 (cf. p. 116).
- VAN DE VELDE, F., A.C. ALTING et L. POUVREAU (2011b). « Process for isolating a dechlorophyllized Rubisco preparation from a plant material ». Brev. (cf. p. 30, 33).
- VAN DE VELDE, F., A. ALTING et L. POUVREAU (2011a). « From waste product to food ingredient : the extraction of the abundant plant protein Rubisco ». In : *New Food* 14(2).n/a, p. 10–13 (cf. p. 8, 12–14, 80, 99, 101).
- VERGNES, B. et M. CHAPET (2001). « Extrusion : Procédés d'extrusion bivis ». In : *Techniques de l'ingénieur. Plastiques et composites* AM3653, AM3653–1 (cf. p. 52).
- VILLERMAUX, J. (1982). *Génie de la réaction chimique : conception et fonctionnement des réacteurs*. Tec-Doc Lavoisier (cf. p. 143).

## W

- WAKKEL, M. (2015). « Contribution à l'étude de la séparation des protéines par chromatographie d'échange d'ions en milieu complexe. Effet du poids moléculaire sur l'équilibre et la cinétique de rétention ». Thèse de doct. Toulouse, INSA (cf. p. 117).
- WALLNER, J., G. LHOTA, D. JESCHEK, A. MADER et K. VORAUER-UHL (2013). « Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions ». In : *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 72, p. 150–154 (cf. p. 84).
- WANG, D., S. L. NAIDU, A. R. PORTIS JR, S. P. MOOSE et S. P. LONG (2008). « Can the cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus giganteus* relative to *Zea mays* be explained by differences in activities and thermal properties of Rubisco? » In : *Journal of Experimental Botany* 59(7).n/a, p. 1779–1787 (cf. p. 26, 101).
- WANG, G. (2002). « Isolation and purification of phycoerythrin from red alga *Gracilaria verucosa* by expanded-bed-adsorption and ion-exchange chromatography ». In : *Chromatographia* 56.7-8, p. 509–513 (cf. p. 45, 152).
- WANG, J., A. SUN, R. LIU et Y. ZHANG (2013). « Isolation and purification of soy isoflavones from soybean extracts by adsorption chromatography on 12% cross-linked agarose gel media ». In : *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 36.16, p. 2307–2316 (cf. p. 124).
- WANG, J. C. et J. E. KINSELLA (1976). « Functional properties of novel proteins : alfalfa leaf protein ». In : *Journal of Food Science* 41(2).n/a, p. 286–292 (cf. p. 11, 12, 14).
- WANG, Li, Yuanyuan DING, Xinxia ZHANG, Yongfu LI, Ren WANG, Xiaohu LUO, Yanan LI, Juan LI et Zhengxing CHEN (2018). « Isolation of a novel calcium-binding peptide from wheat germ protein hydrolysates and the prediction for its mechanism of combination ». In : *Food chemistry* 239, p. 416–426 (cf. p. 160).
- WILDMAN, S. G. (2001). « Along the trail from Fraction I protein to Rubisco (ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase) ». In : *Photosynthesis Research* 73.n/a, p. 243–250 (cf. p. 9).
- WILDMAN, S. G. et P. KWANYUEN (1981). « Process for isolation of Ribulose 1,5-Diphosphate Carboxylase from plant leaves ». Patent 4,268,632 (cf. p. 12, 21).
- (1982). « Process for Isolation of Proteins from plant leaves ». Patent US 4,347,324 (cf. p. 16, 21, 22).

## X

- XU, J., T. TAN et J-C JANSON (2006). « Mixed-mode retention mechanism for (-)-epigallocatechin gallate on a 12% cross-linked agarose gel media ». In : *Journal of Chromatography A* 1137.1, p. 49–55 (cf. p. 124).

## Y

YOUNG, J. N., A. M. C. HEUREUX, R. E. M. RICKABY, F. M. M. MOREL, S. M. WHITNEY et R. E. SHARWOOD (2017). « Rubisco Extraction and Purification from Diatoms ». In : *Bio-protocol* 7(6).n/a, p. 1–13 (cf. p. 9).

## Z

ZELITCH, I. (1973). « Plant Productivity and the Control of Photorespiration ». In : *Plant grow regulation*. T. 70(2), p. 579–584 (cf. p. 25).

ZHANG, W., N. GRIMI, M. Y. JAFFRIN et L. DING (2015). « Leaf protein concentration of alfalfa juice by membrane technology ». In : *Journal of Membrane Science* 489, p. 183–193 (cf. p. 104, 160).

ZHANG, W., L. DING, N. GRIMI, M. Y JAFFRIN et B. TANG (2017). « Application of UF-RDM (Ultrafiltration Rotating Disk Membrane) module for separation and concentration of leaf protein from alfalfa juice : Optimization of operation conditions ». In : *Separation and Purification Technology* 175, p. 365–375 (cf. p. 104, 160).

ZHOU, X., Q.-H. SHI, S. BAI et Y. SUN (2004). « Dense pellicular agarose–glass beads for expanded bed application : : Fabrication and characterization for effective protein adsorption ». In : *Biochemical engineering journal* 18.2, p. 81–88 (cf. p. 123).

---

## Résumé —

La demande sociétale en protéines végétales a augmenté d'environ 50% durant la dernière décennie. Les nouvelles tendances alimentaires et l'intérêt pour leurs propriétés fonctionnelles font de ces protéines une alternative intéressante dans de nombreux secteurs industriels à moyenne et haute valeur ajoutée. Dans ce travail, l'extraction et purification d'une protéine végétale de propriétés technologiques spécifiques ont été étudiées.

Des travaux traitant la purification de la protéine ont été menés depuis plusieurs décennies. Cependant les techniques utilisées ont souvent un impact négatif sur sa qualité (précipitation ou coagulation thermique ou chimique) ou ne sont pas adaptées à une échelle industrielle en raison principalement des difficultés liées au changement d'échelle (chromatographie d'exclusion stérique), ou à la complexité et robustesse du procédé. Ainsi, malgré l'intérêt que cette protéine éveille, il n'existe pas encore à notre connaissance de procédé à l'échelle industrielle permettant sa production.

L'objet de cette thèse est de progresser dans l'étude d'un procédé simple et robuste permettant la mise au point d'une éco-filière de production de protéine. Le projet s'appuie sur des connaissances acquises dans le cadre de recherches précédentes, et a pour objectif d'étudier un procédé permettant de produire -à partir des plantes sélectionnées- une solution de protéine purifiée, de propriétés technologiques maîtrisées, dans un milieu tamponné à salinité contrôlée. Ce procédé comporte 3 étapes : une première étape de production d'un jus végétal clarifié à partir de différents matériaux végétaux, une deuxième étape d'extraction de la protéine par chromatographie d'échange d'ions et une dernière étape de purification et dessalement par ultrafiltration. Enfin, une nouvelle méthode d'analyse par interférométrie (Bio Layer Interférométrie, BLI) a été mise au point, afin de permettre un suivi efficace de la qualité de la protéine produite.

La production de jus a été étudiée à l'échelle pilote. Les rendements de production des jus dans une presse à vis et leur qualité se sont avérés très dépendants de la qualité des matières premières (comme définie dans le cadre de ce projet). Différentes méthodes de conservation des jus produits ont été examinées, dont le froid (4°C, 0°C et -20°C) et l'atomisation, ce dernier présentant l'avantage de réduire très fortement le volume de matière à stocker et d'assurer une bonne conservation des molécules.

L'étape de séparation chromatographique a été étudiée aux échelles du laboratoire et pilote, avec des jus issus de la luzerne. Une unité pilote a été conçue, mise au point et caractérisée pour l'étude. Au préalable, une étude permettant de sélectionner la résine la mieux adaptée à la séparation a été réalisée.

L'étape de séparation membranaire a été étudiée à l'échelle du laboratoire, et en mode diafiltration, afin de remplacer la solution initiale par une autre aux propriétés (pH et salinité) contrôlées, en mode frontal. Elle a permis de déterminer la densité de flux de matière minimale



que l'on peut espérer lors de la mise en place du procédé. La pression transmembranaire nécessaire a aussi été déterminée.

A chaque étape du procédé, l'étude de l'influence des conditions opératoires maîtrisables sur le procédé a été menée expérimentalement, et les principaux paramètres de dimensionnement dans les conditions de travail préconisées ont été déterminés. Enfin, certains verrous essentiels, comme la présence importante de polyphénols, sont abordés proposant quelques réponses adaptées pour éviter leurs interférences.

**Mots clés :** chromatographie, milieux complexes, protéine végétale, scale-up, procédés membranaires

---

---

## Abstract —

Social requirements for vegetal proteins increased almost by 50% in last decade. New food trends and their interesting functional properties make these proteins a preferential choice for industrial sectors of middle and high added value. In this work, extraction and purification of a vegetal protein of targetted technological properties have been studied.

The purification of this protein has been studied from various decades. Nevertheless, processes used (such as precipitation, or thermal or chemical coagulation) are often of negative impacts on protein quality. They also are not well adapted for industrialisation because of scale up difficulties (for example, in size exclusion chromatography), complexity, etc. Thus, even when the protein has stimulated a lot of works, currently there is no industrial process for its full-scale production.

The aim of this PhD Thesis is to contribute to the analysis of a simple and robust process able to favour an eco-industry for protein production. The objective is to study a process for the production of a solution (pH and salinity) of the purified protein of controlled technological properties, from selected green-plants. The process includes three principal steps : first, the production of a clarified green juice, second the protein capture by ion-exchange chromatography and finally, the purification and desalting of the solution by ultrafiltration. Moreover, a new analytical method by interferometry (Bio Layer Interferometry, BLI) has been developed, for quality control of the produced protein.

Juice production has been studied at pilot scale. The production yield and the juice quality obtained in a screw-press were strongly dependent on the quality of green biomass (as defined in this project). Different methods for juice conservation have been analysed, such as low temperatures (4°C, 0°C and -20°C), and spray-drying, which guarantee a good conservation of the molecules and reduces strongly the volume to be stocked.

Chromatographic separation has been studied at laboratory and pilot scales, by using green juice from alfalfa. A pilot plant unit has been designed, developed and characterised. Before, a study was conducted in order to select the best adapted ion-exchange resin for

protein extraction.

Membrane separation in frontal mode has been studied at laboratory scale for the purification and the desalting of the protein solution. The operation in diafiltration mode allows the progressive replacement of the initial solution by another of controlled pH and salinity. Thus, minimal flow density obtained has been measured. Transmembrane pressure has also been determined.

For each process step, the influence of experimental conditions that were controlled on the process has been studied, and most important parameters for process design at the experimental conditions proposed have been determined. Finally, this work has tried to contribute to the knowledge of some essential scientific weaknesses of these systems that are relied for example to the presence of polyphenols, and propose some adapted responses for limiting their interferences.

**Keywords :** chromatography, complex media, green protein, scale-up, membrane process