



**HAL**  
open science

# Maîtrise de la production d'hydrolysats protéiques d'intérêts en réacteurs enzymatiques à membranes

Nastassia Kaugarenia

► **To cite this version:**

Nastassia Kaugarenia. Maîtrise de la production d'hydrolysats protéiques d'intérêts en réacteurs enzymatiques à membranes. Génie des procédés. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0287 . tel-04680861v2

**HAL Id: tel-04680861**

**<https://theses.hal.science/tel-04680861v2>**

Submitted on 11 Sep 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.



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

*Ecole Doctorale : SIMPPE (Sciences et Ingénierie des Molécules, des Produits, des Procédés et de l'Energie)  
Laboratoire : LRGP (Laboratoire des Réactions et Génie des Procédés)*

## Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : GENIE DES PROCÉDÉS, DES PRODUITS ET DES MOLECULES**

par **Nastassia KAUGARENIA**

Sous la direction de **Romain KAPEL** et **François LESAGE**

# **Maîtrise de la production d'hydrolysats protéiques d'intérêts en réacteurs enzymatiques à membranes**

Soutenu le **29 septembre 2023**

### **Membres du jury :**

<b>Directeur de thèse :</b>	M. Romain KAPEL	<i>Professeur des Universités, LRGP, Université de Lorraine, Nancy</i>
<b>Co-Directeur de thèse :</b>	M. François LESAGE	<i>Maître de conférences, LRGP, Université de Lorraine, Nancy</i>
<b>Rapporteuses :</b>	Mme Geneviève GESAN- GUIZIOU	<i>Directrice de recherche, STLO, INRAE, Rennes</i>
	Mme Loubna FIRDAOUS- SAHEB	<i>Maître de conférences, ICV, Université de Lille, Lille</i>
<b>Présidente de jury :</b>	Mme Christel CAUSSERAND- ALEXANDROVITCH	<i>Professeur des Universités, LGC, Université de Toulouse, Toulouse</i>
<b>Examineurs :</b>	M. Laurent BAZINET	<i>Professeur titulaire, LTA-PEM, Université de Laval, Québec</i>
	M. Pierre VILLENEUVE	<i>Directeur de recherche, CIRAD- QUALISUD, Montpellier</i>
<b>Invitée :</b>	Mme Sophie BEAUBIER	<i>Maître de conférences, LRGP, Université de Lorraine, Nancy</i>



*Je ne serais pas très longue, en remerciant simplement tous ceux et toutes celles qui m'ont aidée et accompagnée avec bienveillance, grâce à leurs compétences et leur soutien.*

*D'abord mes chères collègues sur la plateforme de SVS, cachée au milieu de la forêt de Brabois : Luna, Odile, Tuong, Fatima, Jules, Sara, Sophie, Arnaud, Xavier (la majorité l'emporte !).*

*Une mention spéciale pour Sophie (psychologue et décoratrice d'intérieur à ses heures perdues), qui a eu l'immense chance de me supporter le plus, que ce soit pour des questions techniques, des brouillages administratifs ou pour revoir mes gribouillages. Chapeau et merci !*

*Je remercie bien évidemment mes directeurs, M. Kapel Romain et M. Lesage François, qui ont bien voulu me confier ce projet, et qui, malgré leurs emplois du temps chargés, étaient là quand j'en avais besoin pour répondre à mes questions, débloquer les divers problèmes techniques et corriger mes expressions écrites.*

*Et puisque il n'y a jamais assez de lauriers pour un empereur Romain (hahaha trop fière de ma blague), je remercie plus particulièrement mon directeur de thèse (qui se serait reconnu, j'espère), pour son encadrement, ses conseils et son énergie pour sortir des blocages de décisions et situations critiques. En travaillant sur des modèles, j'ai aussi eu un modèle d'esprit optimiste et combatif à toute épreuve dans un milieu hostile où il faut savoir tout, prévoir tout et s'adapter aux pléthores imprévus. Merci d'avoir cru en moi et j'espère qu'un jour j'aurais autant d'assurance 😊.*

*Je remercie également Mme Christel Causserand-Alexandrovitch et M. Renato Froidevaux, de mon comité de suivi de thèse, qui m'ont confortée dans la réalisation des travaux et m'ont donné de précieux conseils.*

*Enfin, je remercie le jury qui a bien voulu évaluer mon travail en cette période de vacances : Mme Geneviève Gésan-Guizou, Mme Loubna Firdaous-Saheb, Mme Christel Causserand-Alexandrovitch (encore une fois), M. Laurent Bazinet, M. Pierre Villeneuve et Mme Sophie Beaubier (encore une fois aussi).*

*W.K.H*

*The saddest aspect of life right now is that science gathers knowledge faster than society gathers wisdom.*

Asaac Asimov

*If we know what it was were going, it would not be called research, would it?*

Albert Einstein

*An expert is a person who has made all mistakes that can be made in a very narrow field.*

Niels Bohr

*The good thing about science is that it's true whether or not you believe it.*

Niel DeGrasse

## Abréviations

### A

**AA** : Acide(s) aminé(s)

**ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

**ACE** : Angiotensine-Converting-Enzyme (en français « enzyme de conversion de l'angiotensine »)

**AG** : Algorithme(s) génétique(s)

**$\alpha$ -La** :  $\alpha$ -Lactalbumine

**AMP** : Anti-Microbial Peptide (en français « peptide antimicrobien »)

**ANOVA** : ANalysis Of VAriance (en français « analyse de variance »)

**ATP** : Adénosine Triphosphate

### B

**$\beta$ -Lg** :  $\beta$ -Lactoglobuline

**BHA** : Butylhydroxyanisole

**BHT** : Butylhydroxytoluène

### C

**CD** : Concentration discontinue

**CES** : Chromatographie d'Exclusion Stérique

**CLHP-ES** : Chromatographie Liquide de Haute Performance d'Exclusion Stérique

**CMP** : Caséinomacropéptide

**CSTR** : Continuous Stirring Tank Reactor (en français « réacteur à cuve agitée en continu »)

**CPL** : Concentrat protéique de lait

**Cruc** : Cruciférine

### D

**DE** : Dextrose équivalent

**DF** : Diafiltration

**DLS** : Dynamic Light Scattering (en français « diffusion dynamique de lumière »)

**DoE** : Design of Experiments (en français « plan d'expériences »)

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

### E

**EC** : Enzyme Classification (en français « classification enzymatique »)

**EC<sub>50</sub>** : Half maximal Effective Concentration (en français « concentration efficace médiane »)

**ED** : Etude Bibliographique

**EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique

## I

**IPS** : Isolat protéique de soja

## F

**FRAP** : Ferric Reducing Antioxidant Power [Assay] (en français « dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique »)

**FWHM** : Full Width at Half Maximum (en français « largeur à la mi-hauteur du maximum »)

## G

**g** : gramme(s)

## H

**HAT** : Hydrogen Atom Transfer (en français « transfert d'atome d'hydrogène »)

**h** : heure(s)

## L

**L** : Litre(s)

## M

**m** : mètre(s)

**min** : minute(s)

**MF** : Microfiltration

**M&M** : Matériel et méthodes

**M-M** : Michaelis-Menten

**MPC** : Model predictive control (en français Contrôle « Prédictif basé sur le Modèle »)

**MWCO** : Molecular Weight Cut-Off (en français « seuil de coupure de poids moléculaire »)

## N

**Nap** : Napine

**nb** : Nombre

**nr** : nombre de réplicats

**NF** : Nanofiltration

**nm** : nanomètre

**NMWC**O : Nominal Molecular Weight Cut-Off (en français « seuil de coupure de poids moléculaire nominal »)

## O

**OI** : Osmose inverse

**ORAC** : Oxygen Radical Absorbance Capacity (en français « capacité d'absorption des radicaux oxygénés »)

## P

**Pa** : Pascale(s) (unité de mesure de la pression)

**PES** : Polyéthersulfone

**PID** : Proportionnel, Integral, Dérivé (système de contrôle)

**PS** : Polysulfone

**PTC** : Protéines totales de colza

## R

**RSD** : Relative Standard Deviation (en français « variation relative standard »)

**REM** : Réacteur Enzymatique à membrane

**R&D** : Résultats et Discussion

**ROS** : Reactive Oxygen Species (en français « espèces réactives de l'oxygène »)

**RNS** : Reactive Nitrogen Species (en français « espèces réactives de l'azote »)

**RTO** : Real Time Optimization (en français « Optimisation en Temps Réel »)

## S

**SET** : Single Electron Transfer (en français « transfert d'électron unique »)

**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (en français « électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium »)

**SRM** : Surface Response Methodology (en français « méthodologie de surface de réponse »)

**s** : seconde(s)

## T

**TBHQ** : Tert-butylhydroquinone

**TFA** : Trifluoroacetic acid (en français « acide trifluoroacétique »)

## U

**UF** : Ultrafiltration

## Notations et symboles

Notation ou symbole	Signification	Unité
$\alpha$ ou $\alpha_x$	Coefficient quelconque	Unité adéquate
$A$ ou $Abs$	Absorbance	Sans unité (-)
$C$	Concentration molaire ou massique (selon le contexte)	$mol.m^{-3}$ , ou $mol.L^{-1}$ ou $g.L^{-1}$
$C_m$	Concentration à la membrane	
$C_p$	Concentration dans le perméat	
$C_r$	Concentration dans le rétentat	
$C_{min}$	Concentration minimale	
$C_{Pep}$	Concentration peptidique	
$Conso_{eau}$	Consommation en eau (perméat sorti) au cours du procédé de filtration (CD, DF ou REM)	$L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$
$D$	Coefficient de diffusion	$m^2 \cdot s^{-1}$
$\delta$	Epaisseur de la couche limite	$m$
$DH$	Degré d'hydrolyse	%
$d_h$	Diamètre hydrolique	$m$
$DV$	Diavolume	(-)
$\varepsilon$	Coefficient d'extinction molaire ou de masse (précisé en fonction du contexte)	$L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ou $M^{-1}.cm^{-1}$ ou $L.g^{-1}.cm^{-1}$
$E/S$	Ratio masse enzyme sur masse substrat	$g_E \cdot g_S^{-1}$ ou sans unité (-)
$E$	Enzyme : quantité ou concentration molaire ou massique (selon contexte)	$g$ ou $g.L^{-1}$ ou $mol.L^{-1}$
$\eta$	Facteur de Lorentz	(-)
$FRV$	Facteur de réduction volumique	(-)
$f$	FWHM global (calcul fonction de pseudo-Voigt)	(-)
$f_G$	FWHM fonction de Gauss	(-)
$f_L$	FWHM fonction de Lorentz	(-)
$G(x, f)$	Fonction de Gauss	(-)
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement	$s^{-1}$
$J_{flux}$	Flux de perméat	$L.h^{-1}.m^{-2}$ ou $m^3.m^{-2}.s^{-1}$ ou $m.s^{-1}$
$J_{lim}$	Flux de perméat limite	
$J_{stat}$	Flux de perméat stationnaire	
$\kappa$	Capacité de réacteur	$g_{Pep} \cdot min^{-1} \cdot g_E^{-1}$
$Ka$	Constante de dissociations acide	$mol.L^{-1}$

Notation ou symbole	Signification	Unité
$k_B$	Constante de Boltzmann	$1,380649 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$
$k_C$	Constante cinétique protéique	$\text{h}^{-1}$
$k_{cl}$	Coefficient de transfert de matière du soluté	$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
$K_m$	Constante de Michaelis	$\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$
$K_{pe}$	Coefficient pré-exponentiel regroupant la fréquence de collision et le facteur stérique entre l'enzyme et son substrat	$\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_x$	Constante cinétique d'un composant $x$ . Ou numérotation distinctive entre les différentes constantes.	$\text{s}^{-1}$ ou $\text{h}^{-1}$
$L(x, f)$	Fonction de Lorentz	(-)
$L_p$	Coefficient de perméabilité	$\text{m}$
$L_d$	Distance parcourue par le liquide dans le module de filtration	$\text{m}$
$l$	Longueur du trajet optique	$\text{cm}$
$\mu$	Viscosité du perméat	$\text{Pa} \cdot \text{s}$
$MM$	Masse molaire	$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
$M$	Molarité	$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
$m_x$	Masse d'un composé $x$	
$n_{aa}$	Quantité de matière d'acides aminés	<i>mole</i>
$n_p$	Quantité de matière de peptides	<i>mole</i>
$\overline{Naa}$	Nombre d'acides aminés moyen	(-)
$P$	Produit (d'hydrolyse)	$\text{g}$ ou $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
$Pe_{cl}$	Nombre de Peclet	Adimensionnel
$\text{ppm}$	Partie par million	$1,0 \times 10^{-6}$
$Pep$	Peptides	$\text{g}$ ou $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ou $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
$pH$	Potentiel Hydrogène	(-)
$\Pi$	Pression osmotique	<i>bar</i> ou <i>Pa</i>
$pKa$	Potentiel de constante de dissociation $K_a$	(-)
$\Delta P$ ou $PTM$	Pression transmembranaire	<i>bar</i> ou <i>Pa</i>
$Pr_{REM}$	Productivité/Performance en peptides en REM	$g_{Pep} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ou $g_{Pep} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ou $g_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$
$Pur_{r,x}$	Pureté d'un composé $x$ dans le rétentat	%
$Pur_{p,x}$	Pureté d'un composé $x$ dans le perméat	%
$p/v$	Rapport poids/volume	$\text{g/mL}$ ou %
$Q_v$	Débit d'élution en CLHP-ES	$\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Notation ou symbole	Signification	Unité
$Q_G$ ou $Q_A$ ou $Q_R$	Débit de la pompe de gavage (alimentation rétentat vers le bac de la solution à filtrer)	$L.h^{-1}$ ou $ml.min^{-1}$ ou $m^3.s^{-1}$
$Q_a$	Débit de la solution d'ajout	
$Q_p$	Débit du perméat	
$\mathcal{R}$	Constante molaire des gaz parfaits	$J.K^{-1}.mol^{-1}$
$Rdm_{p,x}$	Rendement d'un composé $x$ dans le perméat	(-)
$Rdm_{r,x}$	Rendement d'un composé $x$ dans le rétentat	(-)
$Re$	Nombre de Reynolds	Adimensionnel
$\rho$	Masse volumique	$kg.m^{-3}$
$Res_{ads}$	Résistance membranaire due à l'adsorption	$m^{-1}$
$Res_{encr}$	Résistance membranaire due à l'encrassement ou au colmatage	
$Res_{pl}$	Résistance membranaire due à la couche de polarisation	
$Res_m$	Résistance membranaire intrinsèque	
$R$	Rétention ou taux de rétention	(-)
$R_{obs}$	Rétention observée	
$R_{réel}$	Rétention réelle à la membrane	
$R_L$	Matrice résiduelle	(-)
$r$	Rayon	$m$
$r_h$	Rayon hydrodynamique	$m$
$r_x$	Taux de réaction d'un réactif $x$	$g.h^{-1}$ ou $mol.h^{-1}$
$rpm$	Rotations par minute	(-)
$S$	Substrat : quantité ou concentration molaire ou massique (selon contexte)	$g$ ou $g.L^{-1}$ ou $mol.L^{-1}$
$Sc$	Nombre de Schmidt	Adimensionnel
$Sh$	Nombre de Sherwood	Adimensionnel
$STY$	Rendement espace-temps REM	$g_{Pep}.L^{-1}.h^{-1}$
$Surf$	Surface	$m^2$
$\tau_{p,x}$	Enrichissement en un composé $x$ dans le perméat	(-)
$\tau_{r,x}$	Enrichissement en un composé $x$ dans le rétentat	(-)
$\tau_{REM}$	Espace-temps REM	$g_E.g_{Pep}^{-1}.h^{-1}$
$T$	Température	°C (degré Celsius) ou K (Kelvin)

Notation ou symbole	Signification	Unité
$TR$	Temps de retention (exclusion stérique)	<i>min</i>
$t$	Temps	<i>s, min</i> ou <i>h</i>
$t_s$	Temps de séjour/passage REM	<i>min</i> ou <i>h</i>
$Tr_{obs}$	Transmission observée (filtration)	(-)
$U$	Débit moyen dans le module de filtration ou vitesse du fluide	$L \cdot h^{-1}$ ou $ml \cdot min^{-1}$ ou $m^3 \cdot s^{-1}$
$UPAC$	Unités Anson en conditions acides	$A_{280}$ sur 10 minutes de réaction
$V$	Volume	<i>mL</i> ou <i>L</i> ou $m^3$
$v/v/v$	Ratio volume pour volume pour volume	
$V_{max}$	Vitesse de réaction enzymatique maximale ou limite	$s^{-1}$
$VR$	Volume de remplacement en REM	(-)
$V_p$	Volume du perméat	<i>mL</i> ou <i>L</i> ou $m^3$
$V_P(x, f)$	Fonction pseudo-Voigt	(-)
$V_r$	Volume du rétentat	<i>mL</i> ou <i>L</i> ou $m^3$
$V_{ing}$	Volume injecté pour l'élution en CLHP-ES	$\mu L$
$[X]$	Concentration molaire ou massique d'une substance X (selon contexte)	$mol \cdot L^{-1}$ ou $g \cdot L^{-1}$
$X_L$	Notation d'une colonne ou d'une matrice de sensibilité du (des) paramètre(s) influent(s) à l'itération $L$	(-)
$X_L^T$	Transposée de $X_L$	(-)
$Xp$	Conversion protéique	%
$Xp_{max}$	Conversion protéique maximale atteignable	%
$X_0$	Etat initial d'une notion X	Unité de la notion
$xg$	Multiplication de la force g (centrifugation)	$9,81 m \cdot s^{-2}$
$Y_{N/EREM}$	Index de rendement enzymatique	$g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$
$Z$	Matrice de sensibilité	(-)
$\hat{Z}_L$	Matrice de sensibilité prédite à l'itération $L$	(-)

Liste des acides aminés, leur notation et leurs caractéristiques. Cas spécial : pas de consensus sur la caractérisation, résultats divergeants en fonction des conditions de l'expérience (libre, lié).

Nom acide aminé	Code 3 lettres	Code 1 lettre	Essentiels	Chaîne latérale hydrophobe	Chaîne latérale polaire
Alanine	Ala	A		✓	
Arginine	Arg	R			✓
Asparagine	Asp	N			✓
Aspartate	Asn	D			✓
Cystéine	Cys	C		Cas spécial	
Glutamate	Glu	E			✓
Glutamine	Gln	Q			✓
Glycine	Gly	G		Cas spécial	
Histidine	His	H	✓		✓
Isoleusine	Iso	I	✓	✓	
Leucine	Leu	L	✓	✓	
Lysine	Lys	K	✓		✓
Méthionine	Met	M	✓	✓	
Phénylalanine	Phe	F	✓	✓	
Proline	Pro	P		Cas spécial	
Sérine	Ser	S			✓
Thréonine	Thr	T	✓		✓
Tryptophane	Trp	W	✓	✓	
Tyrosine	Tyr	Y		✓	
Valine	Val	V	✓	✓	

# Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Objectif de la thèse .....</b>	<b>5</b>
<b>I. Etude bibliographique.....</b>	<b>7</b>
<b>I.1. Les hydrolysats protéiques .....</b>	<b>7</b>
I.1.1. Intérêt et source des hydrolysats protéiques .....	7
I.1.2. Obtention des hydrolysats protéiques par protéolyse enzymatique .....	9
I.1.3. Propriétés des hydrolysats protéiques en alimentation humaine .....	12
I.1.3.1. Propriétés nutritionnelles des hydrolysats protéiques .....	12
I.1.3.2. Diminution de l'allergénicité .....	13
I.1.3.3. Propriétés organoleptiques.....	14
I.1.3.4. Propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques .....	14
I.1.3.4.1. Propriétés d'hydratation .....	15
I.1.3.4.2. Propriétés de surface.....	15
I.1.3.4.3. Propriétés texturantes .....	16
I.1.4. Caractérisation des hydrolysats protéiques .....	17
I.1.5. Génération de peptides bioactifs .....	18
I.1.5.1. Définition et variété des peptides bioactifs .....	19
I.1.5.2. Application en sécurité alimentaire .....	19
I.1.5.2.1. Peptides antimicrobiens.....	20
I.1.5.2.2. Peptides antioxydants .....	22
<b>I.2. La protéolyse enzymatique .....</b>	<b>29</b>
I.2.1. Les conditions opératoires de la protéolyse enzymatique .....	29
I.2.1.1. Le pH .....	29
I.2.1.2. La température.....	31
I.2.1.3. Concentrations enzyme et substrat.....	33
I.2.1.3.1. Loi d'action des masses.....	33
I.2.1.3.2. Conséquence sur le mécanisme enzymatique .....	34
I.2.1.3.3. Mécanismes spécifiques des protéases .....	36
I.2.1.3.4. Influence sur les propriétés fonctionnelles .....	38
I.2.2. Mise en œuvre de la protéolyse en réacteurs .....	39
I.2.3. Les cinétiques de protéolyse enzymatique, modélisation et optimisation.....	41
I.2.3.1. Modèles mécanistiques : la référence, Michaelis-Menten .....	41
I.2.3.1.1. Le degré d'hydrolyse .....	44
I.2.3.1.2. Le taux de conversion protéique.....	44
I.2.3.2. Limites du modèle M-M, retour aux cinétiques formelles.....	44

I.2.3.3.	<i>Modèles empiriques : Surface de réponse</i> .....	47
I.2.3.4.	<i>Modèles hybrides</i> .....	48
I.2.3.5.	<i>Modèles empiriques : Equations différentielles</i> .....	48
I.2.3.6.	<i>Optimisation économique multicritère</i> .....	52
<b>I.3.</b>	<b>Filtration membranaire</b> .....	<b>54</b>
I.3.1.	Notions et mécanismes de base.....	54
I.3.1.1.	<i>Flux de perméation</i> .....	55
I.3.1.2.	<i>Transport de solutés</i> .....	56
I.3.2.	Classification des techniques de séparation membranaire .....	57
I.3.3.	Géométrie et matériaux.....	58
I.3.4.	Lois de comportements et phénomènes associés .....	60
I.3.4.1.	<i>Polarisation de concentration</i> .....	60
I.3.4.2.	<i>Encrassement et colmatage</i> .....	62
I.3.5.	Modes de mise en œuvre .....	64
I.3.5.1.	<i>Pression transmembranaire et flux de perméat</i> .....	64
I.3.5.2.	<i>Concentration discontinue</i> .....	64
I.3.5.3.	<i>Diafiltration à volume constant</i> .....	65
I.3.6.	Suivi de performances .....	66
I.3.7.	Applications pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques.....	67
I.3.8.	Modélisation de la séparation membranaire .....	73
I.3.8.1.	<i>Modélisation du flux de perméat</i> .....	73
I.3.8.2.	<i>Modélisation de la concentration des constituants d'un mélange en UF</i> .....	75
I.3.8.2.1.	<i>Rétention observée</i> .....	75
I.3.8.2.2.	<i>Rétention réelle</i> .....	77
<b>I.4.</b>	<b>Réacteurs enzymatiques à membrane</b> .....	<b>80</b>
I.4.1.	Généralités .....	80
I.4.1.1.	<i>Principe et intérêts</i> .....	80
I.4.1.2.	<i>Classifications des réacteurs</i> .....	82
I.4.2.	Applications des REM.....	85
I.4.3.	Performances des REM .....	96
I.4.4.	Modélisation et optimisation des REM protéolytiques .....	99
<b>II.</b>	<b>Matériels et Méthodes</b> .....	<b>105</b>
<b>II.1.</b>	<b>Matériels et réactifs</b> .....	<b>105</b>
<b>II.2.</b>	<b>Hydrolyses enzymatiques</b> .....	<b>106</b>
II.2.1.	Hydrolyse sélective non-optimale.....	106
II.2.2.	Ultrafiltration de l'hydrolysats non-optimal.....	106
II.2.3.	Hydrolyse pour l'étude du mécanisme .....	107
II.2.4.	Hydrolyse pour la modélisation cinétique (plan d'expériences).....	107

II.2.5.	Hydrolyse de validation du plan d'expériences .....	107
II.2.6.	Hydrolyse dans les conditions optimales de Pareto .....	107
II.2.6.1.	Conditions de temps de réaction final de 2 heures .....	107
II.2.6.2.	Cinétique de temps de réaction final de 50 minutes .....	108
<b>II.3.</b>	<b>Modélisation – Optimisation hydrolyse.....</b>	<b>108</b>
II.3.1.	Modélisation hybride de l'hydrolyse .....	108
II.3.2.	Modélisation de la déplétion protéique.....	109
II.3.3.	Optimisation multicritère .....	110
II.3.3.1.	Algorithme génético-évolutionnaire .....	110
II.3.3.2.	Choix de la meilleure solution par la méthode « min-max » .....	111
<b>II.4.</b>	<b>Méthodes analytiques.....</b>	<b>112</b>
II.4.1.	Calibration colonne CLHP-ES.....	112
II.4.2.	Analyse CLHP des protéines et peptides .....	113
II.4.3.	Quantification et qualification des protéines .....	113
II.4.4.	Quantification et qualification des hydrolysats.....	114
II.4.5.	Transformation des concentrations modélisées en chromatogrammes .....	117
<b>II.5.</b>	<b>Mesure d'activité chélatrice ion fer (II) .....</b>	<b>119</b>
<b>II.6.</b>	<b>Criblage de l'ultrafiltration.....</b>	<b>119</b>
II.6.1.	Détermination des résistances.....	119
II.6.1.1.	Résistance membranaire intrinsèque.....	119
II.6.1.2.	Résistance de la couche de polarisation.....	120
II.6.2.	Calibration de la rétention des fibres creuses.....	121
II.6.2.1.	Rétention observée mesurée.....	122
II.6.2.2.	Rétention réelle calculée.....	122
II.6.2.3.	Mesure de la viscosité.....	124
II.6.3.	Mise en œuvre de l'ultrafiltration .....	124
II.6.3.1.	Mode concentration discontinue.....	124
II.6.3.2.	Mode diafiltration à volume constant .....	125
II.6.4.	Modélisation du flux de perméat en REM à <i>PTM</i> constante.....	125
<b>II.7.</b>	<b>Prédiction des performances d'ultrafiltration .....</b>	<b>126</b>
II.7.1.	Equations de bilan de matière .....	126
II.7.2.	Comparaisons des chromatogrammes.....	129
II.7.3.	Calcul des caractéristiques d'UF .....	131
<b>II.8.</b>	<b>Détermination de la taille des composants.....</b>	<b>132</b>
II.8.1.	Diffusion dynamique de lumière .....	132
II.8.2.	SDS-PAGE .....	132
<b>II.9.</b>	<b>Mise en œuvre du REM .....</b>	<b>132</b>

II.9.1.	Détermination de l'activité enzymatique dans le perméat .....	132
II.9.2.	Montage du réacteur enzymatique à membrane .....	133
II.9.3.	Valeurs de caractérisation du REM .....	135
II.9.4.	Analyse de sensibilité du modèle protéolytique .....	136
<b>II.10.</b>	<b>Tests statistiques.....</b>	<b>137</b>
<b>III.</b>	<b>Résultats &amp; Discussion.....</b>	<b>139</b>
<b>III.1.</b>	<b>Modélisation et optimisation de la protéolyse enzymatique <i>batch</i> .....</b>	<b>142</b>
III.1.1.	Optimisation des conditions d'obtention de l'hydrolysate d'intérêt en <i>batch</i> .....	145
III.1.1.1.	<i>Description de l'hydrolysate d'intérêt .....</i>	<i>145</i>
III.1.1.2.	<i>Hypothèses et méthodologie.....</i>	<i>146</i>
III.1.1.3.	<i>Criblage des conditions opératoires.....</i>	<i>147</i>
III.1.2.	Modélisation de la cinétique d'hydrolyse .....	152
III.1.2.1.	<i>Analyse du plan d'expériences .....</i>	<i>153</i>
III.1.2.2.	<i>Régression du modèle cinétique modifié du second ordre.....</i>	<i>154</i>
III.1.2.3.	<i>Modélisation du paramètre <math>k_C</math> en fonction des conditions opératoires .....</i>	<i>155</i>
III.1.3.	Identification de la condition optimale (compromis coût / durée) .....	158
<b>III.2.</b>	<b>Modélisation de la séparation des hydrolysates par fractionnement membranaire en ultrafiltration.....</b>	<b>162</b>
III.2.1.	Sélection du seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration.....	165
III.2.1.1.	<i>Effet du seuil de coupure .....</i>	<i>165</i>
III.2.1.1.1.	Les rétentions de la napine et des peptides totaux.....	165
III.2.1.1.2.	La rétention de la napine, analyse de la taille des agrégats .....	167
III.2.1.1.3.	Les flux de perméat et l'effet de polarisation de concentration.....	168
III.2.1.1.4.	La sélectivité de séparation des peptides.....	170
III.2.1.2.	<i>Influence de la PTM et de la vitesse de recirculation .....</i>	<i>172</i>
III.2.1.2.1.	La rétention de la napine et des peptides totaux.....	172
III.2.1.2.2.	Le flux de perméat et l'effet de polarisation de concentration .....	174
III.2.1.2.3.	La sélectivité de séparation des peptides.....	178
III.2.2.	Comparaisons des performances : concentration discontinue vs diafiltration .....	180
III.2.2.1.	<i>Séparation des napines et des peptides en CD et DF .....</i>	<i>181</i>
III.2.2.1.1.	Evolution des chromatogrammes massiques.....	181
III.2.2.1.2.	Pureté protéines et rendement napine .....	185
III.2.2.2.	<i>Evolution des performances au cours des fractionnements en CD et DF .....</i>	<i>186</i>
III.2.2.2.1.	Flux de perméat .....	186
III.2.2.2.2.	Productivité et ratio eau/peptides .....	188
III.2.2.2.3.	Comparaisons croisées des performances .....	189
<b>III.3.</b>	<b>Développement de l'outil de simulation d'un REM .....</b>	<b>193</b>
III.3.1.	Etude de la rétention de la ProlyvePAC® par la membrane .....	196
III.3.1.1.	<i>Détermination de la taille de l'enzyme.....</i>	<i>196</i>

III.3.1.2. Etude de l'activité dans le perméat .....	197
III.3.2. Comparaisons des mises en œuvre en CD, DF et REM.....	198
III.3.3. Comparaisons de deux modes de REM : flux constant vs variable.....	202
III.3.4. Production des peptides chélateurs .....	206
III.3.5. Modélisation des REM .....	207
III.3.5.1. Ecriture des équations - Hydrolyse .....	207
III.3.5.2. Transformation des concentrations simulées en chromatogrammes.....	213
III.3.5.3. Modélisation des fractionnements en UF.....	216
III.3.5.4. Ecriture des équations – Hydrolyse et séparation membranaire .....	219
III.3.5.5. Validation de la modélisation du REM par bilan de masse.....	222
III.3.5.6. Validation du modèle par les grandeurs de caractérisation .....	228
III.3.6. Simulations : exemple d'application sur la durée de pré-hydrolyse .....	231
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>239</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>241</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>280</b>

## Table des illustrations

Figure 1 : Schématisation de l'hydrolyse d'une protéine (sous forme monomérique ou multimérique) résultant en un hydrolysate composé de peptides et acides aminés libres.....	7
Figure 2 : Nombre de publications par an sur la recherche de peptides antimicrobiens et antioxydants pour l'application en alimentation (données issues de Web of Sciences). .....	20
Figure 3 : Mécanismes proposés de HAT et SET de stabilisation des radicaux par les résidus d'acides aminés (Esfandi et al. 2019). (A) Tyrosine. (B) Cystéine. (C) Histidine. ....	24
Figure 4 : Chélation d'un cation métallique (symbolisé par la lettre M) par l'EDTA (Li et al. 2020).....	25
Figure 5 : Mécanisme proposé de chélation par les peptides. (A) Repliement des peptides DHHQ permettant un rapprochement des doublets d'électrons autour du cation métallique avec quatre liaisons. (B) Piégeage entre deux peptides ayant des résidus d'histidine permettant quatre liaisons. ....	27
Figure 6 : Mécanisme catalytique proposé des protéases à acide aspartique (Theron & Divol 2014). R : chaîne du peptide 1. R' : chaîne du peptide 2. (A) Liaison à une molécule d'eau et attaque nucléophile sur le carbonyle de la liaison peptidique. (B) Formation d'un intermédiaire tétraèdre stabilisé par les liaisons hydrogènes (traits pointillés) à l'Asp <sub>32</sub> chargé négativement. (C) Le proton lié à l'atome d'oxygène attaquant est cédé à l'atome d'oxygène de l'Asp <sub>32</sub> , et inversion de configuration de l'azote de la liaison peptidique par la donation d'un hydrogène par l'Asp <sub>215</sub> . (D) Libération des peptides formés et l'Asp <sub>215</sub> est régénéré avec une charge négative pour un nouveau cycle. ....	31
Figure 7 : Schématisation des mécanismes théoriques rencontrés en protéolyse : (A) one-by-one et (B) zipper. Adapté de (Adler-Nissen 1976). ....	37
Figure 8 : Exemple de cinétique d'évolution des concentrations des peptides lors d'un mécanisme (A) one-by-one et (B) zipper. Valeurs arbitraires. ....	38
Figure 9 : Illustration d'une protéolyse enzymatique en batch. Dans cet exemple, le mélange est assuré par la rotation d'un barreau aimanté, le maintien de la température par un réacteur avec une double paroi contenant l'eau continuellement chauffée et le suivi de la réaction ainsi que le maintien du pH constant est réalisé par l'ajout de HCl ou NaOH. ....	40
Figure 10 : Représentation schématique de la protéolyse enzymatique et le principe de la titration par le pH-stat aux pH acides et basiques. P1 et P2: résidus peptidiques des deux côtés de la coupure. (Mat et al. 2018). .....	40
Figure 11 : Première lecture : (A) Evolution de concentration d'un (des) produit(s) issu(s) d'une réaction enzymatique hypothétique (croix noires), comparée aux réactions d'ordre 1 (tirets rouges) et 2 (petits tirets bleus) avec $S_0 = 5$ et $k = 0.2$ . Deuxième lecture : (B) ① Début de formation des produits, activité pré-stationnaire, non-linéaire. (A) ② Activité stationnaire. ③ Ralentissement de l'activité et atteinte d'un plateau, concentration totale du produit formé. Adapté de (Cornish-Bowden et al. 2005; Bisswanger 2011) .....	45

Figure 12 : Simulation de réactions de transformation de réactifs, supposées d'ordre 1. (A) Réactif A en produit B, avec $k_1 = 0,5$ et $[A]_0=5$ . (B) Réactif A en B puis en C, avec $k_1= 0,5$ , $k_2 = 0,33$ et $[A]_0=5$ . Les valeurs sont arbitraires. ....	51
Figure 13 : (A) Illustration du principe de la filtration tangentielle, avec $Q_A$ le débit d'alimentation de la solution à traiter, qui est divisé en deux, en $Q_P$ , le débit traversant la membrane, formant le débit de perméat, et $Q_R$ le débit ne traversant pas la membrane et formant le débit de rétentat. (B) Conséquence de la filtration tangentielle sur le dépôt des composés retenus sur la membrane et sur le débit de perméat (débit de filtration) (Aimar et al. 2010a; Rios 2012).....	55
Figure 14 : Courbes de tamisage. Rétention calculée selon la loi de Ferry pour un soluté supposé sphérique pour une membrane supposée homopore (pores uniformes) avec et sans interactions électrostatiques (Aimar 2006). ....	57
Figure 15 : Techniques de séparation en fonction de la taille des particules (Aimar et al. 2010a). ....	58
Figure 16 : Schéma des différents modules de filtration (Millipore corporation). ....	59
Figure 17 : Formation de la couche de polarisation dans une membrane tubulaire (Aimar et al. 2010a). ....	61
Figure 18 : Représentation de la polarisation par (A) la théorie du film, (B) la théorie du gel. $U$ est la vitesse moyenne de la solution d'alimentation (rétentat) (Aimar et al. 2010b). ....	61
Figure 19 : Principaux mécanismes d'encrassement de membranes (Aimar et al. 2010a) .....	63
Figure 20 : Schématisation d'une installation fonctionnant en concentration discontinue pour la séparation des protéines et peptides. Adapté d'après (Aimar 2006). ....	65
Figure 21 : Schématisation d'une installation fonctionnant en diafiltration pour la séparation des protéines et des peptides. Adapté d'après (Aimar 2006). ....	66
Figure 22 : Schématisation de l'effet de polarisation et du colmatage sur le flux du perméat en fonction de la PTM (Aimar et al. 2010b). ....	74
Figure 23 : Illustration d'un réacteur enzymatique à membrane en flux latéral pour la protéolyse continue. ....	80
Figure 24 : Classification des réacteurs à membrane par la fonctionnalité de leurs composants. Adapté de (Fontanova & Drioli 2010). ....	84
Figure 25 : Représentation du domaine du plan d'expérience. N1-12 : les numéros des différentes expériences et leur position sur le domaine étudié. ....	108
Figure 26 : Schéma de l'approche « min-max » (Belegundu & Chandrupatla 2019). ....	112
Figure 27 : Calibration de la colonne CLHP-ES Biosep-SEC-s2000 avec 38 peptides de synthèse. ....	113
Figure 28 : Méthodologie de transformation du chromatogramme en concentration permettant des quantifications et caractérisation d'hydrolysats protéiques en hydrolyse batch, ultrafiltration, et réacteur enzymatique à membrane. ....	117

<i>Figure 29 : Méthodologie générale de représentation cinétique d'un l'hydrolysats par chromatogramme. Cruc : Cruciférine. <math>k_C</math> : Constante de déplétion de la protéine (cruciférine). <math>P_i</math> : Peptide intermédiaire. <math>P_f</math> : Peptide final. <math>k_i</math> : Constante d'apparition des peptides intermédiaires à partir de la cruciférine. <math>k_f</math> : Constante d'apparition des peptides finaux à partir de la cruciférine. <math>k_d</math> : Constante de disparition des peptides intermédiaires au profit des peptides finaux. <math>k_g</math> : Constante d'agrégation de la cruciférine (cruciférine non-hydrolysable).....</i>	<i>118</i>
<i>Figure 30 : Exemple de calcul de la rétention réelle sur la membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup>. (A) Ajustement du modèle sigmoïde sur les rétentions observées des différents groupes de peptides et protéines. (B) Rétention réelle calculée pour toutes les masses molaires présentes dans l'hydrolysats. ....</i>	<i>129</i>
<i>Figure 31 : Chromatogrammes de la membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup> en mode concentration discontinue (FRV 2 à 8), modélisés et expérimentaux (nr = 2) pour l'hydrolysats optimal produit (PTM 2 bar – 3000 s<sup>-1</sup> – pH3 – 55°C). (A) Rétentat modélisé. (B) Perméat modélisé. (C) Rétentat expérimental. (D) Perméat expérimental.....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 32 : Chromatogrammes de la membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup> en mode diafiltration (DV 1 à 8), modélisés et expérimentaux (nr = 2) pour l'hydrolysats optimal produit (PTM 2 bar – 3000 s<sup>-1</sup> – pH3 – 55°C). (A) Rétentat modélisé. (B) Perméat modélisé. (C) Rétentat expérimental. (D) Perméat expérimental. ....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 33 : Chromatogrammes de la membrane de 100 kg.mol<sup>-1</sup> en mode ultrafiltration, modélisés et expérimentaux (nr = 2) pour l'hydrolysats optimal produit (PTM 2 bar – 3000 s<sup>-1</sup> – pH3 – 55°C). (A) Rétentat modélisé. (B) Perméat modélisé. (C) Rétentat expérimental. (D) Perméat expérimental. ....</i>	<i>131</i>
<i>Figure 34 : Chromatogrammes de la membrane de 100 kg.mol<sup>-1</sup> en mode diafiltration, modélisés et expérimentaux (nr = 2) pour l'hydrolysats optimal produit (PTM 2 bar – 3000 s<sup>-1</sup> – pH3 – 55°C). (A) Rétentat modélisé. (B) Perméat modélisé. (C) Rétentat expérimental. (D) Perméat expérimental. ....</i>	<i>131</i>
<i>Figure 35 : Schéma de vérification d'activité enzymatique dans le perméat avec un nouveau substrat de PTC. 133</i>	
<i>Figure 36 : Photo du montage du réacteur enzymatique à membrane en laboratoire.....</i>	<i>134</i>
<i>Figure 37 : Chromatogramme de l'isolat des PTC (ligne bleue) et de l'hydrolysats (50°C - pH3 - E/S 1/500 - 7h) de la ProlyvePAC® des PTC (ligne rouge). ....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 38 : Chromatogrammes des quelques essais préliminaires montrant l'hydrolyse sélective de la ProlyvePAC® en fonction du pH. ....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 39 : Mécanismes des expériences préliminaires lorsque seules les cruciférines sont hydrolysées (trait de tendance mixte) et lorsque les deux protéines sont hydrolysées (trait de tendance pointillé). Le Xp et le DH sont calculés sur les deux protéines.....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 40 : Valeurs de rendement et pureté en napines pour les expériences préliminaires étudiées à t = 5 h. 151</i>	
<i>Figure 41 : Schéma explicatif de la méthodologie de modélisation de la cinétique d'hydrolyse des PTC. ....</i>	<i>153</i>
<i>Figure 42 : Exemple de régressions du paramètre <math>k_C</math> du ratio de concentration massique de la cruciférine à l'instant t sur la cruciférine initiale, dans 3 ensembles de conditions à pH 3, 55°C et E/S de 1/285 (triangles rouges et ligne pointillée rouge), 1/154 (cercles bleus et ligne en points-tirets bleue) et 1/2000 (croix vertes et ligne en tirets verte). ....</i>	<i>154</i>

<i>Figure 43 : Surface de réponse de la constante de vitesse de réaction <math>k_C</math> de la cruciférine dans le domaine étudié. Les paramètres <math>T</math> et <math>E/S</math> sont en valeurs codées.</i>	155
<i>Figure 44 : Comparaisons de la cinétique simulée des expériences de validation (ligne bleue) et la cinétique expérimentale des conditions correspondantes (ronds rouges). (A) 37,5°C – 1/801 E/S. (B) 37,5°C – 1/174 E/S. (C) 52,5°C – 1/801 E/S. (D) 52,5°C – 1/174 E/S.</i>	156
<i>Figure 45 : Comparaisons de la cinétique simulée (ligne bleue) et la cinétique expérimentale de la pureté en napine des conditions correspondantes (ronds rouges) pour les quatre expériences de validation. (A) 37,5°C – 1/801 E/S. (B) 37,5°C – 1/174 E/S. (C) 52,5°C – 1/801 E/S. (D) 52,5°C – 1/174 E/S.</i>	157
<i>Figure 46 : Valeurs cinétiques expérimentales des expériences de validation (A, B, C et D) en fonction des valeurs cinétiques calculées pour (A) la concentration en cruciférine et (B) la pureté en napine. La ligne pointillée verte représente <math>\pm 10\%</math> de la bissectrice, la ligne pointillée rouge <math>\pm 25\%</math>.</i>	158
<i>Figure 47 : (A) Front de Pareto des solutions (ronds bleus) économiquement équivalentes et (B) domaine de Pareto correspondant. Le point économique choisi se distingue par un losange rose.</i>	159
<i>Figure 48 : Réentions réelles de la napine et des peptides totaux aux différents seuils de coupure à PTM 1 bar et à 3000 <math>s^{-1}</math> de taux de cisaillement. Suspension de l'hydrolysats à 10 <math>g.L^{-1}</math>, pH 3 et <math>\sim 51^\circ C</math> (nr = 3).</i>	166
<i>Figure 49 : Répartition volumique des particules par la diffusion dynamique de lumière. (A) Protéines totales non hydrolysées dans un tampon pH 3. (B) Hydrolysats des PTC dans un tampon pH 3.</i>	167
<i>Figure 50 : Valeurs des (A) flux de perméat et des (B) résistances en fonction des seuils de poids moléculaire nominaux des membranes. Résistance membranaire intrinsèque mesurée en eau à 51°C aux PTM entre 0,4 et 2,4 bar à des vitesses de recirculation entre 1500 et 8000 <math>s^{-1}</math>. Flux perméat et résistance due au phénomène de polarisation de concentration mesurées à 51°C à PTM de 1 bar et vitesse de recirculation de 3000 <math>s^{-1}</math>. Suspension de l'hydrolysats à 10 <math>g.L^{-1}</math>, pH 3 et <math>\sim 51^\circ C</math> (nr = 3).</i>	169
<i>Figure 51 : (A) Chromatogrammes des perméats (nr = 3) issus des membranes aux différents seuils de coupure (Biosep s2000 H2O/ACN/TFA 54,9/45/0,1 (v/v/v) 0,6 <math>mL.min^{-1}</math>). Etalonnage peptidique de la colonne CLHP-ES : <math>MM = 10^{-0,2394*TR+6,0189}</math>. (B) Courbes de réentions réelles correspondantes en fonction de la transformation logarithmique de leur masse molaire (nr = 3). Mesures réalisées à PTM de 1 bar et au taux de cisaillement de 3000 <math>s^{-1}</math>. Suspension de l'hydrolysats à 10 <math>g.L^{-1}</math>, pH 3 et <math>\sim 51^\circ C</math> (nr = 3).</i>	170
<i>Figure 52 : Réention de la napine et des peptides totaux aux PTM de 1 et 2 bar par les membranes aux différents seuils de coupure à (A) 3000 <math>s^{-1}</math> de taux de cisaillement et à (B) 6000 <math>s^{-1}</math> de taux de cisaillement. Suspension de l'hydrolysats à 10 <math>g.L^{-1}</math>, pH 3 et <math>\sim 51^\circ C</math> (nr = 3).</i>	173
<i>Figure 53 : Flux de perméat des conditions opératoires à PTM de 1 et 2 bar au (A) taux de cisaillement à 3000 <math>s^{-1}</math> et au (B) taux de cisaillement de 6000 <math>s^{-1}</math>. Suspension de l'hydrolysats à 10 <math>g.L^{-1}</math>, pH 3 et <math>\sim 51^\circ C</math> (nr = 3).</i>	175
<i>Figure 54 : Résistance de la couche de polarisation des membranes aux seuils de coupure 30, 50 et 100 <math>kg.mol^{-1}</math> au (A) taux de cisaillement de 3000 <math>s^{-1}</math> et au (B) taux de cisaillement de 6000 <math>s^{-1}</math>. Suspension de l'hydrolysats à 10 <math>g.L^{-1}</math>, pH 3 et <math>\sim 51^\circ C</math> (nr = 3).</i>	176

<i>Figure 55 : Valeurs des rétentions réelles calculées des membranes aux différentes conditions opératoires pour les seuils de coupure sélectionnés. Suspension de l'hydrolysate à 10 g.L<sup>-1</sup>, pH 3 et ~51°C (nr = 3). La napine et la cruciférine sont représentées aux valeurs de 3,5 et 3,8 pour les montrer sur les mêmes graphes que les peptides, mais cela ne correspond pas à leur masse molaire (14,8 et 50 kg.mol<sup>-1</sup>). (A) 30 kg.mol<sup>-1</sup>. (B) 50 kg.mol<sup>-1</sup>. (C) 100 kg.mol<sup>-1</sup>.....</i>	<i>179</i>
<i>Figure 56 : Schéma de la méthodologie de l'évaluation des performances de la mise en œuvre en ultrafiltration.....</i>	<i>181</i>
<i>Figure 57 : Chromatogrammes (nr = 2) en concentration massique (g.L<sup>-1</sup>) en fonction du temps de rétention (min) du fractionnement de l'hydrolysate de PTC. En mode CD, prélèvements aux (A) rétentat (dilué en analyse et multiplié par le FRV) et (B) perméat cumulé aux FRV de 1 à 8. En mode DF, prélèvements aux (C) rétentat et (D) perméat cumulé aux DV de 0 à 8. Membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup>.....</i>	<i>182</i>
<i>Figure 58 : Chromatogrammes (nr = 2) en concentration massique (g.L<sup>-1</sup>) en fonction du temps de rétention (min) du fractionnement de l'hydrolysate de PTC. En mode CD, prélèvements aux (A) rétentat (dilué en analyse et multiplié par le FRV) et (C) perméat cumulé aux FRV de 1 à 8. En mode DF, prélèvements aux (C) rétentat et (D) perméat cumulé aux DV de 0 à 8. Membrane de 100 kg.mol<sup>-1</sup>.....</i>	<i>182</i>
<i>Figure 59 : Rendement en napine (carrés) et pureté en protéines (croix) suite au fractionnement en mode (A) CD et (B) DF des membranes de 30 kg.mol<sup>-1</sup> (bleu) et 100 kg.mol<sup>-1</sup> (rouge). Moyenne sur deux répétitions. Implémentation à 3000 s<sup>-1</sup> et PTM 2 bar. Température consigne à 55°C et pH 3. ....</i>	<i>186</i>
<i>Figure 60 : Comparaisons des flux de perméat en mode CD (FRV) et DF (DV) des différentes membranes (nr = 2). (A) 30 kg.mol<sup>-1</sup>. (B) 100 kg.mol<sup>-1</sup>.....</i>	<i>187</i>
<i>Figure 61 : Performances en fonction des modes d'implémentations et seuils de coupure (nr = 2). (A) Productivité en mode CD avec FRV de 1 à 8. (B) Productivité en mode DF avec DV de 0 à 8. (C) Ratio eau/peptides en mode CD avec FRV de 1 à 8. (D) Ratio eau/peptide en mode DF avec DV de 0 à 8. ....</i>	<i>189</i>
<i>Figure 62 : Comparaisons des performances des membranes de 30 et de 100 kg.mol<sup>-1</sup> (nr = 2). (A) Productivité en mode CD. (B) Productivité en mode DF. (C) Ratio eau/peptides en mode CD. (D) Ratio eau/peptides en mode DF. Les lignes montrent les tendances des points, approximées par une fonction de lissage « spline », ou « cannelure » en français.....</i>	<i>191</i>
<i>Figure 63 : SDS-PAGE 17% d'acrylamide dans les conditions dénaturantes de la ProlyvePAC©. Piste ① : Marqueur de taille protéique. Piste ② : 10 µL enzyme (25 µg). ....</i>	<i>197</i>
<i>Figure 64 : Activité enzymatique résiduelle dans le perméat (hydrolyse II), comparée à l'activité de l'hydrolyse I dans les mêmes conditions opératoires (pH 3 et 55°C). ....</i>	<i>198</i>
<i>Figure 65 : Comparaisons des performances en fonction du temps de soutirage en REM (VR de 0 à 6 et mode en flux variable), hydrolyse en batch puis CD (FRV de 1 à 7) et hydrolyse en batch puis DF (DV de 0 à 6) avec la membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup> (nr = 2). (A) Peptides produits (perméat) par rapport aux protéines entrées initialement. (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index</i>	

<i>enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. Le ratio E/S étant de 1/448. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du moment du soutirage. ....</i>	<i>201</i>
<i>Figure 66 : Comparaisons des performances en REM en fonction du temps de soutirage (abscisses en bas) et volume de remplacement (de 0 à 6, abscisses en haut) avec deux modes de fonctionnement (flux perméat variable vs constant) avec la membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup> (nr = 2). (A) Peptides produits (perméat) par rapport aux protéines entrées initialement. (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. Le ratio E/S étant de 1/170. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du moment du soutirage. ....</i>	<i>205</i>
<i>Figure 67 : Comparaison de l'activité chélatrice de fer (Fe<sup>2+</sup>) du perméat produit en condition d'une hydrolyse en batch (50°C – E/S 1/500 – pH 3 – 7 h) suivi d'une séparation (membrane plane, cellulose – 3 kg.mol<sup>-1</sup> – pH 9 – PTM 2,5 bar – FRV = 2 puis DV = 5) avec les perméats produits en REM en fonctionnement à flux variable et constant (55°C – E/S – 1/170 – pH 3 – 50 min – fibres creuses, polysulfone – 30 kg.mol<sup>-1</sup> – 3000 s<sup>-1</sup> – VR = 6). ....</i>	<i>207</i>
<i>Figure 68 : Exemple de chromatogrammes superposés de l'hydrolyse des PTC, partie peptidique uniquement. Les traits noirs délimitent les groupes peptidiques supposés : groupes des peptides intermédiaires de 1 à 3 et groupes des peptides finaux de 1 à 3. T1 – T7 : différents moments de prélèvement entre 0 et 5 h d'hydrolyse. ....</i>	<i>209</i>
<i>Figure 69 : Schématisation de la méthode pour la prise des concentrations pour la construction des cinétiques à partir des chromatogrammes et de la tendance d'évolution de chaque catégorie de molécule. ....</i>	<i>209</i>
<i>Figure 70 : Schéma du mécanisme supposé de la déplétion de la cruciférine et de la formation des peptides. .</i>	<i>210</i>
<i>Figure 71 : Simulation par équations différentielles simultanées pour la prédiction des cinétiques protéique et peptidiques dans les conditions optimales de production identifiées (1/448 – pH 3 – 55°C). ....</i>	<i>212</i>
<i>Figure 72 : Erreur relative de la concentration de la protéine et des peptides simulés à des temps donnés de l'hydrolyse par rapport à leurs concentrations expérimentales correspondantes. Tirets noirs (---) 0% erreur, pointillés verts (···) 10% erreur, pointillés rouges (···) 25% erreur. ....</i>	<i>213</i>
<i>Figure 73 : Comparaisons entre les chromatogrammes expérimentaux et calculés de l'hydrolysats entre 0 et 5 heures, et un point issu d'expérience additionnelle de validation d'hydrolysats à 2 h (nr = 4). L'expérience à 2 h n'a pas été comprise dans l'ajustement des paramètres. ....</i>	<i>215</i>
<i>Figure 74 : Chromatogramme massique prédit (tirets rouges) de l'hydrolysats (10 g.L<sup>-1</sup>, pH 3, 55°C, E/S 1/448 et 2 h) et le chromatogramme massique moyen (nr = 6) des productions d'hydrolysats (traits bleus) correspondant aux mêmes conditions pour un volume final de 2 L. ....</i>	<i>216</i>
<i>Figure 75 : Comparaisons de la simulation des performances (rendement napine rétentat, pureté protéines rétentat et rendement peptides perméat) en ultrafiltration à 3000 s<sup>-1</sup> et PTM de 2 bar. (A) En CD pour la membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup>, (B) en DF pour la membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup>, (C) en CD pour la membrane de 100 kg.mol<sup>-1</sup> et (D) en DF pour la membrane de 100 kg.mol<sup>-1</sup>. ....</i>	<i>218</i>
<i>Figure 76 : Schéma du montage REM représentant le flux de matière. ....</i>	<i>220</i>

<i>Figure 77 : Comparaisons de l'expérience (nr = 2) et de la modélisation du REM en fonctionnement à flux de perméat variable (55°C, pH 3, E/S 1/170, PTM 2 bar, taux de cisaillement de 3000 s<sup>-1</sup>) à partir du début de la pré-hydrolyse. (A) Concentration des peptides totaux dans le rétentat. (B) Concentration des peptides totaux dans le perméat. (C) Volume et flux du perméat. (D) Concentration de la cruciférine et de la napine dans le rétentat. ....</i>	<i>224</i>
<i>Figure 78 : Erreur relative sur le bilan de matière entrée – sortie pour le fonctionnement REM à flux de perméat variable (nr = 2). ....</i>	<i>225</i>
<i>Figure 79 : Comparaisons de l'expérience (nr = 2) et de la modélisation du REM en fonctionnement à flux de perméat constant (55 °C, pH 3, E/S 1/170, débit perméat 2 mL.min<sup>-1</sup> (flux ~2,4 µm. s – 1), taux de cisaillement de 3000 s<sup>-1</sup>) à partir du début de la pré-hydrolyse. (A) Concentration des peptides totaux dans le rétentat. (B) Concentration des peptides totaux dans le perméat. (C) Volume du perméat et flux du perméat. (D) Concentration de la cruciférine et de la napine dans le rétentat. ....</i>	<i>227</i>
<i>Figure 80 : Erreur relative sur le bilan de matière entrée – sortie pour le fonctionnement REM à flux de perméat constant (nr = 2). ....</i>	<i>228</i>
<i>Figure 81 : Comparaisons des paramètres de caractérisation de l'expérience (nr = 2) et de la modélisation du REM en fonctionnement à flux de perméat variable (55°C, pH 3, E/S 1/170, PTM 2 bar, taux de cisaillement 3000 s<sup>-1</sup>). (A) Conversion protéique des peptides totaux produits (perméat) par rapport aux protéines entrées (rétentat). (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du début de la pré-hydrolyse. ....</i>	<i>229</i>
<i>Figure 82 : Comparaisons des paramètres de caractérisation de l'expérience (nr = 2) et de la modélisation du REM en fonctionnement à flux de perméat constant (55°C, pH 3, E/S 1/170, débit perméat 2 mL.min<sup>-1</sup>, taux de cisaillement 3000 s<sup>-1</sup>). (A) Conversion protéique par les peptides totaux produits (perméat) par rapport aux protéines entrées (rétentat). (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du début de la pré-hydrolyse. ....</i>	<i>231</i>
<i>Figure 83 : Schéma explicatif des différentes simulations réalisées sur la durée de la pré-hydrolyse dans les deux modes de fonctionnement du REM. ....</i>	<i>232</i>
<i>Figure 84 : Comparaisons des simulations d'enclenchement du soutirage à différents moments de la pré-hydrolyse pour le REM en fonctionnement à flux de perméat variable. (A) Conversion protéique des peptides totaux produits (perméat) par rapport aux protéines entrées (rétentat). (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du début de la pré-hydrolyse. ....</i>	<i>234</i>
<i>Figure 85 : Comparaisons des simulations d'enclenchement du soutirage à différents moments de la pré-hydrolyse pour le REM en fonctionnement à flux de perméat constant. (A) Conversion protéique des peptides totaux produits (perméat) par rapport aux protéines entrées (rétentat). (B) Consommation de litres d'eau par</i>	

grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du début de la pré-hydrolyse..... 235

Figure 86 : Résumé de la méthodologie optimisée de mise en œuvre d'un REM pour la production d'un hydrolysât d'intérêt. CO : Conditions opératoires. CR : Caractéristiques recherchées. R = Rétention. .... 238

## Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Sites de clivage de certaines endopeptidases très utilisées pour la production d'hydrolysats protéiques. X : n'importe quel acide aminé. (Whitehurst &amp; Oort 2010).....</i>	<i>11</i>
<i>Tableau 2 : Classements des cations métalliques (acides) et fonctions correspondantes avec leurs groupements fonctionnels (base) de conjugaison stable (d'après Pearson 1969). .....</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 3 : Ionisations des groupes fonctionnel en fonction du milieu et la plage du pKa possible en fonction de la disposition du groupe fonctionnel dans la protéine. R : chaîne peptidique principale. Ar : cycle aromatique. Adapté de (Whitaker 1994; Leskovac 2003). .....</i>	<i>30</i>
<i>Tableau 4 : Réactions d'ordres 1 à n avec leur taux de réaction et leurs solutions analytiques des concentrations correspondantes des réactifs et du produit (Cornish-Bowden et al. 2005; Korobov &amp; Ochkov 2011a; Seoud et al. 2016). .....</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 5 : Exemples non-exhaustifs de méthodes de régression non-linéaires pour ajuster les paramètres cinétiques aux critères ciblés. Paramètres ajustables : a et b. Réactivité des liaisons :yx. Constantes de vitesse réactionelles : Kx et kx. ....</i>	<i>47</i>
<i>Tableau 6 : Différentes géométries de membranes et leur caractéristiques principales (Aimar &amp; Daufin 2004; Aimar 2006). .....</i>	<i>59</i>
<i>Tableau 7 : Principales caractéristiques des matériaux les plus courants (Aimar &amp; Daufin 2004; Remigy &amp; Desclaux 2007). .....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau 8 : Quelques formules de calculs de performances utilisées dans la littérature pour l'ultrafiltration d'hydrolysats protéiques (Muller et al. 1999; Chabeaud et al. 2009b; Kapel et al. 2011; Beaubier et al. 2021b). .....</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 9 : Liste non-exhaustive de travaux réalisés sur le fractionnement d'hydrolysats dans l'optique de mettre en évidence ou d'améliorer leurs propriétés. Indications (si présentes dans l'article initial) de la (des) matrice(s) protéique(s) utilisée(s), des enzymes et des conditions opératoires de l'hydrolyse, du module de filtration (type, matériau, seuil de coupure) et des principaux résultats recueillis. N.D. = pas de données. ....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau 10 : Liste non-exhaustive de développements de REM réalisés pour l'hydrolyse continue des protéines. Indications (si mentionnées dans l'article initial) de la (des) matrice(s) protéique(s) utilisée(s), des enzymes et des conditions opératoires de l'hydrolyse continue, du module de filtration (type, matériau, seuil de coupure), des paramètres de soutirage (volume du rétentat, flux du perméat) et des principaux résultats recueillis. ....</i>	<i>87</i>
<i>Tableau 11 : Quelques grandeurs de caractérisation du fonctionnement en continu. Les notations dans les articles ayant été parfois très différentes, les équations ont été unifiées et adaptées en reprenant la codification du présent manuscrit .....</i>	<i>97</i>
<i>Tableau 12 : Caractéristiques constructeur des membranes d'ultrafiltration utilisées dans l'étude. ....</i>	<i>106</i>
<i>Tableau 13 : Codification des conditions opératoires d'hydrolyse.....</i>	<i>108</i>
<i>Tableau 14 : Validation du DoE, valeurs codées et réelles de la température et du ratio E/S. ....</i>	<i>109</i>

<i>Tableau 15 : Aminogrammes de la cruciférine et de la napine (P33523 (CRU1_BRANA) et P80208 (2SS3_BRANA)).....</i>	<i>116</i>
<i>Tableau 16 : Criblage de l'influence des paramètres d'ultrafiltration sur la sélectivité des membranes.....</i>	<i>121</i>
<i>Tableau 17 : Coefficients significatifs du modèle protéique des cruciférines et des napine (valeurs codées). ...</i>	<i>155</i>
<i>Tableau 18 : Groupements des masses molaires en fonction du chromatogramme du perméat et de l'étalonnage peptidique de la colonne de CLHP-ES.....</i>	<i>171</i>
<i>Tableau 19 : Correspondance entre la masse molaire et le logarithme de la masse molaire. ....</i>	<i>179</i>

## Introduction générale

La protéolyse enzymatique est largement utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour améliorer les propriétés technico-fonctionnelles (propriétés émulsifiante, moussante, gélifiante, *etc.*) et/ou la digestibilité des protéines (Neklyudov *et al.* 1999). Ce procédé est également connu pour diminuer l'allergénicité des protéines (Yamanishi *et al.* 1996), modifier leurs propriétés organoleptiques (Fujimaki *et al.* 1970) ou encore libérer des peptides bioactifs (Kitts & Weiler 2003b) permettant des applications en nutrition-santé ou en sécurité alimentaire. Dans un contexte de nécessité d'augmenter l'offre d'ingrédients protéiques, ce procédé se révèle particulièrement intéressant, car il permet une exploitation des protéines d'origine autre que animale (végétale, fongique, entomique), dont les performances nutritionnelles et fonctionnelles sont réputées moins attractives (Henchion *et al.* 2017a; Langyan *et al.* 2022).

La protéolyse enzymatique, particulièrement, est réalisée au moyen d'enzymes de clivage (protéases), des catalyseurs biologiques opérant dans des gammes de conditions opératoires de température et de *pH* particulières. Les endoprotéases coupent les liaisons entre certains acides aminés qui leur sont spécifiques, conduisant à la production de mélanges de fragments protéiques de différentes tailles (peptides), voire des acides aminés libres. La composition du mélange, appelé « hydrolysats », ainsi que ses propriétés, vont dépendre de la spécificité de l'enzyme utilisée, des conditions opératoires (*T, pH*), mais aussi de la quantité de l'enzyme (ratio enzyme/substrat) et du temps de l'hydrolyse employé. Cette recherche de conditions d'obtention d'un hydrolysats protéique vis à vis d'un cahier des charges ciblé se fait par des criblages en plusieurs étapes pour déterminer l'exactitude du jeu de paramètres conduisant à une (ou des) propriété(s) recherchée(s). Tout d'abord, un criblage de différentes enzymes est réalisé sur le substrat protéique d'intérêt. Dans un deuxième temps, pour ce couple enzyme-protéine, un deuxième criblage sur les conditions opératoire vise à déterminer le meilleur *pH*, température, ratio *E/S* et temps d'hydrolyse (Kong *et al.* 2007; Adje *et al.* 2013; Alashi *et al.* 2018; Zhao & Hou). (Kong *et al.* 2007; Adje *et al.* 2013; Alashi *et al.* 2018; Zhao & Hou). Les démarches de mises en œuvre sont alors très empiriques et lourdes à ce niveau.

Le coût de l'enzyme limite actuellement leur application. Ceci est dû au coût intrinsèque des enzymes, mais aussi au mode de mise en œuvre discontinu, par lots, de la protéolyse enzymatique. Le terme anglais *batch* étant le plus utilisé. Ce système de mise en œuvre entraîne, en effet, une perte de l'enzyme à l'issue de la production. Par ailleurs, le procédé de protéolyse discontinue présente une productivité relativement faible du fait des nettoyages en place à

réaliser entre chaque production (Archer *et al.* 1973; Bhumiratana *et al.* 1977; Rios *et al.* 2004). Des travaux précédents ont permis de montrer qu'il est possible de réduire ces coûts de mise en œuvre en réacteur discontinu par des méthodologies de simulation / optimisation (Bodin 2016). En reprenant ces méthodologies, le passage des procédés discontinus à des procédés continus doit permettre de lever totalement ces limitations en permettant un recyclage de l'enzyme.

La mise en œuvre continue est permise par l'utilisation d'enzymes immobilisées sur supports solides. Ceci permet un recyclage des enzymes grâce à des systèmes de séparation solide - liquide simple (décantation). Une seconde option consiste à utiliser les mêmes enzymes libres qu'en réacteur *batch* et de coupler l'hydrolyse à des procédés membranaire au sein de réacteurs enzymatiques à membrane (REM). Dans le premier cas, l'immobilisation des enzymes entraîne une perte d'activité enzymatique et peut modifier les mécanismes réactionnels (Rodrigues *et al.* 2013). Dans le second cas, l'avantage des REM réside dans la conservation des propriétés catalytiques des enzymes (Rios *et al.* 2004).

Cependant, le principal verrou, qui limite la production d'hydrolysats en REM, demeure dans la complexité du système protéolytique lié aux :

- Conditions opératoires permettant le contrôle de la réaction ( $pH, T, E/S$ ) et de la séparation membranaire ( $PTM$ , vitesse de circulation, NMWCO, concentration).
- Critères de performances de production (productivité, composition en peptides, rendement d'hydrolyse, *etc.*)
- Cinétiques variés des peptides générés par protéolyse enzymatique qui ont des rétentions différentes.

La plupart des études sur la protéolyse en REM reposent sur des démarches exclusivement expérimentales et ne permettent pas d'identifier un jeu de conditions permettant une production stable et optimale d'un hydrolysats d'intérêt. Ceci limite l'utilisation de ce type de procédé dans l'industrie. Pour répondre à cette problématique, deux méthodologies simples ont été développées pour réaliser des simulations :

- Des cinétiques du degré d'hydrolyse ( $DH$ ) et du taux de conversion ( $Xp$ ) en protéines en fonction des conditions opératoires de protéolyse (Beaubier *et al.* 2021a).
- De la composition peptidique dans les compartiments d'ultrafiltration et des performances de séparation de peptides en concentration discontinue (CD) et/ou diafiltration (DF) (Kapel *et al.* 2011; Bodin 2016; Beaubier *et al.* 2021b).

La première méthode consiste à prédire la cinétique du  $DH$  et du  $Xp$  dans un ensemble de conditions de  $pH$ , température et ratio  $E/S$ , par une approche hybride de modèle cinétique et une méthodologie de plan d'expériences. Un outil d'optimisation génético-évolutive est ensuite utilisé pour la recherche du meilleur compromis coût-temps, réduisant ainsi considérablement les expériences à réaliser et le coût total du procédé à mettre en place.

La deuxième méthode consiste à prédire la composition peptidique d'un hydrolysate au moyen de chromatogrammes simulés de part et d'autre de la membrane (dans le rétentat et dans le perméat) en appliquant un bilan de matière en fonction du procédé employé (CD ou DF). Pour cela, un simple étalonnage de la membrane doit être réalisé avec l'hydrolysate en question dans les conditions opératoires à cribler ( $PTM$ , vitesse de circulation).

L'objectif de ce travail a été d'adapter et de fusionner ces deux méthodes de manière à pouvoir prédire, en fonction du temps, la composition de l'hydrolysate (protéines, peptides) dans les conditions de l'hydrolyse ( $pH$ , température, ratio  $E/S$ ), au même moment qu'une séparation membranaire a lieu. Cela consistera en un outil de développement de simulation du REM, permettant de connaître la composition peptidique dans les compartiments rétentat et perméat.

Le travail est ainsi découpé en trois phases :

► **Chapitre 1 – Modélisation et optimisation de la protéolyse enzymatique *batch***

Identification d'un hydrolysate d'intérêt à produire en REM :

- a. Recherche des conditions opératoires conduisant à l'hydrolysate d'intérêt
- b. Recherche des conditions optimales en *batch* (compromis durée / coût enzymatique)

► **Chapitre 2 – Modélisation de la séparation des hydrolysats en CD et DF**

Identification des membranes et conditions de séparation membranaire :

- a. Couplage le plus adapté à la protéolyse
- b. Valider l'outil de modélisation de la composition en peptides dans les compartiments en CD et DF

► **Chapitre 3 – Développement de l'outil de simulation d'un REM**

Couplage des outils de simulation cinétique de libération de peptides et séparation :

- a. Développement d'un outil de simulation de la composition en peptides au cours de la protéolyse

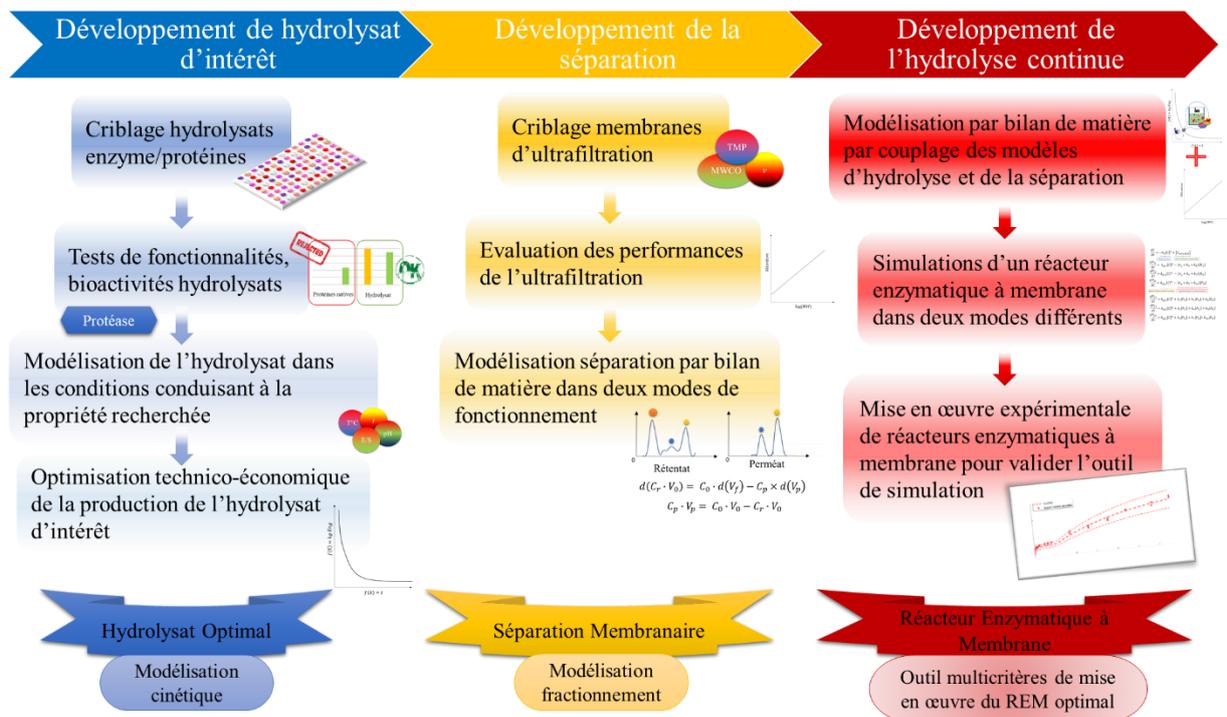
- b. Valider expérimentalement la méthodologie
- c. Recherche *in silico* de l'*optimum* du fonctionnement du REM

## Objectif de la thèse

L'objectif du projet est de lever les verrous scientifiques qui limitent l'utilisation des REM de manière standard pour la production d'hydrolysats protéiques. Pour cela, il est proposé de développer une méthodologie de simulation de la composition des peptides produits en continu dans les REM et ceci, pour un couple enzyme/protéine donné dans (i) les conditions opératoires de réaction pour un hydrolysats ciblé, (ii) les conditions opératoires de la séparation membranaire pour les critères ciblé de séparation d'hydrolysats (iii) et en fonction du débit d'alimentation / soutirage.

Dans le cadre du projet, la méthodologie sera mise au point et validée avec l'hydrolyse des protéines du colza (napines et cruciférines), dont le choix est motivé d'une part, par la disponibilité du tourteau de colza dans la région du Grand Est, et d'autre part, par sa richesse en protéines (~40% du poids du tourteau). Enfin, des études montrent que les napines et les cruciférines présentent des propriétés fonctionnelles particulièrement intéressantes pouvant encore être améliorés par la méthode proposée (Nioi *et al.* 2012; Tan *et al.* 2014).

**Objectif :** Proposer une stratégie de développement, économiquement et matériellement viable, d'un hydrolysats protéique d'intérêt pour un couple enzyme/protéine dans un système de réacteur enzymatique à membrane.





ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## I. Etude bibliographique

### I.1. Les hydrolysats protéiques

#### I.1.1. Intérêt et source des hydrolysats protéiques

Les protéines sont l'une des trois grandes familles des macronutriments, avec les lipides et les glucides. Il s'agit de polymères composés d'enchaînement d'acides aminés, formant des chaînes peptidiques qui se réarrangent dans des conformations tridimensionnelles spécifiques. Les protéines participent à de multiples rôles au sein des cellules vivantes (maintien des structures, mobilité, métabolisme, catalyse de réactions, *etc.*), ce qui les rend indispensables au fonctionnement de l'organisme (Neklyudov *et al.* 1999). Les apports protéiques peuvent être obtenus par les aliments riches en protéines (viande, œufs, soja, lentilles, *etc.*) ou par les ingrédients protéiques. Le marché des ingrédients protéiques est très répandu, il représentait 52 Mds\$ en 2021, et sa croissance annuelle globale serait estimée à 8% (Acumen Research and Consulting 2022).

Les ingrédients protéiques remplacent les protéines qui ne sont pas toujours employables dans leur forme native. Elles peuvent, en effet, présenter des facteurs délétères à leur utilisation aussi bien d'un point de vue nutritionnel (facteurs antinutritionnels, allergéniques) que fonctionnel dans des applications alimentaires (peu soluble, faible capacité émulsifiante). Pour limiter ces désagréments ou améliorer des propriétés existantes, les protéines peuvent ainsi être morcelées par une hydrolyse de leur chaîne (« protéolyse »), aux moyens physiques, chimiques, microbiens ou enzymatiques. La *Figure 1* présente le mélange complexe qui en résulte, appelé hydrolysats protéiques, composé de chaînes peptidiques de différentes tailles, à différentes concentrations, d'acides aminés libres (AA), et potentiellement, de protéines résiduelles.

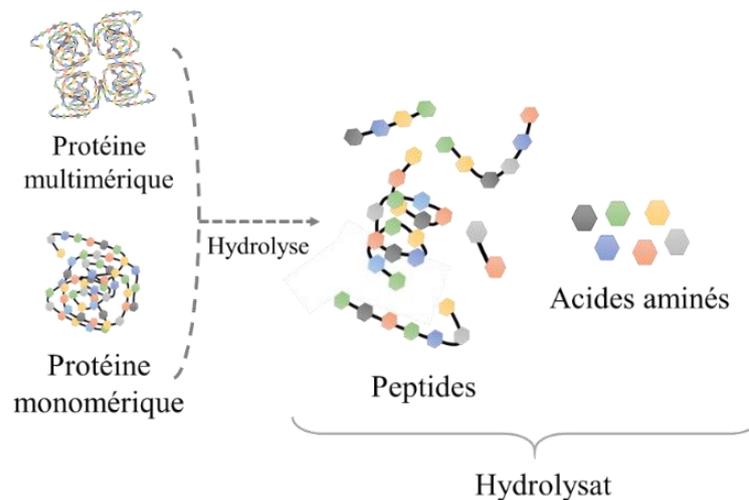


Figure 1 : Schématisation de l'hydrolyse d'une protéine (sous forme monomérique ou multimérique) résultant en un hydrolysats composé de peptides et acides aminés libres.

Les hydrolysats protéiques sont surtout issus de la valorisation de co-produits industriels. Une étude réalisée sur la récupération des protéines à partir de co-produits de poissons (arrêtes, peaux, têtes), a montré qu'il est possible de réduire de 79% la quantité de déchets finaux mis à la décharge, en plus de générer des protéines et de l'huile de qualité avec prix de vente de 10,62 €/kg de co-produits initiaux (Araujo *et al.* 2020).

En matière de produits animaux par exemple, le pourcentage du poids non comestible (et donc des déchets à éliminer) a été évalué à 49% pour les bovins, 47% pour les ovins et les agneaux, 44% pour les porcs et 37% pour la volaille (Adhikari *et al.* 2018). En ce qui concerne la filière végétale, entre 28% et 42% de matière est éliminée entre la culture et la transformation du produit final (Jiménez-Moreno *et al.* 2020). Ces quantités représentent pourtant un très grand potentiel de matière organique valorisable par la suite, en tant qu'ingrédients fonctionnels (industrie globale évaluée à 98,9 Mds \$ en 2021 (MarketsandMarkets 2021) comme fertilisants (191,13 Mds \$ en 2021 (Mordor Intelligence 2022)), alimentation animale (501,9 Mds \$ (Imarc Group 2022)), biopolymères (13,7 Mds \$ en 2021 (Precedence Research 2022a)), pharmaceutiques (1,42 billions \$ en 2021 (Matej 2022) ou biocarburants (120,06 Mds \$ en 2020 (Precedence Research 2022b)).

Ainsi, les sources protéiques pour l'obtention d'hydrolysats sont très diverses et variées. Le cas des protéines animales est le plus appliqué dû à la forte disponibilité par la filière de lait (caséines (Wang *et al.* 2013) et lactosérum (Geiser 2003)), des co-produits de la filière d'abattage et de la boucherie (hémoglobine (Hedhili *et al.* 2015), carcasses (Clementz *et al.* 2019), viscères (Jamdar & Harikumar 2005), plumes (Grazziotin *et al.* 2007)) ainsi que des co-produits de la mer (têtes de poissons (Chi *et al.* 2015), os de poissons (Slizyte *et al.* 2016), collagène de peau (Blanco *et al.* 2017) ). Cependant, l'utilisation des protéines d'origine animale ne satisfait plus la demande mondiale, autant par leurs capacités de production, que par leur coût et leur impact écologique. En effet, non seulement en Union Européenne les deux tiers des champs sont cultivés pour nourrir le bétail, mais en plus, 75% de l'alimentation riche en protéines pour le bétail est importé de l'Amérique du Sud (Henchion *et al.* 2017b). Puis à l'abattage, la consommation en eau peut varier de 4000 et 200 000 m<sup>3</sup> par jour, avec une production d'eaux usées entre 22 et 900 m<sup>3</sup> par jour (Valta *et al.* 2015). C'est équivalent à la production d'eaux usées par une petite commune de 6000 habitants. Ainsi, 12% des gaz à effet de serre (issus des 25% dus à la production totale de nourriture) et 30% de la perte de la biodiversité terrestre est attribuée à l'exploitation animale (Henchion *et al.* 2017b). L'impact de gaz à effet de serre est inférieur de 80% à 90% pour les protéines issues de plantes par rapport

aux protéines issues du bétail (Tilman & Clark 2014). Par conséquent les végétaux, les micro-algues, les champignons ou encore les insectes, sont étudiés comme source protéique alternative (Poore & Nemecek 2018; Zeng *et al.* 2022). Ces ressources ont des taux protéiques assez élevés ce qui en fait de bons candidats de valorisation protéique : entre 40% et 55% pour les graines de plantes déshuilées (Gassmann 1983), entre 28% et 71% pour les micro-algues (Spolaore *et al.* 2006), entre 19% et 37% pour les champignons (González *et al.* 2020) et entre 36% et 61% pour les insectes (Ojha *et al.* 2021).

### 1.1.2. Obtention des hydrolysats protéiques par protéolyse enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques indispensables au fonctionnement de tout organisme vivant. Elles régulent le métabolisme (respiration), protègent des molécules nocives (défense immunitaire), aident à l'assimilation de nutriments (digestion), entre autres, et à chaque réaction, une enzyme spécifique peut être entièrement dédiée (Whitehurst & Oort 2010). Néanmoins, elles ont aussi la propriété de garder leur fonctionnalité en dehors de l'organisme d'origine, à condition de se trouver dans un milieu similaire. Cette activité d'enzymes seules a été confirmée par Eduard Buchner à la fin du XIX<sup>ème</sup>, qui a mis en évidence la fermentation *in vitro* du sucre par une substance extraite de la levure (Bradbury 1904). Une distinction a ainsi été faite entre le terme de « enzymes » (du grec *-en* « dans » et *zumê* « levain ») pour les substances actives mais « non vivantes », et les « ferments » pour décrire l'activité chimique produite par les microorganismes vivants (Whitehurst & Oort 2010). La fermentation microbienne est le premier procédé historique utilisé pour la modification de protéines (Sharma *et al.* 2020). Toutefois, ce procédé a l'inconvénient d'avoir une faible productivité, car le substrat protéique est assimilé par le microorganisme pour sa propre croissance. L'hydrolyse enzymatique par des enzymes purifiées est par conséquent un dérivé de la fermentation microbienne qui a permis de s'affranchir de la prise en compte de cette biomasse (Nasri 2017).

Les protéases sont des enzymes qui dégradent spécifiquement les protéines. La protéolyse enzymatique est donc la fragmentation de protéines en peptides, par la coupure de certaines liaisons peptidiques, sites d'action des enzymes. Cette fragmentation découle sur un mélange de peptides de différentes tailles, d'AA libres et de protéines résiduelles. Ces protéases ont des spécificités quant aux sites de coupures, ce qui permet d'avoir un bon contrôle sur la population des peptides générés (Adler-Nissen 1976; Zhao & Hou). De plus, tous les acides aminés d'origine sont conservés et les conditions sont « douces » (*pH* entre 4 et 8, température de 30 – 50°C) ce qui *in fine* demande moins de post-traitements notamment pour l'élimination des sels (ultrafiltration, précipitation, centrifugation, *etc.*) par rapport à une hydrolyse acide par

exemple. Grâce à ces avantages, la protéolyse enzymatique a largement été appliquée en industrie alimentaire pour produire des formulations infantiles (Cordle *et al.* 1991), pour augmenter la digestibilité des protéines (Linder *et al.* 1997; Sá *et al.* 2020), pour améliorer leurs propriétés fonctionnelles (Adler-Nissen & Olsen 1979; Panyam & Kilara 1996; Fierens *et al.* 2016), ou encore pour produire des hydrolysats bioactifs (Caetano-Silva *et al.* 2015; Hedhili *et al.* 2015; Jiménez-Moreno *et al.* 2020).

Les protéases sont distinguées en deux sous-classes : les endopeptidases, qui hydrolysent les liaisons à l'intérieur des chaînes peptidiques, produisant des peptides de toutes tailles ; et les exopeptidases qui coupent les liaisons aux extrémités, libérant des petits peptides et acides aminés. Les exopeptidases sont subdivisées en deux groupes en fonction de l'extrémité hydrolysée : C-terminal pour les carboxypeptidases (EC 3.4.16-18.-) et N-terminal pour les aminopeptidases (EC 3.4.11.-). Les endopeptidases sont subdivisées en quatre groupes en fonction du mécanisme de leur site catalytique : les protéases à sérine (EC 3.4.21.-), les protéases à cystéine (EC 3.4.22.-), les protéases à acide aspartique (EC 3.4.23.-) et les métalloprotéases (EC 3.4.24.-).

Chaque enzyme possède une plage particulière de fonctionnement de *pH* et de température, ainsi qu'une spécificité de la liaison peptidique qui sera clivée, comme le montre le **Tableau 1**. Les peptides seront donc de tailles différentes et avec une composition en acides aminés différentes pour un même substrat, mais des enzymes différentes. Par conséquent, cette spécificité de l'enzyme influence également les propriétés de l'hydrolysat. Pour un même substrat d'isolat de protéines du colza par exemple, un criblage de quatre enzymes a montré une amélioration de solubilité similaire à tous les *pH* (>80%). En ce qui concerne les capacités émulsifiantes, la pepsine a montré des émulsions très instables et la trypsine présentait des émulsions très stables, ce qui était expliqué par le clivage au niveau des lysines et arginines (augmentation du nombre de charges positives) (Alashi *et al.* 2018).

La spécificité des protéases peut aussi avoir différents degrés. Il n'y a pas de classification précise, mais un concept de « sélectome », qui est défini comme « un ensemble de séquences d'AA dont la nature, le nombre et la position sont déterminées par le site catalytique, qui est unique à cette protéase et représente ainsi sa signature protéolytique » (Ratnikov *et al.* 2021). Ainsi, plus le sélectome est petit, plus la protéase est considérée comme « hautement spécifique » (par exemple la trypsine) (Vizovišek *et al.* 2018). Plus le sélectome est grand, plus

la protéase peut être considérée comme « peu spécifique » ou « aspécifique » (par exemple la pepsine) (Ahn *et al.* 2013).

Tableau 1 : Sites de clivage de certaines endopeptidases très utilisées pour la production d'hydrolysats protéiques. X : n'importe quel acide aminé. (Whitehurst & Oort 2010)

Classification	Nom enzyme	pH	Température (°C)	Coupure après l'AA
<b>Protéase à sérine</b>	Chymotrypsine EC 3.4.21.1	7 – 9	37 – 50	Tyr, Trp, Phe, Leu
	Trypsine EC 3.4.21.4	7 – 9	37 – 60	Arg, Lys
	Subtilisine EC 3.4.21.12	6 – 10	40 – 65	AA hydrophobes
<b>Protéase à cystéine</b>	Cathepsine B EC 3.4.22.1	3 – 7	40	Arg, Lys, Phe-X
	Papaïne EC 3.4.22.2	5 – 9	65	Arg, Lys, Phe-X
	Ficine EC 3.4.22.3	5 – 8	60	Phe, Tyr
	Bromélaïne EC 3.4.22.4	5 – 8	50 – 60	Lys, Arg, Phe, Tyr
<b>Protéase à acide aspartique</b>	Pepsine EC 3.4.23.1	1 – 4	30 – 50	AA aromatiques, Leu, Asp, Glu
	Chymosine EC 3.4.23.4	3 – 6	40 – 55	Phe <sub>105</sub> -Met <sub>106</sub> (caséine)
<b>Métalloprotéase</b>	Thermolysine EC 3.4.24.27	5 – 9.5	70	Ile, Leu, Val, Phe (aspécifique)

Les protéases utilisées pour la fabrication d'hydrolysats peuvent être d'origine animale (trypsine, pepsine), végétale (ficine, papaïne) ou microbienne (subtilisine, thermolysine). Le procédé peut utiliser une seule enzyme purifiée, un mélange comprenant plusieurs enzymes avec plusieurs activités (exo- ou endopeptidiques) (Vidal *et al.* 2018), ou bien une hydrolyse séquentielle avec une enzyme différente à chaque étape (Polanco-Lugo *et al.* 2014). La Flavourzyme® par exemple, un extrait de protéases très utilisé industriellement, et est composé de quatre exopeptidases et trois endopeptidases (Merz *et al.* 2015a). Le choix de l'enzyme dépend des protéines à hydrolyser. Des criblages de différentes enzymes sur les protéines choisies sont nécessaires pour sélectionner le couple enzyme/protéine donnant lieu à l'hydrolysat satisfaisant qualitativement (distribution des masses molaires, propriétés fonctionnelles, *etc.*) (Durand *et al.* 2021a).

### I.1.3. Propriétés des hydrolysats protéiques en alimentation humaine

L'intérêt de l'utilisation des hydrolysats protéiques en alimentation humaine réside dans l'amélioration possible de leurs propriétés nutritionnelles et/ou fonctionnelles par le procédé de protéolyse. Par ailleurs, ce procédé peut également permettre la libération de peptides bioactifs applicables en sécurité alimentaire. Ainsi, des hydrolysats protéiques sont retrouvés dans des formulations alimentaires sous forme de sauces, assaisonnements, bouillons (Surówka & Fik 1996; Linder *et al.* 1997; Масленникова (RU) *et al.* 2009; Ito & Matsuyama 2021), mais aussi en tant que suppléments protéiques dans les boissons énergétiques, la nutrition sportive, les régimes de contrôle de poids, l'alimentation infantile et gériatrique.

#### I.1.3.1. Propriétés nutritionnelles des hydrolysats protéiques

Les différentes catégories de population (enfants, adultes, hommes, femmes) ont des besoins différents en protéines pour le fonctionnement de leur organisme. Toutefois, les propriétés nutritionnelles des protéines apportées dans l'alimentation ne sont pas toujours suffisantes. Les propriétés nutritionnelles comprennent l'apport en acides aminés essentiels (Lys, Met, His, *etc.*), la digestibilité et la biodisponibilité. La composition en acides aminés (aminogramme) n'est pas un facteur variable, mais la digestibilité (capacité des protéases de l'intestin à produire des peptides pouvant être absorbés dans les tissus (Ganapathy 2012)), et par conséquent la biodisponibilité (fraction d'un nutriment absorbé par le tract gastro-intestinal et pouvant être utilisé par l'organisme (Hurrell 2002)) peuvent être impactées par la présence de facteurs antinutritionnels des protéines. C'est le cas notamment pour les protéines végétales (petit pois, riz, soja, haricots, cacahuète, blé) qui ont montré jusqu'à 3,5 fois moins d'acides aminés essentiels assimilés par rapport aux protéines du lait (Hoffman & Falvo 2004; Rutherford *et al.* 2015). L'élimination des facteurs indésirables est généralement réalisée en amont pour l'obtention d'ingrédients protéiques et la protéolyse enzymatique peut être appliquée pour améliorer la digestibilité et la biodisponibilité de ces ingrédients. Par exemple, les napines, l'une des principales protéines de la graine de colza, sont résistantes à la digestion gastro-intestinale à cause de leur conformation globulaire compacte, renforcée par des ponts disulfure (Jyothi *et al.* 2007b). Alors qu'avec un procédé enzymatique au préalable, une conversion protéine-peptide ( $Xp$ ) jusqu'à 90% a pu être obtenue (*cf.* §I.2.3.1.2 p.44 *EB*), ce qui a facilité l'accessibilité aux sites de coupures des protéases gastro-intestinales et a amélioré, jusqu'à trois fois, la digestibilité finale *in-vitro* (Beaubier *et al.* 2023).

### I.1.3.2. Diminution de l'allergénicité

L'allergénicité est la capacité d'un allergène à induire une réponse immunitaire anormale, une réaction excessive, qui provoque un trouble de la fonction physiologique (troubles respiratoire, digestif) ou des lésions tissulaires (urticaire, œdème) (Zhang & Tao 2015).

En ce qui concerne les allergies alimentaires, ce sont expressément les protéines qui sont responsables de la réponse immunitaire, et l'application de l'hydrolyse enzymatique s'est révélé être un outil efficace pour diminuer leur allergénicité. L'exemple de l'allergie au lait bovin est un problème bien connu notamment chez les enfants génétiquement prédisposés au développement d'une hypersensibilisation à la caséine dans les deux premières années de leur vie (Docena *et al.* 1996). L'emploi de la protéolyse enzymatique par la trypsine a permis de produire un hydrolysate avec 96% de peptides en dessous d'une masse molaire de  $500 \text{ g.mol}^{-1}$ , ce qui a eu pour effet de réduire drastiquement la réponse immunitaire (Cordle *et al.* 1991). Cependant, pour l'obtention d'un hydrolysate hypoallergénique, appelé formulation infantile de « troisième génération », il a été rapporté que des traitements thermiques et/ou de séparation membranaire sont nécessaires en plus de l'hydrolyse pour enlever les peptides supérieurs à  $3400 \text{ kg.mol}^{-1}$ , encore sujets à une détection d'allergènes (Görtler *et al.* 1995). De plus l'absorption des acides aminés libres est plus lente que celle des di- et tri-peptides, ce qui conduit à leur accumulation dans le gros intestin et qui seront inutilisés (Ganapathy 2012). Ainsi, les dernières formulations ont une fraction en acides aminés de 20% en moyenne, contre 70% pour les premières générations (Siemensma *et al.* 1993).

Chez les insectes, ce sont les protéines musculaires et structurales pour la majorité qui ont montré des réactions allergiques, au même titre que les allergies provoquées par les acariens et les crustacés. Ce sont, en effet, des pan-allergènes des invertébrés, « une classification d'allergènes mineurs, mais qui sont des molécules ubiquitaires et responsables de la réactivité croisée de l'immunoglobuline E avec une grande variété de sources allergéniques apparentés ou non » (Hauser *et al.* 2010). Pour éliminer cette allergénicité, les traitements par l'hydrolyse de la pepsine et de l'alcalase seules ou assistées, ou avec un pré-traitement (haute température ou haute pression hydrostatique) se sont révélés efficaces pour produire de peptides en dessous de  $10 \text{ kg.mol}^{-1}$  (taille des protéines entre 10 et  $120 \text{ kg.mol}^{-1}$ ), ce qui a réduit la réaction immunitaire jusqu'à 90% (Mejrhith *et al.* 2017; Boukil *et al.* 2020).

Le soja présente également une allergénicité élevée (Wilson *et al.* 2005). Pour une application dans les formulations infantiles, des hydrolysates développées par traitement

enzymatique ont été mises au point. Comme l'hydrolyse par une protéase alcaline de *Bacillus sp.* (Proleather FG-F) permettant l'obtention d'une protéolyse très avancée, au degré d'hydrolyse (*DH*) de 40% (cf. §I.2.3.1.1 p.44 *EB*) en hydrolysant toutes les protéines allergènes (>30 kg.mol<sup>-1</sup>) présentes dans l'isolat de protéines de soja (Tsumura *et al.* 1999). Il semblerait que les fragments peptiques entre 1 et 10 kg.mol<sup>-1</sup> gardent encore environ 20% d'allergénicité résiduelle, en revanche la fraction de peptides entre 0,5 et 3 kg.mol<sup>-1</sup> n'en a aucune (Barca *et al.* 2005).

### I.1.3.3. Propriétés organoleptiques

Plusieurs études ont montré que la nature des fonctions des acides aminés influe sur la perception gustative (Roudot-Algaron 1996). Ainsi, les hydrolysats peuvent présenter une large gamme gustative comme le goût *umami* et salé dans les produits à base de soja et pour des préparations de bouillons ou de sauces (Yan *et al.* 2021; Bak *et al.* 2021; Li *et al.* 2022). Toutefois, une problématique liée à la perception gustative, souvent rapportée dans la littérature, est l'apparition d'amertume dans le produit. Il a été démontré qu'il s'agissait des acides aminés hydrophobes et des peptides courts en contenant, qui en étaient responsables (Boudreau 1979). Cela implique la recherche de post-traitements pour pallier cette amertume tels que l'utilisation d'exopeptidases (aminopeptidase et carboxypeptidases) en seconde étape d'hydrolyse permettant de dégrader les peptides amers sur des hydrolysats de lait, soja et poissons (Raksakulthai & Haard 2003). Des procédés de purification ont également été envisagés comme la chromatographie d'intégration hydrophobe qui capte efficacement les peptides hydrophobes (Helbig *et al.* 1980).

### I.1.3.4. Propriétés fonctionnelles des hydrolysats protéiques

Les protéines ont des propriétés nutritionnelles et organoleptiques intéressantes, mais également des propriétés fonctionnelles dont les applications sont recherchées en alimentation. Les propriétés fonctionnelles des protéines regroupent les propriétés physiques et chimiques qui gouvernent leur comportement dans les matrices alimentaires pendant leur préparation, transformation, stockage, et consommation (Kinsella 1981). Cela comprend les propriétés d'hydratation (solubilité, rétention d'eau ou d'huile, mouillabilité), de surface (émulsification, mousse) et de texturation (élasticité, viscosité, gélation, épaississement, agrégation), que l'hydrolyse enzymatique peut modifier ou améliorer (Panyam & Kilara 1996; Kunst 2002). Le type de propriété fonctionnelle demandée pour une protéine ou un mélange de protéines et peptides varie selon le système alimentaire étudié (viande, lait, soja, *etc.*), ainsi tous ces aspects

doivent être pris en compte pour un meilleur compromis dans la formulation du produit (Kinsella *et al.* 1985).

#### I.1.3.4.1. Propriétés d'hydratation

Les propriétés d'hydratation des protéines est leur capacité à recruter les molécules d'eau. Elles regroupent la solubilité et la capacité de rétention d'eau. La capacité de rétention de lipide est aussi parfois comptée dans cette catégorie étant donné que ce phénomène agit comme un conservateur de saveurs et améliore le goût des aliments en bouche (Kinsella & Melachouris 1976).

La solubilité des protéines est la propriété principale qui régit beaucoup d'autres propriétés fonctionnelles et représente un bon indicateur des possibilités et limites applicatives des protéines ou hydrolysats (Moure *et al.* 2006). Elle dépend du *pH*, de la température, de la salinité et de la concentration des composants. Le mécanisme comprend surtout des interactions hydrophobes (protéine-protéines ou protéine-peptide ou peptide-peptide) qui diminuent la solubilité, et des interactions ioniques avec l'eau, ce qui augmente la solubilité (Kristinsson & Rasco 2000). Ainsi, la solubilité des protéines de l'isolat de soja (utilisé dans la transformation des produits à base de viande) a pu être améliorée par protéolyse avec l'alcalase 0,6L ou la neutrase 0,5L (*pH* 8 et *pH* 7 respectivement à 50°C) en libérant les fonctions polaires enfermées dans les protéines, ce qui rend la solubilisation plus facile à température ambiante (Adler-Nissen & Olsen 1979). En revanche, la même étude montre que même avec un haut *DH*, au point isoélectrique (*pI*) (cf. §I.2.1.1 p.29 *EB*) de la protéine l'hydrolysats ne sera pas soluble à 100%, même si la solubilité peut être augmentée jusqu'à 50%.

#### I.1.3.4.2. Propriétés de surface

La propriété de surface est la capacité de diminuer la tension interfaciale entre les composants hydrophobes et hydrophiles des aliments. Elle comprend la capacité émulsifiante (phase huile/eau) et la capacité moussante (phase air/eau) (Kristinsson & Rasco 2000).

De nombreux produits alimentaires sont des mélanges complexes de substances arrangées de manière à produire un ensemble agréable en matière de saveurs et texture. Nombreuses sont mousses et émulsions, des mélanges hétérogènes air/eau et eau/huile qui pourtant s'accordent dans une structure uniforme, comme les mousses au chocolat, les vinaigrettes ou la mayonnaise. Les protéines font partie des molécules permettant de stabiliser ce phénomène par leur nature amphiphile. En effet, après dispersion des bulles ou des gouttelettes d'huile dans l'eau pour former la mousse ou l'émulsion, la coalescence des bulles et gouttelettes formées est évincée

en réduisant la tension aux interfaces air/eau et huile/eau avec un changement de conformation des protéines, de manière à mettre en contact les parties hydrophobes avec la phase lipidique (émulsion) ou la phase gazeuse (mousse), et la partie hydrophile avec la phase aqueuse (Kunst 2002). La stabilité en revanche, dépend des propriétés viscoélastiques des protéines et de leur résistance à la rupture. Ainsi, plus les protéines sont grandes en taille, plus elles ont tendance à retrouver leur forme initiale, alors que les peptides sont plus flexibles. Ainsi, nombre d'études se sont penchées sur la production d'hydrolysats protéiques, avec une nette amélioration de leurs propriétés moussantes et émulsifiantes, ainsi que de leur stabilité (Caessens 1999). Cependant, les capacités varient en fonction du *pH*, de la nature de l'enzyme (masse de peptides requise d'environ  $5000 \text{ g.mol}^{-1}$  (Chobert *et al.* 1988)), de la nature des protéines (plus de 30% d'acides aminés hydrophobes nécessaires (Kato & Nakai 1980)) et de l'avancement de l'hydrolyse. D'où l'importance de la pré-sélection en se basant sur l'aminogramme des protéines et une méthodologie efficace de criblages de paramètres (Chobert *et al.* 1988; Tezera 1998; Fierens *et al.* 2016).

#### I.1.3.4.3. Propriétés texturantes

Les propriétés texturantes des protéines permettent de changer l'organisation d'un aliment en jouant sur les éléments le constituant par la viscosité, l'élasticité, l'agrégation et la gélation entre autres (Kunst 2002).

Un gel est « un réseau tridimensionnel avec un comportement intermédiaire entre un solide et un liquide possédant en même temps les propriétés élastique (solide) et visqueuse (liquide) » (Banerjee & Bhattacharya 2012) dont l'application alimentaire est présente dans les confitures, les gelées, la confiserie, les desserts et les yaourts. Communément, ce sont les polysaccharides et les protéines qui sont utilisées comme biopolymères capables de former ces réseaux tridimensionnels et de donner une certaine forme malléable aux aliments ou de les rendre onctueux (Desprairies 2010). La formation des gels par les protéines se fait par leur capacité à s'agréger *via* leurs parties hydrophobes (acides aminés, feuillettes  $\beta$  (Qi *et al.* 1997)). Or, elles sont enfermées dans la structure interne des protéines. Ainsi, une hydrolyse partielle est nécessaire pour déplier la protéine et/ou obtenir des peptides entre 2000 et  $6000 \text{ g.mol}^{-1}$  qui formeront un réseau de réticulation par des interactions intramoléculaires (Otte *et al.* 1997).

De la même manière, les protéines servent aussi d'agents épaississants (soupes, veloutés, sauces, garnitures). A la différence des gels, il n'y a pas d'interactions fortes, ce sont des

interactions polymère-solvant avec un enchevêtrement non spécifique desdites chaînes polymères (Saha & Bhattacharya 2010).

La viscosité peut être modulée en fonction de la taille des peptides et de leur concentration. La diminution en taille des molécules conduit ainsi à une diminution de viscosité de la solution (Adler-Nissen & Olsen 1979). En revanche, une augmentation de peptides accroîtra les interactions entre les protéines hydratées et l'absorption d'eau, ce qui augmentera la viscosité de manière exponentielle (Diniz & Martin 1997).

#### I.1.4. Caractérisation des hydrolysats protéiques

La fragmentation protéique résulte donc en un mélange complexe de peptides aux différentes tailles (différents nombres d'acides aminés liés), voire d'acides aminés libres. Les analyses classiques réalisées pour caractériser les hydrolysats sont l'aminogramme, la répartition de masse molaire des peptides, leur concentration et le profil d'hydrophobie. Ces caractéristiques sont utiles pour expliquer les différents caractères physico-chimiques des hydrolysats (solubilité, goût, texture, *etc.*).

L'aminogramme est le profil des acides aminés identifiés avec leur abondance relative (en nombre, pourcentage ou concentration). Il permet l'évaluation de la quantité d'acides aminés essentiels, hydrophiles ou hydrophobes présents, et est principalement réalisé par une hydrolyse chimique (acide et/ou basique) suivie d'une analyse en chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (Chalamaiah *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013; Bassan *et al.* 2015).

La détermination de la concentration peptidique a d'abord été faite de manière globale, par des méthodes de dosage d'azote (Kjeldahl) ou spectrophotométrique (Buiret, Lowry) (Silvestre 1997). Cependant, cela ne permettait pas de distinguer les possibles variations au sein des différentes populations peptidiques. Par conséquent, les récents développements en CLHP d'exclusion stérique (ES) ont permis de faire une quantification à partir du chromatogramme entier représentatif de l'hydrolysats, en utilisant l'aminogramme de la protéine d'étude et l'estimation du coefficient d'extinction molaire des AA (Kuipers & Gruppen 2007). Cela permet ainsi d'obtenir la concentration pour chaque masse peptidique présente (Bodin *et al.* 2015).

La répartition de masses (ou tailles) molaires classe les peptides en fonction de leur taille et de leur proportion dans l'hydrolysats (pourcentage ou fréquence cumulée). Il permet ainsi de comparer les hydrolysats sur base de cette diversité de pourcentages des populations

peptidiques induite en fonction des couples enzymes/protéines utilisés (Leduc *et al.* 2020), du temps d'hydrolyse (Wang *et al.* 2013) ou encore de suivre l'enrichissement en certaines masses par une membrane de filtration (Chabeaud *et al.* 2009b). Elle est réalisée aussi par une CLHP-ES, une technique qui permet justement de trier les molécules de la plus grande à la plus petite puis d'estimer le pourcentage en convertissant le signal chromatographique en concentration peptidique (Bodin *et al.* 2015).

L'hydrophobie a été définie comme « la thermodynamique de partitionnement des composés non-polaires entre l'eau et une phase non-aqueuse » (Karplus 1997). Ainsi, les composés ayant une affinité avec l'eau sont dits « hydrophiles » ou « polaires », alors que les composés n'ayant pas d'affinité avec l'eau, et donc formant une phase à part, sont appelés « hydrophobes » ou « apolaires ». Les différents AA possèdent des groupements polaires ou apolaires sur leur ramification latérale, mais c'est le milieu de solvation ainsi que leur enchaînement dans la protéine ou les peptides qui déterminent le degré global d'hydrophobie (Charton & Charton 1982). Pour cette raison, la cystéine, la glycine et la proline sont considérées comme des cas spéciaux, car elles ont parfois des affinités hydrophobes (Rose & Wolfenden 1993) et parfois hydrophiles (Cowan & Whittaker 1990) en fonction des solvants et méthodes d'analyse utilisées (CLHP, tension de surface, solubilité). Une protéine est un hétérodimère d'AA hydrophobes et hydrophiles. Il est admis que le repliement tridimensionnel et la stabilité des protéines sont dues en grande partie aux interactions des AA hydrophobes, même si le mécanisme exact est encore non élucidé et sujet à de nombreuses études (Rose *et al.* 1985; Moelbert *et al.* 2004; Glyakina & Galzitskaya 2010; Kawagoe *et al.* 2022). Lorsqu'une protéine est fragmentée, les AA hydrophobes sont exposés, et ainsi la surface hydrophobe sera plus grande dans un hydrolysats que dans une protéine intacte (Jo *et al.* 2020). Tous ces fragments peptidiques, composés d'AA hydrophobes et hydrophiles sont alors des composés « amphiphiles » avec divers degrés d'hydrophobie générale. Ainsi, des outils de calculs basés sur l'hydrophobie des AA composant le peptide ou la protéine ont été mis en place pour une approximation de leur hydrophobie (Peptide 2.0 Inc. 2022). Autrement, une CLHP en phase inverse est communément réalisée pour séparer les peptides en fonction de leur hydrophobie (Aguirre *et al.* 2008; Girgih *et al.* 2013).

### 1.1.5. Génération de peptides bioactifs

Parallèlement à l'application alimentaire pure, la nature des molécules contenue dans le lait a été investiguée pour comprendre leur rôle dans la croissance en bonne santé du nourrisson. Ainsi, des phosphopeptides issus de la caséine ont été mis en évidence avec une action de

renforcement de la calcification des os chez les nourrissons rachitiques (Mellander 1950). Depuis, de nombreuses autres activités biologiques ont été mises en lumière dans toutes les sources protéiques alimentaires (de Castro & Sato 2015). Parmi les bioactivités on retrouve l'activité antioxydante (Karnjanapratum *et al.* 2017), anti-thrombotiques (Gibbs *et al.* 2004), anti-hypertensive (Koyama *et al.* 2013), hypocholestérolémiques (Nagaoka *et al.* 2001) ou encore immunomodulateurs (Kayser & Meisel 1996), entre autres. Par conséquent les peptides ont non seulement un apport nutritif, mais ont une vraie valeur ajoutée dans l'alimentation. De ce fait, avec toutes les possibilités applicatives dans le domaine des additifs alimentaires et dans l'industrie pharmaceutique, le développement des procédés d'identification, d'obtention et de purification des peptides bioactifs représente un enjeu majeur dans la transformation de la société qui demande l'utilisation de molécules biosourcées respectueuses de l'environnement (Kate *et al.* 2022).

#### I.1.5.1. Définition et variété des peptides bioactifs

Les peptides bioactifs, ou biopeptides, sont définis comme étant des « fragments de protéine spécifiques (2 à 20 acides aminés) ayant un impact positif sur la fonction ou la condition corporelle et pouvant, à terme, influencer la santé » (Kitts & Weiler 2003a). Ces découvertes ont l'intérêt de remplacer des molécules produites de manière artificielle par des molécules « naturelles » et saines. Ainsi, de multiples projets de production de peptides bioactifs se sont développés, que ce soit par hydrolyse enzymatique ou par fermentation microbienne, à partir d'aliments primaires (lait, œufs, riz, soja), et surtout à partir de co-produits des industries alimentaires (Chakrabarti *et al.* 2018). De multiples revues et publications ont répertorié des peptides bioactifs, avec leurs bioactivités et séquences associées (Kitts & Weiler 2003a; Udenigwe & Aluko 2012; Chalamaiah *et al.* 2012; Saadi *et al.* 2015; de Castro & Sato 2015; Pihlanto & Mäkinen 2016; Nasri 2017; Viridi & Singh 2017; Bechinger & Gorr 2017; Daliri *et al.* 2017; Albenzio *et al.* 2017; Durand *et al.* 2021b).

#### I.1.5.2. Application en sécurité alimentaire

L'accent sera fait sur les peptides pouvant être appliqué en sécurité alimentaire, à savoir les peptides antimicrobiens et antioxydants. En effet, la préservation des produits alimentaires contre des phénomènes naturels de dégradation ou de la contamination microbienne extérieure qui altèrent leur composition, diminuent leur durabilité et dégradent leurs propriétés organoleptiques, est un sujet de préoccupation majeur des industriels (Fontanille & Larroche 2010). Le moyen le plus répandu est l'ajouter des conservateurs, des molécules synthétisées

artificiellement, aux propriétés antimicrobiennes et/ou antioxydantes. Or, les études de ces dernières décennies montrent que ces molécules provoquent des allergies, cancers ou sont des perturbateurs endocriniens (Lester 1995; Pop *et al.* 2013; ANSES *et al.* 2017). Les peptides, molécules biosourcées et saines, permettent alors une alternative très prometteuse comme le montre la multitude de recherches dans *Figure 2*. Les criblages des hydrolysats issus de différentes sources protéiques à la recherche d'activité antimicrobienne ou chélatrice pour l'application alimentaire ont découlé sur un nombre croissant de publications au fur et à mesure à partir des années 1990, avec l'importance de développer leur production (García-García & Searle 2016; Ashaolu 2020)

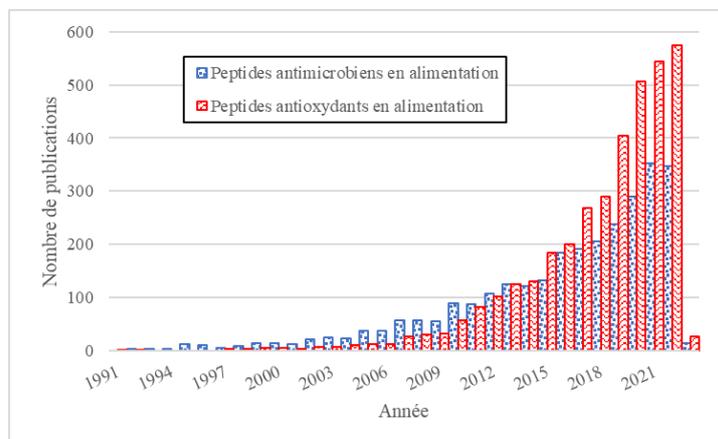


Figure 2 : Nombre de publications par an sur la recherche de peptides antimicrobiens et antioxydants pour l'application en alimentation (données issues de Web of Sciences).

#### 1.1.5.2.1. Peptides antimicrobiens

La préservation des aliments des contaminations par les microorganismes (principalement par *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolytica*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus paraciticus* (Viridi & Singh 2017)) est primordiale, car en outre de la détérioration alimentaire (visuelle ou qualitative), ils peuvent induire des intoxications aux conséquences graves (fièvre, vomissements, diarrhée, décès). La détermination et la synthèse de molécules particulières à action biocide a permis de les employer comme agents conservateurs dans la grande distribution : les acides organiques (acide sorbique, acide benzoïque, acide acétique) (Ricke 2003), les nitrites et nitrates (Wolff & Wasserman 1972), dioxyde de soufre et sulfites, éthylène et propylène d'oxyde (Saunders *et al.* 2018), et quelques antibiotiques (Gould 1995; Landers *et al.* 2012). La panoplie des traitements est vaste, mais l'attente des consommateurs est dirigée vers des aliments avec le moins de traitements possibles et sans conservateurs « chimiques ». De plus, l'adaptation des

microorganismes aux biocides est un vrai fléau, le développement des multirésistances les rendant coriaces et difficiles à éliminer, ce qui demande continuellement la recherche de nouvelles molécules (Russell 1999).

Les protéines et les peptides antimicrobiens (AMP pour « anti-microbial peptide ») font partie intégrale du système immunitaire de nombreux organismes (Zasloff 2002). Actuellement, 3569 séquences peptidiques ont été référencées (isolées ou potentiellement prédites par une analyse *in silico*) à partir d'organismes de bactéries, champignons, plantes et animaux avec une vingtaine d'activités antimicrobiennes différentes (anti-bactérienne, anti-biofilm, anti-endotoxine, anti-toxine, anti-virale, anti-fongique, *etc.*) (University of Nebraska - Medical center 2019).

#### I.1.5.2.1.1. Classification des AMP

Ces AMP peuvent être classés de différentes manières : selon la source (microorganismes, insectes, mammifères, plantes, amphibiens, poissons), la structure, la richesse en certains acides aminés (proportion supérieure à 25% en proline, tryptophane, arginine, histidine ou glycine) ou la taille. La classification selon la structure divise les peptides en 4 familles : ceux qui possèdent des hélices  $\alpha$ , ceux qui ont des feuillets  $\beta$ , ceux qui ont des hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ , et ceux qui ont une simple chaîne linéaire (Huan *et al.* 2020). La distinction par la taille, classe les peptides ayant entre 2 et 10 acides aminés dans la catégorie des « ultra-courts », entre 11 et 24 acides aminés les « courts », entre 25 et 50 acides aminés les « moyens », et entre 51 et 100 acides aminés les peptides « longs ». Au-delà de 100 AA, ce sont des protéines antimicrobiennes (University of Nebraska - Medical center 2019).

#### I.1.5.2.1.2. Mécanisme d'action

La majorité des AMP sont des peptides cationiques (88%), avec seulement une faible proportion de neutres (6%) et anioniques (6%) (University of Nebraska - Medical center 2019), expliquant leur mode d'action. Il est, en effet, admis que l'action générale des AMP est une perméabilisation de la membrane des pathogènes grâce à leurs charges positives par interaction électrostatique, qui se lie avec les lipopolysaccharides, chargés négativement (Powers & Hancock 2003). De ce fait, les AMP les plus efficaces devraient avoir une distribution équilibrée entre les charges positives (sur les résidus d'arginine et de lysine) et l'hydrophobicité (apportée par les résidus des acides aminés isoleucine, valine, phénylalanine, tyrosine et tryptophane) (Mikut *et al.* 2016). Ainsi, les peptides peuvent s'insérer dans la membrane cellulaire (chargé négativement) des bactéries et créer des porosités (Bechinger & Gorr 2017),

selon différents modes d'actions (pores toroïdaux, pores en tonneau, formation de tapis) (Huan *et al.* 2020).

En plus de la perméabilisation de la membrane, certains AMP peuvent être transférés dans la cellule par endocytose inverse. Dans ce cas, les résidus basiques des AMP interagissent avec les phospholipides de la membrane en induisant une forte courbure de la membrane en s'entourant des phospholipides. Cela découle sur une déstabilisation de la bicouche en formant une invagination de la membrane, entraînerait une formation d'une micelle inverse qui encapsule les peptides, qui seront finalement relâchés du côté intracellulaire (Lamazière *et al.* 2007).

La perméation de la membrane peut entraîner la destruction de la cellule par la perte de son cytoplasme, entraînant la fuite de toute la « machinerie » nécessaire à son fonctionnement (enzymes, ADN, organelles). Elle peut également faciliter l'entrée d'AMP, catégorisé à action « non-lytique », c'est-à-dire à action d'inhibition de synthèse protéique, nucléique, activité enzymatique, ou division cellulaire (Scocchi *et al.* 2015; Huan *et al.* 2020). C'est par exemple l'action attribuée à la napine (protéine du colza), dont les recherches suggèrent qu'elle se lie spécifiquement à la sous-unité ribosomale 50S (1XBP) de *Deinococcus radiodurans* et de *Staphylococcus aureus* par des liaisons hydrogènes, résultant sur une action bactériostatique (Rahman *et al.* 2020).

### I.1.5.2.2. Peptides antioxydants

#### I.1.5.2.2.1. L'oxydation et les espèces réactives

Si la contamination microbienne peut être maîtrisée, l'aliment subira tout de même un autre phénomène naturel de détérioration : l'oxydation. L'oxydation est le processus au cours duquel un atome perd des électrons (Silverstein 2011). Cependant, ce processus est problématique lors de transfert d'électron unique, générant des radicaux libres comme le superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ), le peroxyde ( $ROO^{\cdot}$ ), l'alcoxyde ( $RO^{\cdot}$ ), l'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ) et le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\cdot}$ ). Ils sont connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species ») et d'azote (RNS pour « reactive nitrogen species »). Les molécules non-radicalaires mais précurseurs de radicaux, font également partie de ces catégories, comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'ozone ( $O_3$ ), l'acide hypochlorique ( $HOCl$ ), acide nitreux ( $HNO_2$ ), l'ion peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ), le trioxyde de diazote ( $N_2O_3$ ) et l'hydroperoxyde ( $ROOH$ ) (Halliwell & Gutteridge 1990; Swain *et al.* 2002).

Les produits alimentaires subissent ainsi les phénomènes d'oxydation tout le long des étapes d'acheminement à partir de leur récolte et jusque dans l'assiette (stockage, distribution, vente). Les ROS sont responsables de l'altération de la saveur, de l'odeur, de la couleur et de la durabilité (Aruoma 1994; Elias *et al.* 2008).

En termes d'aliments, un antioxydant a été défini comme « toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou inhibe considérablement l'oxydation de ce substrat » (Halliwell & Gutteridge 2015). Les molécules antioxydantes ont été divisées en deux classes selon leur action : les antioxydants primaires qui brisent la cascade oxydative par activité antiradicalaire, et les antioxydants secondaires qui préviennent l'oxydation par activité chélatrice (Apak *et al.* 2013).

#### I.1.5.2.2.2. Activité antioxydante primaire – action antiradicalaire

La cascade oxydative est stoppée lorsqu'un électron de l'antioxydant primaire est apparié à l'électron réactif de l'espèce instable. Ces antioxydants primaires sont donc des réducteurs, des donneurs d'électrons, comme le montre l'*Eq. 1* suivante (Apak *et al.* 2013) :



Avec  $R^{\cdot}$  un radical quelconque (y compris peroxy et alkoxy),  $AH$  l'antioxydant primaire avec l'hydrogène, qui sera transféré avec un électron, et  $A^{\cdot}$  l'antioxydant primaire avec un électron non apparié, mais stable. C'est le principe des tests pour déterminer la capacité antiradicalaire des potentielles molécules antioxydantes, comme les tests au 2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH), le 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acide) (ABTS), ou la méthode de mesure de la capacité d'absorption des radicaux oxygénés (ORAC pour « Oxygen radical absorbance capacity ») (Gülçin 2012). Ces méthodes utilisent des molécules avec des propriétés différentes selon leur forme oxydée ou réduite (couleur, fluorescence). Ainsi, par exemple, pour mesurer l'effet d'une autre molécule antioxydante, le DPPH doit être rendu oxydé au préalable avec une espèce réactive ( $DPPH^{\cdot}$ ), puis l'antioxydant testé est ajouté pour réduire le  $DPPH^{\cdot}$  en  $DPPH - H$ , ce qui se traduit par une augmentation d'intensité de couleur mesurée au spectrophotomètre à la longueur d'onde adéquate (Alashi *et al.* 2014a).

Techniquement, les radicaux libres peuvent être capturés par deux principaux mécanismes : le transfert par atome d'hydrogène (HAT pour « hydrogen atom transfer ») et le transfert par électron unique (SET pour « single electron transfer »). Le HAT consiste à transférer un électron

et un atome d'hydrogène en une étape au ligand (radical libre) (MAYER 2011). Le SET se réalise en deux étapes : (i) la molécule fournit un électron au radical libre, elle devient ainsi un radical ; (ii) transfert de l'hydrogène cationique. Les deux mécanismes sont difficilement distinguables et la plupart du temps les deux réactions se font en parallèle et conduisent au même résultat, mais les cinétiques et les potentiels d'ionisation diffèrent (Liang & Kitts 2014). La *Figure 3* reprend la schématisation des mécanismes proposés par Esfandi *et al.* (2019) pour les résidus de tyrosine, cystéine et histidine.

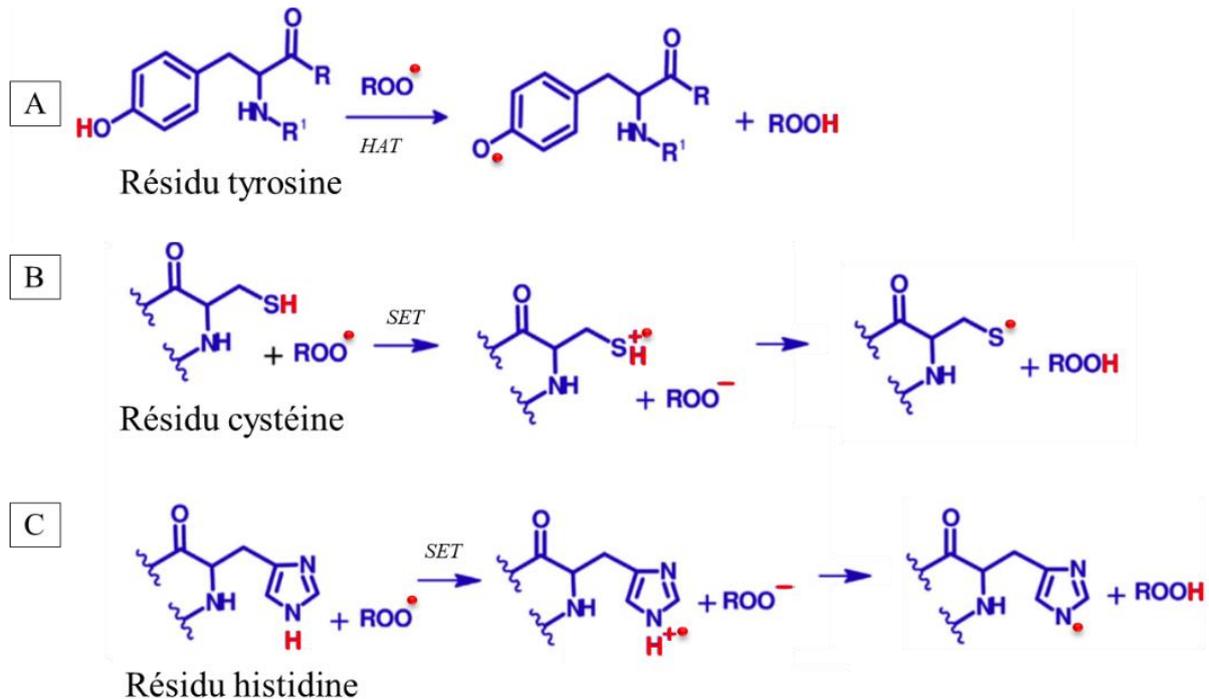


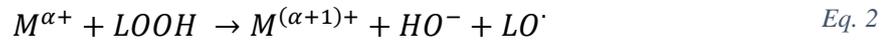
Figure 3 : Mécanismes proposés de HAT et SET de stabilisation des radicaux par les résidus d'acides aminés (Esfandi *et al.* 2019). (A) Tyrosine. (B) Cystéine. (C) Histidine.

Ainsi, les petits peptides et peptides ayant des résidus de tyrosine, tryptophane, histidine, phénylalanine, cystéine et méthionine ont été identifiés comme des bons antioxydants, car ce sont de bons réducteurs (donneurs d'électrons). Puis, quand ils sont sous forme radicalaire, ils restent stables par résonance (ou mésomérie) grâce aux cycles, doubles liaisons et des groupes alkyl voisins (Nwachukwu & Aluko 2019; Esfandi *et al.* 2019).

Les peptides antiradicalaires ont été trouvés dans de nombreuses sources d'hydrolysats (hydrolyse enzymatique ou fermentaire) de céréales (Tang & Zhuang 2014; Wang *et al.* 2015a; Yan *et al.* 2015; Jin *et al.* 2016; Du *et al.* 2016; Babini *et al.* 2017), des légumineuses (Ngoh & Gan 2016; Mukhia *et al.* 2021), des oléoprotéagineux (Xue *et al.* 2009b, a; Ren *et al.* 2010; He *et al.* 2012), des poissons (Kim *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2016), des œufs (Nimalaratne *et al.* 2015), de la viande (Ohata *et al.* 2016) et du lait (Pihlanto 2006).

### I.1.5.2.2.3. Activité antioxydante secondaire – action chélatrice

En plus des ROS, les métaux de transition actifs tel que le fer, ( $Fe^{2+}$ ) ou le cuivre ( $Cu^{2+}$ ) sont capables de catalyser la réduction des hydroperoxydes ( $ROOH$ ) en peroxyde ( $ROO\cdot$ ), comme présenté par *Eq. 2* suivante pour l'exemple des lipides (Elias *et al.* 2008) :



Avec  $M$  un métal avec  $\alpha$  charges positives et  $LOOH$  un lipide quelconque. De ce fait, ce sont des pro-oxydants très problématiques pour les lipides dans les formulations alimentaires ou cosmétiques, responsables du rancissement (Durand *et al.* 2021a).

Pour éviter cette réaction, des molécules nucléophiles capables de former plus d'une liaison stable sont nécessaires pour capturer l'ion dans une formation en anneau (The Dow Chemical Company 2021). Le mécanisme reste le même, par HAT ou SET, mais les molécules restent attachées à l'ion métallique. Ce sont des molécules « chélatrices » et l'ion métallique est dit « chélaté ». Les tests comme le FRAP (pour « Ferric reducing antioxydent power ») ou le CUPRAC (pour « Cupric ions reducing antioxidant power ») utilisent des molécules capables de former cette cage autour des les ions métalliques (Gülçin 2012). Par exemple, pour le test FRAP, quand le complexe de 2,4,6-tripyridyl-s-triazine et de  $Fe^{3+}$  ( $[Fe^{3+} - (TPTZ)_2]^{3+}$ ) est formé, la solution est intensément bleue-violette. Pour tester une molécule chélatrice, il faudrait alors qu'elle soit mise en solution au préalable avec le  $Fe^{2+}$ , puis ajouter le TPTZ, qui ne donnera pas de coloration si tous les ions sont chélatés (Durand *et al.* 2021a).

Des petites molécules comme l'ammoniaque ou l'éthylènediamine peuvent former ces complexes chélateurs, mais les complexes les plus stables sont réalisés par des grandes molécules comme l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), capable de former six liaisons comme représenté sur la *Figure 4* (Li *et al.* 2020).

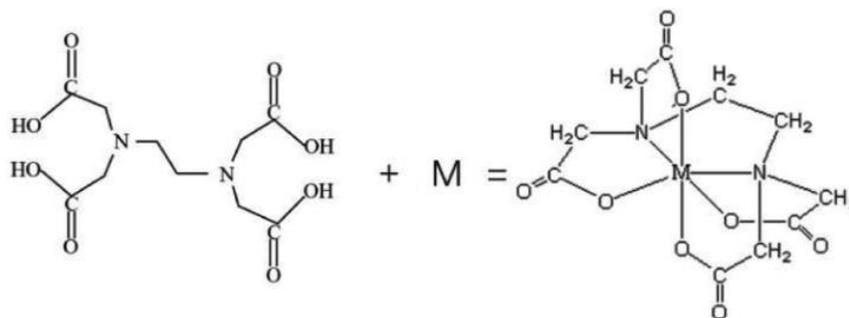


Figure 4 : Chélation d'un cation métallique (symbolisé par la lettre M) par l'EDTA (Li *et al.* 2020).

Pour cette raison, l'EDTA est massivement utilisé pour la préservation des aliments sujets à l'oxydation. Les acides aminés seuls, libres, ne font pas de telles structures. En revanche s'ils

sont assemblés en peptides, la structure totale est grande et est stabilisée par le squelette de la chaîne principale. De ce fait, les chaînes latérales présentent de nombreuses fonctions de complexation possibles avec les cations. Ces fonctions de complexation ont pu être prédites selon le concept d'acide-base de Lewis (Pearson 1969). En effet, un acide de Lewis est un accepteur d'électrons (espèce qui a une orbitale vide) alors qu'une base de Lewis est un donneur d'électrons (espèce qui a un doublet d'électrons). Un classement empirique a ainsi pu être établi des différents acides et bases de Lewis selon leur dureté :

- Dur(e) (I) : liaisons ioniques stables entre acides et bases dures.
- Intermédiaire (II) : liaisons de différente nature *a priori* stables entre acides et bases intermédiaires.
- Doux (doux) (III) : liaisons covalentes stables entre acides et bases douces.

Selon ce principe, les différents cations ont été mis en relation avec les groupements fonctionnels de leurs bases correspondantes, récapitulés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Classements des cations métalliques (acides) et fonctions correspondantes avec leurs groupements fonctionnels (base) de conjugaison stable (d'après Pearson 1969).

	Dur	Intermédiaire	Doux
Acides	$Li^+$ , $Na^+$ , $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Ba^{2+}$ , $Al^{3+}$ , $Ga^{3+}$ , $V^{3+}$ , $Cr^{3+}$ , $Co^{3+}$ , $Fe^{3+}$ , cations de la famille des lanthanides et actinides	$Mn^{2+}$ , $Fe^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ , $Zn^{3+}$ , $Pd^{3+}$	$Cu^+$ , $Ag^+$ , $Cd^{2+}$ , $Au^+$ , $Hg^+$
Bases	Carboxylates (Glu et Asp), Hydroxyle (Ser, Thr, Tyr), Guanidinium (Arg), Carbonyle, alcools, amines, éther, eau, nitrate, sulfate, phosphate, carbonates, etc.	Imidazole (His), amides (Asn, Gln), azote (liaison peptidique), indole (Trp), pyrrole (porphyrine), nitrite, azides, azote (gaz), pyridine, aniline, chloride, etc.	Thiols (Cys), Thioesters (Met), phényl (Phe), éthylène, cyanide, etc.

Ainsi, le mécanisme de chélation par les peptides, présenté en **Figure 5**, a été proposé par Esfandi *et al.* (2019), avec quatre liaisons pour bloquer le cation  $Fe^{2+}$ . De ce fait les fonctions amines et carboxyle terminales ou celles des chaînes latérales, ainsi que les fonctions thiols et surtout imidazoles (histidine) avec un enchaînement d'au moins trois acides aminés, permettent de former des complexes stables avec les cations métalliques, quand la conformation le leur permet (Nwachukwu & Aluko 2019; Paris 2021).

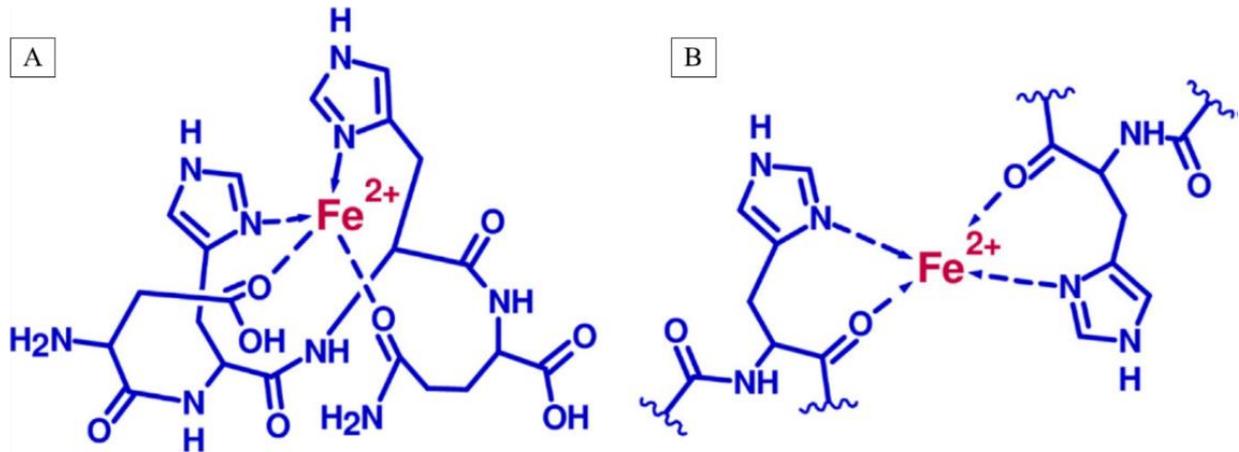


Figure 5 : Mécanisme proposé de chélation par les peptides. (A) Repliement des peptides DHHQ permettant un rapprochement des doublets d'électrons autour du cation métallique avec quatre liaisons. (B) Piégeage entre deux peptides ayant des résidus d'histidine permettant quatre liaisons.

Des peptides chélateurs ont été mis en évidence dans des hydrolysats protéiques issus de ressources végétales : soja (Zhang *et al.* 2010; Mukhia *et al.* 2021), pois chiche (Torres-Fuentes *et al.* 2012), haricots (Carrasco-Castilla *et al.* 2012; Ngoh & Gan 2016), colza (He *et al.* 2013), tourteau de palmier (Zarei *et al.* 2016), sésame (Wang *et al.* 2012), millet perlé (Agrawal *et al.* 2016), médecinier purgatif (Gallegos-Tintoré *et al.* 2011), algues rouges (Cian *et al.* 2016) ; animales : lait (Caetano-Silva *et al.* 2015; Jaiswal *et al.* 2015), canard (Wang *et al.* 2015b) ; et marines : goberge (Guo *et al.* 2015), holothurie (Kim *et al.* 2018).

En résumé, les **hydrolysats protéiques** présentent de nombreux avantages tant au niveau **nutritionnel** (apport des acides aminés essentiels et azote, diminution de l'allergénicité), que **fonctionnel** (modifications organoleptiques et texturantes, amélioration d'hydratation et des propriétés de surface, libération de peptides bioactifs) permettant leur application dans divers secteurs tels que la **nutrition**, l'**alimentation**, la **nutrition-santé** ou la **sécurité alimentaire**. De plus, dans la plupart des cas, ils sont issus d'une **valorisation protéique** de co-produits, ce qui contribue à augmenter l'exploitation des matières premières et, par conséquent, **diminue les déchets** finaux générés pour la filière concernée.

Ces propriétés fonctionnelles dépendent des **peptides** composants l'hydrolysate, dont les **caractéristiques** sont directement liées à la **composition en acides aminés**, la **taille des peptides**, leur **proportion** et leur **concentration**. Les hydrolysats sont ainsi, notamment, définis en fonction de leur aminogramme, de leur hydrophobicité et de la répartition de taille des peptides. L'**hydrolyse enzymatique** permet de contrôler les populations de peptides produits grâce à la **spécificité des protéases** quant au(x) site(s) de coupure peptidique(s).

La **protéolyse enzymatique** est réalisée dans des **conditions définies** de pH et température, propre à chaque enzyme. Ces conditions influent également sur la protéine à hydrolyser en changeant sa **conformation**. L'ensemble forme alors un système d'hydrolyse dont le mécanisme réactionnel est régi par des **cinétiques complexes** (parallèles, compétitives) avec des **lois de vitesse** spécifiques. Pour **comprendre**, et par conséquent, **maîtriser** le mécanisme de **formation** d'hydrolysate protéique, des études ont découlé sur la mise en place de **modélisations enzymatiques**, dont les développements sont présentés dans le paragraphe suivant.

## I.2. La protéolyse enzymatique

### I.2.1. Les conditions opératoires de la protéolyse enzymatique

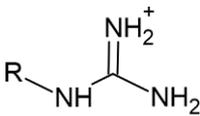
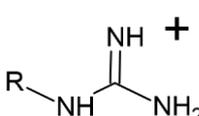
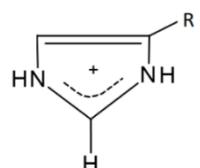
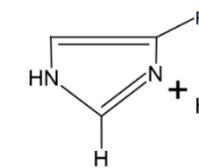
La propriété première des enzymes est leur spécificité de site catalytique, qui est complémentaire à la charge, au degré d'hydrophobie et à la forme de son substrat (Whitehurst & Oort 2010). Le système enzyme/protéine est un système de deux protéines, dont une, a une activité hydrolytique, et l'autre non. Ainsi, la nature des forces de maintien de la structure de ces deux entités est la même (interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, électrostatiques, de Wan der Walls, ponts disulfures). Leur état de conformation et d'activité dépend du milieu réactionnel ( $pH$ , température) et de leurs concentrations respectives. Ces paramètres influencent l'efficacité de l'hydrolyse selon plusieurs phénomènes structurels, chimiques et énergétiques.

#### I.2.1.1. Le $pH$

Le potentiel hydrogène, noté communément «  $pH$  », est une mesure de l'activité chimique de protons,  $H^+$ , en solution. Si l'activité en solution est grande (forte concentration en cations d'hydrogène), alors la solution est dite « acide », et si l'activité est faible, elle est dite « basique » ou « alcaline » (faible concentration en cations d'hydrogène). La définition pour les molécules présentes en solution est un peu différente : « un acide est une espèce qui a tendance à perdre un proton, et une base est une espèce qui a tendance à gagner un proton » (Leskovac 2003). Les AA ont ces capacités à perdre ou capter des protons, ce qui classifie certains comme basiques (Arg, Lys) et d'autre comme acides (Asn, Gln). Le milieu de solvation module ainsi l'état d'ionisation des groupements (charge positive ou négative) sur les chaînes latérales (carboxylate, thiol, amine, *etc.*), qui, à un certain  $pH$  seront chargés ou non. Ces états peuvent être déterminés avec la constante acide de dissociation, le  $Ka$ , ou plus usuellement avec son logarithme négatif, le  $pKa$ , qui est une valeur d'indication de la force d'un acide, la tendance de la molécule à se dissocier d'un proton. Cela permet de déterminer la forme qui prédomine à un certain  $pH$ , sachant que quand le  $pH$  atteint la valeur du  $pKa$ , les deux formes de la molécule, acide et base, seront dans des concentrations égales. Ainsi, un  $pH$  inférieur au  $pKa$  donnera une concentration de la forme acide supérieure à la forme basique, alors qu'un  $pH$  supérieur au  $pKa$  donnera une concentration de la forme basique supérieure à la forme acide. Au sein des protéines, certains groupements des AA donnent donc différents états d'ionisations, résumés dans le *Tableau 3*. Ces charges participent à la stabilité de la protéine par les liaisons électrostatiques (entre charges négatives et charge positives) et les liaisons hydrogènes (entre

les groupes fonctionnels et les charges partielles des groupes polaires voisins) (Pace *et al.* 2009). Cependant, si le *pH* du milieu change de telle manière que deux mêmes charges se retrouvent voisines, elles se repousseront, ce qui participe à la déstabilisation et au dépliement de la protéine (Eisenberg 1995).

Tableau 3 : Ionisations des groupes fonctionnel en fonction du milieu et la plage du *pKa* possible en fonction de la disposition du groupe fonctionnel dans la protéine. R : chaîne peptidique principale. Ar : cycle aromatique. Adapté de (Whitaker 1994; Leskovac 2003).

Groupe fonctionnel	Forme acide	Forme basique	<i>pKa</i> (dans la protéine)	AA contenant le groupe
<b>Ammonium</b>	$R - NH_3^+$	$R - NH_2$	7,5 – 10,6	N-terminal, Lys
<b>Carboxyle</b>	$R - COOH$	$R - COO^-$	3 – 5	C-terminal, Asp, Glu
<b>Phénol</b>	$R - Ar - OH$	$R - Ar - O^- + H^+$	9,8 – 10,5	Tyr
<b>Guanidinium</b>			11,6 – 12,6	Arg
<b>Thiol</b>	$-SH$	$-S^- + H^+$	8 – 8,5	Cys
<b>Imidazole</b>			5,5 – 7	His

Le *pH* permet donc de moduler la protéolyse en ionisant les groupements fonctionnels, qui eux influencent les interactions intramoléculaires de la protéine, pouvant la compacter ou la déplier, ce qui jouera par conséquent sur les propriétés fonctionnelles de l'hydrolysats final en facilitant au non l'accès aux sites de clivage à l'enzyme. Concernant cette dernière, c'est le même principe qui rend le site catalytique de l'enzyme actif, car il doit avoir un certain degré de protonation. En exemple, la **Figure 6** illustre le mécanisme du site catalytique des protéases aspartiques, qui ont deux Asp liés à une molécule d'eau et qui doivent avoir une charge négative nette pour fonctionner comme un nucléophile et attaquer le carbonyle de la liaison peptidique (Theron & Divol 2014).

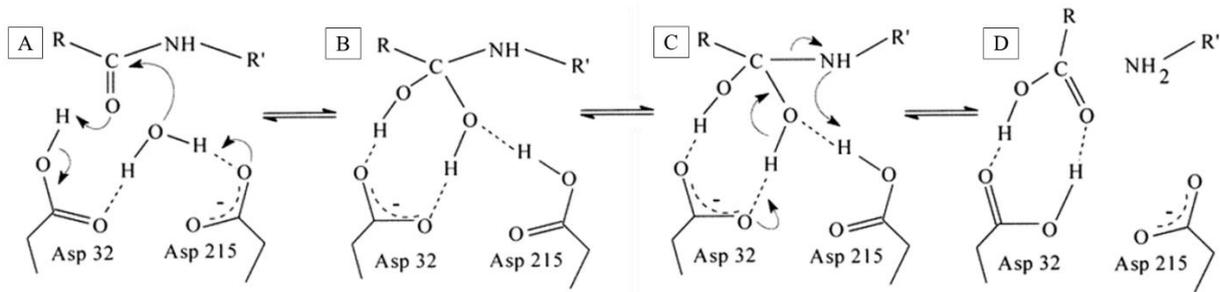


Figure 6 : Mécanisme catalytique proposé des protéases à acide aspartique (Theron & Divol 2014). R : chaîne du peptide 1. R' : chaîne du peptide 2. (A) Liaison à une molécule d'eau et attaque nucléophile sur le carbonyle de la liaison peptidique. (B) Formation d'un intermédiaire tétraèdre stabilisé par les liaisons hydrogènes (traits pointillés) à l'Asp<sub>32</sub> chargé négativement. (C) Le proton lié à l'atome d'oxygène attaquant est cédé à l'atome d'oxygène de l'Asp<sub>32</sub>, et inversion de configuration de l'azote de la liaison peptidique par la donation d'un hydrogène par l'Asp<sub>215</sub>. (D) Libération des peptides formés et l'Asp<sub>215</sub> est régénéré avec une charge négative pour un nouveau cycle.

Ainsi, la mesure de l'activité enzymatique en fonction du *pH* donne typiquement une courbe en cloche, où aux extrémités il n'y aura aucune activité, et le sommet représentera le « *pH optimum* » de l'enzyme, où elle donnera le plus de produits possibles pour un temps donné. Le criblage sur le *pH* peut conduire donc à des hydrolysats avec des populations peptidiques différentes (taille et ionisation), découlant sur une variation d'une propriété pour un même couple enzyme/protéine. Par exemple, en testant trois *pH* et quatre enzymes pour l'hydrolyse de l'isolat protéique de colza, afin d'améliorer les propriétés émulsifiantes, les résultats ont montré des différences de stabilités en fonction du *pH*, avec une haute stabilité au *pH* 7 avec la trypsine et une faible stabilité au *pH* 4 avec la pepsine (Alashi *et al.* 2018). Le *pH* influe aussi typiquement sur la solubilité des protéines, qui est la plus faible quand le *pH* est égal au point isoélectrique (*pI*) de la protéine (Adler-Nissen & Olsen 1979). Le *pI* est le *pH* auquel la protéine est électriquement neutre, c'est-à-dire qu'elle possède autant de charges positives que négatives. Cela contribue à une grande stabilité de la protéine par une augmentation des interactions intramoléculaires, ce qui diminue les interactions ioniques avec l'eau environnante, d'où une diminution de la solubilité (Kristinsson & Rasco 2000).

### 1.2.1.2. La température

La température est, en thermodynamique, la mesure de l'énergie moyenne de l'agitation des molécules dans un système (Giancoli 2014). Elle a ainsi de nombreux effets sur la protéolyse. D'abord sur la protéine, l'augmentation de la température du milieu agit comme un facteur dénaturant qui modifie la structure de la protéine de sa forme native (souvent compacte, globulaire) en forme dépliée (expansée). Plus précisément, la dénaturation a été définie comme « la désorganisation de la molécule de protéine native, en passant de l'arrangement régulier d'une structure rigide à l'arrangement irrégulier et diffus d'une chaîne peptidique ouverte et

flexible » (Eisenberg 1995). La raison de ce changement est liée à la notion d'enthalpie, l'énergie totale du système. La protéine sous forme native a une certaine quantité d'énergie qui la maintient stable. Pour déstabiliser ce système, il faut apporter une énergie plus élevée. C'est cet effet qu'apporte le transfert thermique. Plus la température est élevée, plus les molécules seront agitées et rompront les interactions intramoléculaires de la protéine. Ainsi, si les sites de clivage sont, au départ, renfermés profondément, ils seront exposés à la surface dans une protéine dénaturée, ce qui facilitera leur mise en contact avec le site catalytique de l'enzyme et augmentera la quantité de produits par unité de temps (Cheison *et al.* 2011).

Sur l'enzyme, l'effet de la température est le même, mais évidemment, on ne cherchera pas à la dénaturer, sinon il n'y aura plus de réaction enzymatique. Il lui faut tout de même une température à laquelle elle est stable et dans sa conformation active. Par conséquent, pour une réaction effective, il faut chercher un compromis entre la stabilité thermique de l'enzyme et sa désactivation thermique, c'est la notion de « température de réaction optimale » déterminée pour chaque enzyme (Punekar 2018).

Enfin, pour que la réaction ait lieu entre la protéase et la protéine, il faut que les deux entrent en contact. C'est la théorie de la collision, issue de la théorie cinétique des gaz qui présente justement la température comme la mesure de l'agitation des particules, et donc leur énergie cinétique (Giancoli 2014). Toutes les collisions, les rencontres, entre l'enzyme et la protéine ne sont pas effectives à une température donnée. Pour une collision effective, il faut que le site catalytique se heurte précisément au site de coupure, et si les molécules sont peu agitées, leur probabilité de rencontre dans la bonne conformation est faible. En augmentant la température, l'agitation des enzymes et protéines s'intensifie, ce qui augmente leur probabilité de rencontre et par extension, cela augmente la vitesse de réaction et la quantité de peptides produits (Cornish-Bowden *et al.* 2005; Cheison *et al.* 2011).

Néanmoins, une augmentation de température peut aussi conduire à des effets néfastes pour l'hydrolyse. Les températures de fonctionnement appliquées aux enzymes les plus utilisées (trypsine, pepsine, Flavourzyme®, *etc.*) sont généralement dans une gamme de 25°C à 50°C (Alashi *et al.* 2014b; Durand *et al.* 2021a). Certaines protéases peuvent fonctionner au-dessus de 70°C, comme la thermolysine et l'alcalase (Contreras *et al.* 2011; Beaubier *et al.* 2021a). Or, pour les températures au-dessus de 50°C, la solubilité des protéines peut diminuer par leur agrégation, due au contact des parties hydrophobes et de la réticulation entre des groupes fonctionnels des AA, dont la probabilité de rencontre est également régie par la théorie des

collisions (Tolkach & Kulozik 2007; Cheison *et al.* 2012). L'agrégation des protéines peut aussi augmenter la résistance à l'hydrolyse, voire diminuer la libération de peptides bioactifs (Elmalimadi *et al.* 2017), car la conformation de l'agrégat, structure non-native, n'est plus reconnue par le site catalytique de l'enzyme (Leeb *et al.* 2015).

### 1.2.1.3. Concentrations enzyme et substrat

#### 1.2.1.3.1. Loi d'action des masses

Une réaction enzymatique est un système de réaction chimique très particulier, mais il suit généralement le postulat fondamental des cinétiques chimiques : la loi d'action des masses, c'est-à-dire que la réaction est directement proportionnelle à la concentration des réactifs présents. Pour une réaction simple bimoléculaire, par exemple entre une molécule A et une molécule B (*Eq. 3*), la loi d'action des masses est représentée par l'*Eq. 4* (Korobov & Ochkov 2011a) :



$$r_{AB} = k \times [A]^1 \times [B]^1 \quad \text{Eq. 4}$$

La notation plus générale est présentée par l'*Eq. 5* :

$$r_x = -k \prod_x C_x^{n_x} \quad \text{Eq. 5}$$

Ainsi, la loi d'action des masses pour une réaction est notée  $r_x$ , le taux de réaction (appelé aussi « vitesse de réaction »). Le taux de réaction est la mesure de la rapidité avec laquelle la concentration des réactifs change au cours du temps. En l'occurrence, c'est la variation de la (des) concentration(s)  $C_x$  pour chaque substance  $x$  participante. L'exposant  $n_x$  est l'ordre de réaction « partiel » pour chaque substance. La valeur de l'ordre de réaction correspond, pour des réactions simples (une réaction identifiée sans ambiguïté, *Eq. 3*), au coefficient stœchiométrique pour chaque substance (*Eq. 4*). Les valeurs des ordres de réaction partiels servent à déterminer l'ordre de réaction « global » de la réaction, qui est la somme des  $n_x$ . Pour l'exemple de l'*Eq. 4*, l'ordre de réaction global vaut  $1 + 1 = 2$ . Pour des réactions complexes (plusieurs produits, plusieurs états intermédiaires ou étapes non identifiées), une stœchiométrie exacte est extrêmement difficile à déterminer. L'ordre de réaction devient alors un paramètre expérimental à ajuster, permettant de relier les concentrations à la vitesse de réaction et de déterminer le modèle réactionnel (Korobov & Ochkov 2011a; Puneekar 2018). La constante de vitesse  $k$ , est le principal paramètre cinétique qui exprime la proportionnalité entre le taux de

réaction et la concentration des réactifs. Cependant, il ne dépend pas des concentrations des réactifs, mais de la température, dans la plupart des cas. Ce paramètre est en lien avec la théorie des collisions, et plus spécifiquement, c'est l'interprétation du nombre des collisions efficaces qui amènent à une réaction entre l'enzyme et son substrat. Cette relation est décrite par la loi empirique d'Arrhénius (Cornish-Bowden *et al.* 2005) :

$$k = K_{pe} \times FS \times e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \text{Eq. 6}$$

Avec  $K_{pe}$ , une constante pré-exponentielle qui regroupe les notions de la « fréquence des collisions » et le « facteur stérique » (contact entre le site catalytique et le site de clivage dans la bonne conformation),  $E_a$  l'énergie d'activation de la réaction,  $\mathcal{R}$  la constante des gaz parfaits et  $T$  la température. Cette relation étant empirique, la détermination des termes  $K_{pe}$  et  $E_a$  est réalisée en traçant un graphe  $\log(k) = f\left(\frac{1}{T}\right)$ . Cela donne une droite avec la pente qui vaut  $-\frac{E_a}{2,203\mathcal{R}}$  et l'ordonnée qui vaut  $K_{pe}$ .

Toutes les réactions enzymatiques ne suivent pas cette loi, mais cette méthode reste utilisable pour des systèmes complexes dont il est plus simple d'obtenir des informations empiriques, comme pour une protéolyse avec plusieurs produits et les REM pour mesurer une activation ou désactivation enzymatique (Adu-Amankwa *et al.* 1981; Sannier *et al.* 1994; Paolucci-Jeanjean *et al.* 2001; Hedhili *et al.* 2015).

### 1.2.1.3.2. Conséquence sur le mécanisme enzymatique

Une réaction enzymatique quelconque est représentée généralement par l'Eq. 7 suivante (Cornish-Bowden *et al.* 2005):



Avec  $E$  l'enzyme,  $S$  le substrat,  $ES$  le complexe d'association entre l'enzyme et le substrat, qui se dissocie en donnant l'enzyme  $E$  intacte et le produit  $P$ . Le complexe  $ES$  est donc un intermédiaire, qui est formé avec une vitesse  $k_1$ , puis  $ES$  se dissocie en  $E$  et  $P$  avec une autre vitesse  $k_2$ . Cependant, comme de nombreuses réactions sont réversibles, la possibilité de la réaction inverse est admise à partir de l'intermédiaire  $ES$  à l'enzyme et substrat  $E + S$  initiaux avec la vitesse  $k_{-1}$ . De l'autre côté, il est aussi possible d'observer des réactions inverses à partir de  $E + P$  vers l'intermédiaire  $ES$ , mais pour des raisons de simplification de

démonstration, et les hydrolyses peptidiques n'en faisant pas partie, ce cas n'est pas représenté (Brown & Biellmann 1992).

Une réaction enzymatique est faite donc en plusieurs étapes, qui ont des vitesses de réaction différentes, ce qui résulte en contraintes cinétiques et mécanistiques, qui diffèrent d'une réaction chimique classique. La concentration du substrat augmente le taux de réaction, mais de manière finie jusqu'à une vitesse maximale,  $V_{max}$ . En effet, durant le moment où l'enzyme est liée au substrat, elle est indisponible et donc toutes les autres molécules de substrat ne réagiront pas. Ainsi, quand la concentration en substrat est très supérieure à la concentration en enzyme, ce sont des conditions dites « saturantes », car l'enzyme n'est quasiment plus sous forme libre puisqu'elle se lie très rapidement à un nouveau substrat disponible. Le taux de réaction devient indépendant de la quantité en substrat, mais proportionnel à la quantité en enzyme, car la réaction se fera au rythme de la disponibilité de l'enzyme libre. Dans ce cas-là, comme la variation de la concentration du substrat est négligeable et la concentration de l'enzyme est constante, la réaction est dite « d'ordre zéro », et la formation du produit est linéaire (par la constante proportionnelle de vitesse  $k$ ) en fonction du temps (Whitehurst & Oort 2010).

Cette condition particulière de réaction enzymatique peut être recherchée pour une caractérisation poussée de l'enzyme, mais qui n'est pas nécessaire pour la production d'hydrolysats fonctionnels, surtout qu'une protéine a énormément de sites de clivage sur elle. Cette condition sert tout de même à comprendre que la disponibilité de l'enzyme est un facteur important qui influence le nombre de liaisons clivées efficacement (la vitesse de réaction), ce qui module la vitesse de « libération » des différents peptides, et leur proportion relative des uns par rapport aux autres, en fonction de l'avancement de l'hydrolyse (Su *et al.* 2007). Les protéines ayant beaucoup de sites de clivages, même pour une protéase qui n'en a que deux dans son sélectome, il faudra un certain temps pour que toutes les liaisons soient clivées ou bien la concentration en enzyme doit être élevée (Guo *et al.* 2009). A l'inverse, si la coupure de toutes les liaisons n'est pas visée (hydrolyse limitée), la durée de l'hydrolyse peut être écourtée sciemment ou bien la quantité de l'enzyme doit être très faible par rapport au substrat (Adler-Nissen 1984). Ce rapport entre l'enzyme et le substrat est communément modulé par le paramètre du ratio  $E/S$ , la quantité de l'enzyme par rapport à la quantité du substrat. Plus la quantité du substrat est grande par rapport à l'enzyme, plus la valeur du ratio est petite (Contreras *et al.* 2011). Cette modulation permet par conséquent d'influencer les propriétés

fonctionnelles de l'hydrolysats avec, par exemple, une augmentation de  $\pm 10\%$  d'activité antiradicalaire (Elmalimadi *et al.* 2017).

A l'effet du ratio  $E/S$ , la concentration initiale en substrat est aussi à prendre en compte, étant donné que les protéines ont tendance à s'agréger, voire se gélifier, ce qui diminue la solubilité et l'accès aux sites de clivage (Butré *et al.* 2012). A cela, des effets d'inhibition peuvent s'ajouter par les produits (Deng *et al.* 2018). Une agitation du mélange réactionnel inadapté à la masse introduite diminue aussi l'efficacité de la réaction (Elmalimadi *et al.* 2017).

### I.2.1.3.3. Mécanismes spécifiques des protéases

Tous ces phénomènes physico-chimiques des protéines (ionisation, dénaturation) influencés par les conditions opératoires ( $pH$ ,  $T$ ,  $E/S$ , concentration initiale), le fonctionnement de l'enzyme (complémentarité des formes, complexe intermédiaire) et la multitude de peptides produits dont les quantités varient au cours de l'avancement de la réaction, font de la protéolyse un système très laborieux à étudier dans son ensemble. Néanmoins, Linderstrom-Lang (1953) a développé très tôt un modèle permettant de décrire quantitativement la protéolyse par rapport à l'état de la protéine, à l'activité enzymatique et leur influence sur les populations peptidiques observés.

Pour cela, une étape est ajoutée, qui prend en compte la vitesse de la dénaturation de la protéine – facteur facilitant l'accès aux sites de coupures enfouis – et elle est comparée à l'étape de l'hydrolyse enzymatique. Le modèle se distingue alors en deux types de mécanismes extrêmes : le *one-by-one* (pour « un par un ») et le *zipper* (pour « fermeture éclair ») (Linderstrom-Lang 1953). La **Figure 7 A** représente le schéma du mécanisme *one-by-one* et indique que si la vitesse de dénaturation protéique ( $k_1$ ) est infiniment plus lente que celle de l'hydrolyse enzymatique ( $k_2$ ), chaque molécule de protéine, tour à tour, sera dégradée progressivement et entièrement, car dès qu'un site de coupure est découvert, il sera hydrolysé. Tout au long de la réaction, l'hydrolysats se composera que protéines résiduelles intactes et de « peptides finaux ». Un peptide final est un peptide qui n'a pas de site de clivage et qui restera inchangé pour le reste de l'avancement de la réaction. La **Figure 7 B** représente le schéma du mécanisme *zipper* et indique qu'à l'inverse, si la protéine est dénaturée de manière infiniment plus rapide ( $k_1$ ) comparée à l'activité de l'enzyme ( $k_2$ ), les liaisons peptidiques seront exposées toutes en même temps, et seront clivées « aléatoirement » dans chacune des protéines. Par conséquent, des « peptides intermédiaires », peptides possédant encore des sites

de clivages, seront libérés en même temps que des peptides finaux. Cet hydrolysats pourrait alors avoir des protéines résiduelles, des peptides intermédiaires et des peptides finaux.

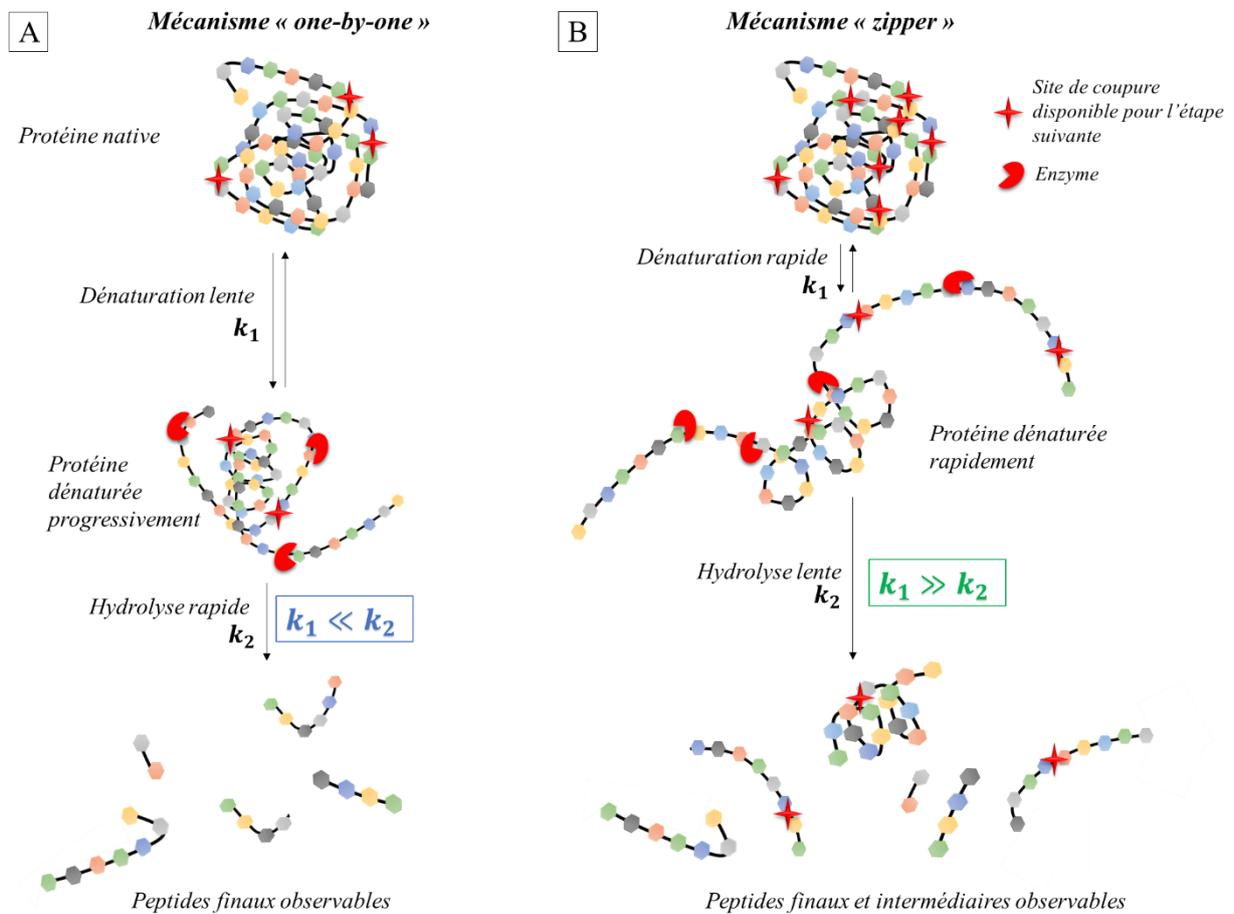


Figure 7 : Schématisation des mécanismes théoriques rencontrés en protéolyse : (A) one-by-one et (B) zipper. Adapté de (Adler-Nissen 1976).

Ces deux mécanismes impliquent que si on suit la concentration de chaque peptide au cours de l'avancement de la réaction, il y aura des différences cinétiques significatives (Fernández & Riera 2013). La **Figure 8 A** présente, en exemple, la cinétique de quatre peptides, A, B, C et D issus d'un mécanisme *one-by-one*. Tous ces peptides sont finaux et sont issus directement de la protéine, mais à des vitesses différentes ( $k_A > k_B > k_D > k_C$ ). La **Figure 8 B** présente quatre peptides hypothétiques issus d'un mécanisme *zipper*. Les peptides A et C sont donc des peptides intermédiaires, qui ont été libérés de la protéine initiale, à deux vitesses différentes d'apparition ( $k_C^a > k_A^a$ ), ce qui augmente leur concentration au début de la réaction, puis plus tard, ils sont scindés à leur tour, avec des vitesses de disparition ( $k_C^d$  et  $k_A^d$ ), ce qui diminue leur concentration à la fin de la réaction. Le peptide D est issu directement de la protéine avec une vitesse d'apparition  $k_D^a$  et est un peptide final. Le peptide B a une certaine « phase de latence » (pas d'augmentation de la concentration franche à partir du temps 0) qui peut s'expliquer par le fait

que ce peptide est issu d'un (ou des) peptide(s) intermédiaire(s) uniquement. En l'occurrence, s'il est issu de  $A$  et  $C$ , il y aura deux vitesses d'apparition qui seront  $k_C^d$  et  $k_A^d$ .

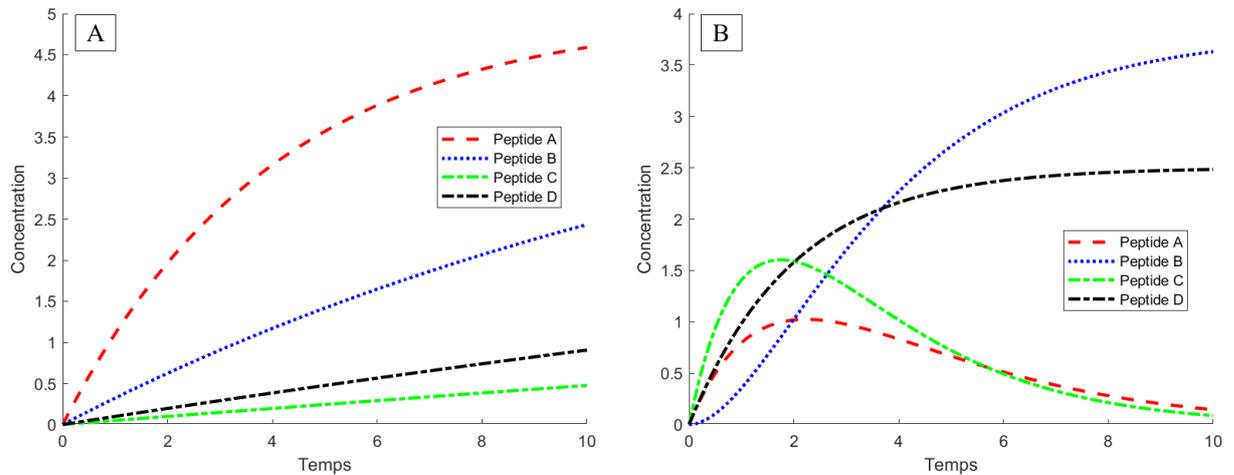


Figure 8 : Exemple de cinétique d'évolution des concentrations des peptides lors d'un mécanisme (A) one-by-one et (B) zipper. Valeurs arbitraires.

Toutes les réactions protéolytiques (par des endopeptidases) peuvent être considérées comme des intermédiaires entre ces deux mécanismes extrêmes, même si un « pur » *one-by-one* peut être observé (Beaubier *et al.* 2019a). La tendance vers l'un ou l'autre des mécanismes peut dépendre du couple enzyme/protéine (Ortiz & An 2000), mais cela peut aussi être régulé par la température et le ratio  $E/S$ , qui sont en soi les deux facteurs qui influencent la vitesse de réaction. En effet, une élévation de la température augmente le nombre de collisions (*cf.* §1.2.1.2 p.31 **EB**), ce qui résulte en une tendance du mécanisme *one-by-one* (Linderstrom-Lang 1953). De la même manière, en augmentant la quantité de l'enzyme par rapport à la protéine ( $E/S$  élevé), un grand nombre d'enzymes libres se retrouvent en concurrence pour hydrolyser les sites de clivage, tendant vers un mécanisme *one-by-one*, alors qu'une faible disponibilité d'enzymes libres ( $E/S$  faible) amènera à des omissions des sites de coupure, tendant vers un mécanisme *zipper* (Vorob'ev *et al.* 1986; Deng *et al.* 2018).

#### 1.2.1.3.4. Influence sur les propriétés fonctionnelles

Les propriétés des hydrolysats sont dépendantes de leurs compositions et propriétés physico-chimiques (répartitions de tailles, charges, hydrophobie, *etc.*). Ces propriétés sont influencées par l'avancement de la réaction, la spécificité de coupure de la protéase et le mécanisme suivi, qui peuvent être contrôlés par les conditions opératoires appliquées au procédé. A un faible avancement de la réaction, le mécanisme *zipper* va permettre de générer de longs peptides intermédiaires, tandis qu'il sera possible d'obtenir des mélanges de petits peptides et de protéines intactes avec le mécanisme *one-by-one*.

Ainsi, il a été montré que les propriétés émulsifiantes/moussantes étaient préférentiellement améliorées avec la libération de peptides longs amphiphiles ( $10-18 \text{ kg.mol}^{-1}$ ), qui de plus étaient très stables (Liu *et al.* 2019; Ding *et al.* 2021). En revanche, plus les peptides sont courts (plus l'hydrolyse est avancée), plus les émulsions sont instables, mais cela peut augmenter des activités antioxydantes, avec des peptides de faibles poids moléculaires entre 1 et  $10 \text{ kg.mol}^{-1}$  (Kumar *et al.* 2016). Dans l'exemple des peptides antimicrobiens, un grand nombre a été produit suite au mécanisme *semi-zipper* avec des tailles peptidiques entre  $5 \text{ kg.mol}^{-1}$  et moins de  $1 \text{ kg.mol}^{-1}$  (Adje *et al.* 2013).

Par conséquent, en identifiant le mécanisme responsable de la propriété de l'hydrolysats cible, il est possible de reproduire la fonctionnalité à l'identique, ce qui est recherché en production pérenne d'ingrédients fonctionnels (López-Morales *et al.* 2019).

### I.2.2. Mise en œuvre de la protéolyse en réacteurs

En pratique, le procédé d'hydrolyse enzymatique des protéines est mis en œuvre de manière discontinue, en réacteur *batch* (pour « lot » en anglais), illustré par la *Figure 9*. Il s'agit du mode de fonctionnement le plus facile à mettre en place et à contrôler, car le nombre de variables est ainsi limité. En effet, toutes les conditions opératoires sont définies (*pH*, *T*, concentration substrat et rapport *E/S* (Adler-Nissen 1984)) en fonction de l'enzyme et de la protéine mises en jeu. Au cours de la réaction, le *pH* initial du milieu sera modifié par la libération des fonctions amines et acides carboxyliques. Le *pH* étant un paramètre opératoire impactant l'activité des enzymes (*cf.* §I.2.1.1 p.29 *EB*), il convient de le maintenir constant notamment par titration, au même niveau que le maintien de la température.

Le plus pratique est l'utilisation d'un outil de *pH-stat*, qui ajoute une base ou un acide en fonction des formes ionisées prédominantes, comme illustré par la *Figure 10*. Au *pH* acide, la fonction amine de la liaison peptique coupée est ionisée ( $pK_a = 8$ ), donc elle capte un proton, ce qui diminue le *pH* du milieu. Pour le remplacer, un proton est ajouté au moyen du *HCl*, qui se dissocie en milieu aqueux en  $H^+$  et  $Cl^-$ . Au *pH* basique, c'est la fonction carboxylique qui est ionisée ( $pK_a = 3,7$ ), et pour cela un proton est libéré, ce qui augmente le *pH* du milieu. Pour le neutraliser, la soude peut être ajoutée, qui se dissocie en  $Na^+$  et  $HO^-$ , et ce dernier anion hydroxyle réagit avec le proton pour former une molécule d'eau (Adler-Nissen *et al.* 1983; Pace *et al.* 2009; Mat *et al.* 2018).

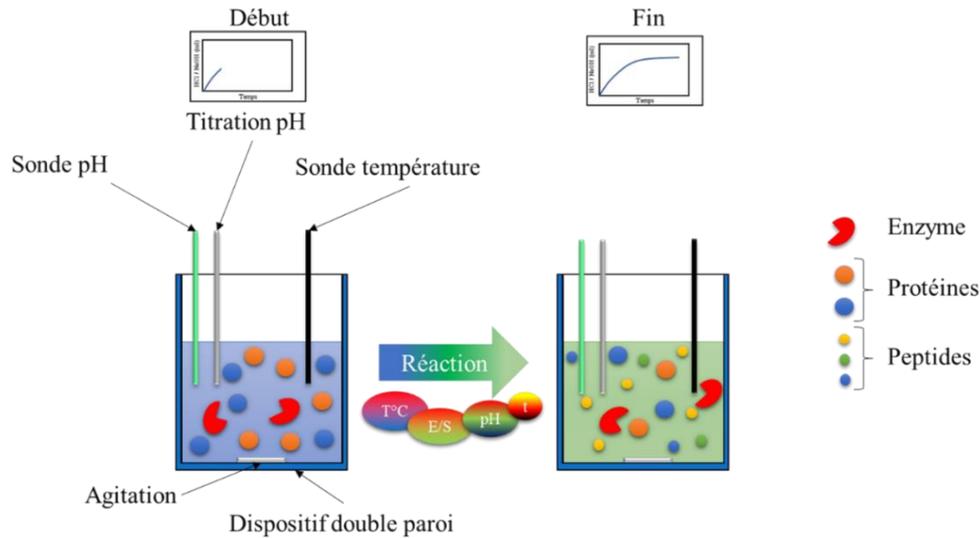


Figure 9 : Illustration d'une protéolyse enzymatique en batch. Dans cet exemple, le mélange est assuré par la rotation d'un barreau aimanté, le maintien de la température par un réacteur avec une double paroi contenant l'eau continuellement chauffée et le suivi de la réaction ainsi que le maintien du pH constant est réalisé par l'ajout de HCl ou NaOH.

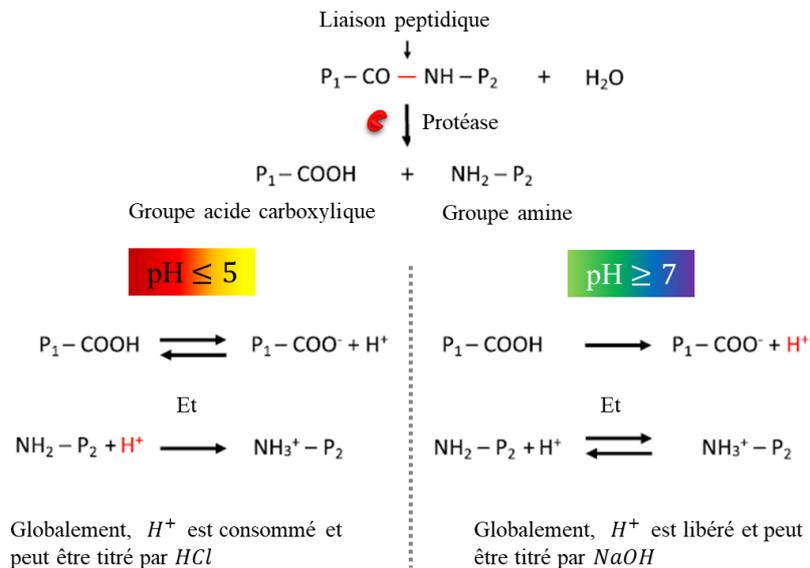


Figure 10 : Représentation schématique de la protéolyse enzymatique et le principe de la titration par le pH-stat aux pH acides et basiques.  $P_1$  et  $P_2$ : résidus peptidiques des deux côtés de la coupure. (Mat et al. 2018).

Toutefois, les performances catalytiques en réacteurs *batch* peuvent être limitées en productivité et efficacité à cause :

- des inhibitions de l'enzyme par les produits (ou autres substances), limitant l'hydrolyse totale des protéines (Vioque *et al.* 2001).
- du coût d'enzyme élevé (jusqu'à plus de 1000 €/kg pour des enzymes purifiées) au regard du prix du marché pour des ingrédients protéiques (20 – 70 €/kg).

L'arrêt de la réaction enzymatique, également nécessaire en réacteur *batch*, peut se faire soit par dénaturant thermique de l'enzyme soit par changement de *pH*. Des post-traitements

supplémentaires sont alors nécessaires à chaque production (chromatographie d'échanges d'ions, filtration, centrifugation) (Pasupuleti & Demain 2010) et ils entraînent des surcoûts importants du produit final : jusqu'à plus de 100 €/kg voire autour de 2000 €/kg pour des biopeptides (Greenweez.com 2022; iHerb.com 2022; SuperSmart.eu 2022).

Au final, pour obtenir un « hydrolysats cible » avec la (les) fonctionnalité(s) voulue(s) et reproductible(s), un certain nombre de paramètres doivent être pris en compte et contrôlés. Ces propriétés technico-fonctionnelles (solubilité, viscosité, émulsion, pouvoir antioxydant, *etc.*) étant dépendantes des caractéristiques de l'hydrolysats, comme le taux de conversion protéique, le degré d'hydrolyse, la répartition de masse molaire ou la libération de groupes fonctionnels. Ce sont ces derniers paramètres qui peuvent être suivis au cours de l'hydrolyse (Chabanon *et al.* 2007; Valencia *et al.* 2014; Deng *et al.* 2018).

### 1.2.3. Les cinétiques de protéolyse enzymatique, modélisation et optimisation

Dans tout procédé, des conditions optimales sont recherchées pour le critère ciblé, afin d'avoir le moins de dépenses énergétiques et matérielles possibles, pour un résultat au plus proche de l'objectif. Cependant, le criblage sur les valeurs des conditions opérationnelles est discrétisé, cela insinue alors qu'un *optimum* peut être entre deux valeurs expérimentées (Ruan *et al.* 2010). Pour un critère d'optimalité basé sur la quantité de peptides totaux produits, par exemple, la valeur optimale peut alors être inconnue si le prélèvement n'a pas été fait à ce moment-là et les conditions optimales ne pourront pas être définies précisément. Ainsi, pour ne pas multiplier les prélèvements, mais quand même avoir accès à des valeurs continues, des modélisations sont communément réalisés, qui relient les conditions opératoires au critère ciblé (Guo *et al.* 2009). L'optimisation est basée ensuite sur ces modélisations, ce qui permet de déterminer tous les paramètres nécessaires à la réaction, et, *in fine* de conceptualiser et mettre en œuvre le procédé industriellement (Márquez & Vázquez 1999; Beaubier *et al.* 2021a).

#### 1.2.3.1. Modèles mécanistiques : la référence, Michaelis-Menten

Quand les caractéristiques sont maîtrisées, c'est une garantie d'un produit conforme aux qualités et quantités attendues. Cette maîtrise est réalisable en orientant les paramètres qui influencent la transformation de la matière première. Pour ce faire, il est primordial de connaître l'évolution temporelle et le chemin de transformation que subit la matière première jusqu'au produit fini. C'est ce qui permet de faire la modélisation.

La modélisation est l'élaboration d'un modèle, un système d'équations mathématiques, qui représente le plus fidèlement possible tous les phénomènes impliqués dans l'observation

expérimentale du système étudié, ce qui permettrait de prévoir l'évolution de ce système (Cornish-Bowden *et al.* 2005). Il existe trois méthodologies de modélisation principales : la modélisation mécanistique, la modélisation empirique et la modélisation hybride. Les modélisations mécanistiques sont les plus appliquées en enzymologie et sont élaborées à partir de leur cinétique réactionnelle. La cinétique enzymatique est l'étude de variation de concentration du substrat et/ou des produits au cours du temps. Elle permet de déterminer la vitesse de la réaction, les étapes réactionnelles, les paramètres cinétiques (*cf.* §I.2.1.3.1 p.33 *EB*), et finalement, de modéliser l'activité enzymatique.

Lorsque le modèle prend en compte uniquement l'aspect cinétique d'une réaction, dans des conditions opératoires définies invariables, c'est un « modèle cinétique » et est le plus simple à appliquer quand il y n'a qu'un seul produit et avec des simplifications (*Eq. 7* p.34). C'est sur cette base qu'ont été développées la majorité des cinétiques enzymatiques, en reprenant les hypothèses du modèle de Michaelis-Menten (M-M). Pour cela, d'abord, la loi d'action de masse est appliquée et la réaction est réécrite sous forme d'équations différentielles ordinaires suivantes, pour chaque composant :

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + k_2[ES] + k_{-1}[ES] \quad \text{Eq. 8}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_2 + k_{-1})[ES] \quad \text{Eq. 9}$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad \text{Eq. 10}$$

$$r_g = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad \text{Eq. 11}$$

La libération du produit étant l'étape limitante,  $k_2$  est la vitesse maximale déterminant le taux de la réaction globale  $r_g$  (elle est aussi appelée la constante catalytique, noté  $k_{cat}$ ) (Cornish-Bowden *et al.* 2005). Or, si le taux de réaction est déterminé par l'*Eq. 11*, la concentration du complexe  $[ES]$  est généralement inconnue, ou très difficile à obtenir. Pour cela, trois contournements sont nécessaires :

- 1) La réécriture de  $[ES]$  en fonction de  $[E]_0$ , la concentration en enzyme initiale et  $[E]$ , la concentration en enzyme libre à un instant  $t$  de la réaction (*Eq. 12*).
- 2) Le principe d'état stationnaire, considérant que la formation de l'intermédiaire  $[ES]$  est proche de sa vitesse de décomposition, donc que la variation de sa concentration est nulle (*Eq. 13*).

- 3) L'hypothèse que la concentration de l'enzyme initiale  $[E]_0$  est nettement inférieure à celle du substrat initial  $[S]_0$ , et dans ce cas la concentration du substrat à tout moment  $t$  est égale à sa concentration initiale (Eq. 14).

$$[ES] = [E]_0 - [E] \quad \text{Eq. 12}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad \text{Eq. 13}$$

$$\text{Si } [S]_0 \gg [E]_0 \text{ alors } [S] \cong [S]_0 \quad \text{Eq. 14}$$

Ainsi, en implémentant les Eq. 12, Eq. 13 et Eq. 14 dans l'Eq. 11, le taux de réaction devient :

$$r_g = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad \text{Eq. 15}$$

Cette équation peut être encore simplifiée, car d'une part, il n'est pas nécessaire de connaître la valeur de toutes les constantes  $k$  individuellement, mais une constante apparente  $K_m$  suffit à définir la cinétique de la réaction. D'autre part, la véritable quantité de l'enzyme  $[E]_0$  peut aussi être inconnue, surtout pour des extraits enzymatiques. Cette difficulté est aussi contournée en combinant  $k_2$  et  $[E]_0$  en un paramètre  $V_{max}$ , qui est la vitesse limite, dépendante de l'enzyme (Cornish-Bowden *et al.* 2005). Ainsi, l'équation finale s'écrit sous la forme finale suivante :

$$r_g = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq. 16}$$

Cette équation est très pratique et permet de définir les paramètres cinétiques  $V_{max}$  et  $K_m$  avec quelques expériences additionnelles de mesure de vitesse initiale ou directement par ajustement à la courbe cinétique (Duggleby & Wood 1989; Bisswanger 2014). De plus, elle peut être complétée par les phénomènes d'inhibition par le produit (Brown & Biellmann 1992; Abu-Reesh 2000). Ainsi, elle a été appliquée à des hydrolysats protéiques, mais en considérant que le produit  $P$  est la somme de tous les peptides libérés, quelle que soit leur taille ou le mécanisme d'apparition (Adu-Amankwa *et al.* 1981; Azhari & Lotan 1991; Andre 2015). En fonction du critère que l'on étudie, cette démarche peut être suffisante, comme la solubilité, les peptides totaux, le degré d'hydrolyse ( $DH$ ) ou la conversion protéique ( $Xp$ ) (Chabanon *et al.* 2007; Zapata-Montoya *et al.* 2018; Mai & Nhan 2020)).

### I.2.3.1.1. Le degré d'hydrolyse

Le « degré d'hydrolyse » ( $DH$ ) est le pourcentage de liaisons coupées sur la totalité de liaisons présentes (Adler-Nissen 1976). C'est le critère communément utilisé pour le suivi cinétique de l'hydrolyse et ainsi peut être un objectif à cibler pour obtenir une certaine répartition de tailles peptidiques et par conséquent certaines propriétés physico-chimiques ou activités : solubilité (Adler-Nissen *et al.* 1983), activité antimicrobienne (Adje *et al.* 2013) ou activité antioxydante (Elmalimadi *et al.* 2017) par exemple. Il peut être quantifié par diverses méthodes comme le *pH-stat*, l'osmométrie (lien entre le nombre de liaisons peptidiques et l'osmolarité de la solution) ou encore la spectrophotométrie (réaction entre des terminaisons ionisées et des chromophores) (Rutherford 2010). Une méthode originale récemment publiée propose sa quantification par CLHP-ES (Beaubier *et al.* 2019a).

### I.2.3.1.2. Le taux de conversion protéique

Le « taux de conversion protéique », la « conversion protéique » ou simplement la « conversion » ( $Xp$ ), est le pourcentage de protéines hydrolysées à un instant  $t$ . C'est l'un des critères pratiques de mesure de l'efficacité de l'hydrolyse dans différentes mises en oeuvre (Mannheim & Cheryan 1990). Il peut être mesuré en comparant la quantité d'azote soluble par rapport à la quantité d'azote total (Kjeldahl), où la concentration en azote soluble sera élevée à la fin de l'hydrolyse (Mullally *et al.* 1994), ou bien par CLHP avec le chromatogramme de l'hydrolysats, où le signal de la protéine sera faible à la fin de l'hydrolyse (Beaubier *et al.* 2019a).

### I.2.3.2. Limites du modèle M-M, retour aux cinétiques formelles

Même si le modèle de M-M peut être appliqué à la majorité des mécanismes enzymatiques étudiés, on se rend compte que ces conditions peuvent être très contraignantes et inadaptées à une analyse cinétique généralisée. En effet, il faut avoir des conditions particulières et contrôlées pour appliquer les *Eq. 12*, *Eq. 13* et *Eq. 14*, car il s'agit du cas particulier où la réaction est d'ordre zéro (cf. §I.2.1.3.2 p.34 *EB*), alors que cette condition n'est généralement pas respectée tout au long de l'hydrolyse (Bisswanger 2011; Choi *et al.* 2017). En effet, la formation de produits suit une cinétique de forme concave divisée en trois phases (Bisswanger 2011):

- 1) Un début d'activité pré-stationnaire non-linéaire, trop court pour être mesurée (quelques microsecondes) (*Figure 11 B* ①).
- 2) Une deuxième phase où l'activité est stationnaire et a donc une progression linéaire, car le substrat est en grande quantité (ordre zéro) (*Figure 11 A* ②).

3) L'activité ralentie, puis, atteint un plateau (premier ordre ou supérieur), le substrat a été consommé et la réaction est terminée (*Figure 11 A* ③).

De plus, une approche basée sur les peptides totaux serait injustifiée étant donné la complexité du système, car ce modèle ne prend en compte ni la diversité de composants de réaction (autant produits que substrats), ni la diversité de types de réactions simultanées, ni la diversité du réseau réactionnel (production, déplétion, inhibition, inactivation), ni les vitesses de réaction respectives (Qi & He 2006; Pinto *et al.* 2007). Certaines études sont alors reparties des lois chimiques générales, en considérant que l'*Eq. 11* suit une cinétique de premier ordre, pseudo-premier ordre (lorsque l'un des réactifs est en très large excès, comme l'eau en milieu aqueux), ou second ordre, puisque l'évolution de la concentration du produit en fonction du temps ressemble à ces courbes, comme le montre la *Figure 11 A*. De plus, il est assez simple de passer d'un taux de réaction (qui est une équation différentielle) à une solution analytique au temps  $t$  de la réaction, qui est une équation simple à ajuster aux données expérimentales, comme le résume le *Tableau 4*. Les études utilisant cette approche avec différents degrés d'adaptation sont résumées dans le *Tableau 5* p.47.

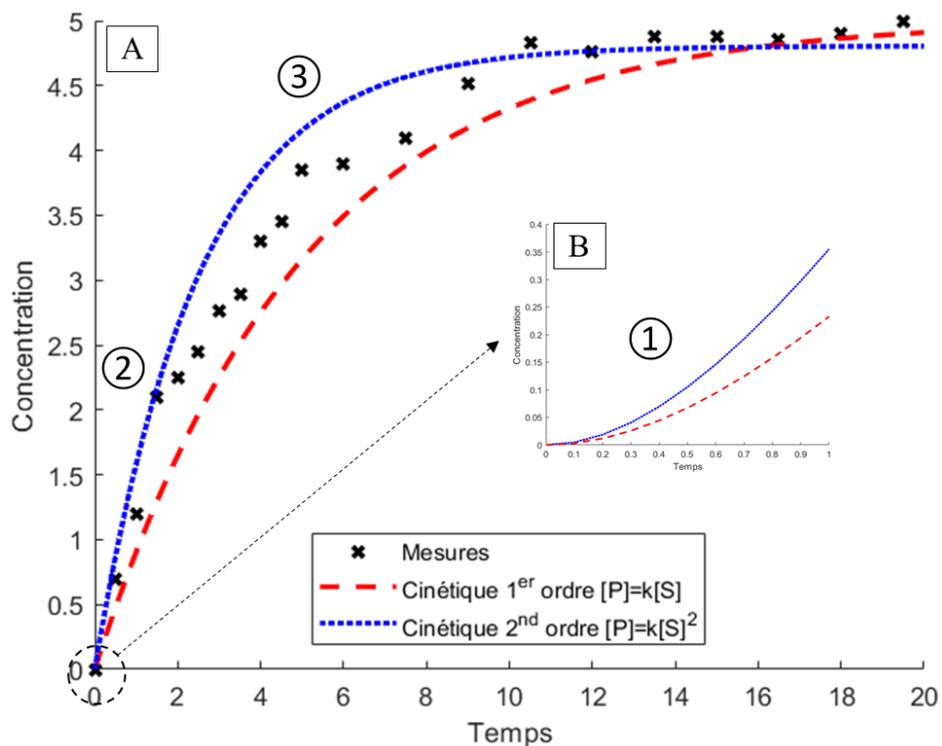


Figure 11 : Première lecture : (A) Evolution de concentration d'un (des) produit(s) issu(s) d'une réaction enzymatique hypothétique (croix noires), comparée aux réactions d'ordre 1 (tirets rouges) et 2 (petits tirets bleus) avec  $[S]_0 = 5$  et  $k = 0.2$ . Deuxième lecture : (B) ① Début de formation des produits, activité pré-stationnaire, non-linéaire. (A) ② Activité stationnaire. ③ Ralentissement de l'activité et atteinte d'un plateau, concentration totale du produit formé. Adapté de (Cornish-Bowden *et al.* 2005; Bisswanger 2011)

Tableau 4 : Réactions d'ordres 1 à n avec leur taux de réaction et leurs solutions analytiques des concentrations correspondantes des réactifs et du produit (Cornish-Bowden et al. 2005; Korobov & Ochkov 2011a; Seoud et al. 2016).

Ordre	Réaction	Taux de réaction	Solution Analytique
1 <sup>er</sup> ordre	$A \xrightarrow{k} P$	$r_A = -k[A]$	$[A]_t = [A]_0 e^{-kt}$
		$r_P = k[A]$	$[P]_t = [A]_0 (1 - e^{-kt})$
Pseudo-1 <sup>er</sup> ordre	$A + B \xrightarrow{k} P$ <i>B en excès</i>	$r_A = -k[A][B]$	$[A]_t = [A]_0 e^{-kt[B]_0}$
		$r_P = k[A][B]$	$[P]_t = [A]_0 (1 - e^{-kt[B]_0})$
2 <sup>nd</sup> ordre	$A + A \xrightarrow{k} P$	$r_A = -k[A]^2$	$[A]_t = \frac{[A]_0}{1 + kt[A]_0}$
		$r_P = k[A]^2$	$[P]_t = [A]_0 - \frac{[A]_0}{1 + kt[A]_0}$
Ordre n	$A_1 + \dots + A_n \xrightarrow{k} P$ $n \times A \xrightarrow{k} P$	$r_A = -k[A]^n$	$[A]_t = \frac{[A]_0}{\sqrt[n-1]{1 + (n-1)kt[A]_0^{(n-1)}}}$
		$r_P = k[A]^n$	$[P]_t = \frac{1}{\sqrt[n-1]{[A]_0^{(1-n)}}} - \frac{1}{\sqrt[n-1]{[A]_0^{(1-n)} + (n-1)kt}}$

Ainsi, ces équations ont été reprises pour être adaptées à la protéolyse, en modélisant les cinétiques des critères globaux ( $DH$ ,  $Xp$ ), mais surtout les cinétiques des concentrations de différentes fractions peptidiques identifiées, comme le montre le *Tableau 5*. Ces dernières méthodes (Butré *et al.* 2014; Trusek-Holownia & Noworyta 2015; Deng 2018) se rapprochent le plus de ce que l'on pourrait attendre d'une modélisation de la protéolyse, car elles discrétisent les différents peptides en prenant en compte leurs différentes cinétiques d'apparition. Cependant, ces cinétiques peuvent correspondre uniquement aux peptides issus du mécanisme *one-by-one*, et pas du tout pour un mécanisme *zipper*. Il manque donc encore une partie essentielle à la méthodologie de modélisation de la protéolyse.

Tableau 5 : Exemples non-exhaustifs de méthodes de régression non-linéaires pour ajuster les paramètres cinétiques aux critères ciblés. Paramètres ajustables :  $a$  et  $b$ . Réactivité des liaisons :  $y_x$ . Constantes de vitesse réactionnelles :  $K_x$  et  $k_x$ .

Critère modélisé	Modèle	Référence
Substrat – Premier ordre	$\ln\left(\frac{dS}{dt}\right) = \ln(-kS_0) - kt$	(Archer <i>et al.</i> 1973)
DH - Premier ordre	$\frac{dDH}{dt} = a \cdot e^{-b \cdot DH}$	(Márquez & Vázquez 1999) (Martínez-Araiza <i>et al.</i> 2012) (Zapata-Montoya <i>et al.</i> 2018)
DH - Premier ordre	$DH = \frac{1}{b} \cdot \ln(abt + 1)$	(Valencia <i>et al.</i> 2015) (Zhou 2016)
DH – Second ordre	$\frac{dDH}{dt} = DH_{max} - \frac{DH_{max}}{1 + k_{DH} \cdot DH_{max} \cdot t}$	(Deng <i>et al.</i> 2017, 2018; Deng 2018) (Beaubier <i>et al.</i> 2019a)
Xp – Second ordre	$\frac{dXp}{dt} = Xp_{max} - \frac{Xp_{max}}{1 + k_{Xp} \cdot Xp_{max} \cdot t}$	(Beaubier <i>et al.</i> 2019a)
Xp – Pseudo-premier ordre / M-M	$\frac{A}{A_0} = 1 - e^{-\frac{k_2 \cdot E_0}{K_m} \cdot t}$	(Agard <i>et al.</i> 2012) (Deng <i>et al.</i> 2017)
Fraction massique de chaque peptide – Premier ordre / M-M	$\frac{dy_i}{dt} = k \cdot \frac{1}{1 + \frac{C_0 \cdot y_h}{K_I}} \cdot \left( \sum_{j=i+1}^N 2 \cdot \frac{y_j}{j} - y_i(i-1) \right)$	(Trusek-Holownia & Noworyta 2015)
Concentration de chaque peptide – Premier (f) et Second ordre (s)	$C_{i,t}^f = 2 \cdot (C_0^f - C_0^f \cdot e^{-k_{i,app}^f \cdot t})$ $C_{i,t}^s = 2 \cdot \left( C_0^s - \frac{C_0^s}{1 + k_{i,app}^s \cdot t \cdot C_0^s} \right)$	(Butré <i>et al.</i> 2014) (Deng 2018)

### 1.2.3.3. Modèles empiriques : Surfaces de réponses

L'impact des conditions opératoires ( $pH$ ,  $T$ ,  $E/S$ ) sur les cinétiques de protéolyse a été l'objet d'un grand intérêt pour l'optimisation des conditions de réaction. Il en va de même pour l'optimisation des propriétés obtenues par protéolyse enzymatique.

Si le mécanisme exact de la protéolyse enzymatique n'a pas pu être modélisé, l'application de modèles statistiques et empiriques a permis de contourner cette difficulté en reliant directement les conditions opératoires à une (ou des) propriété(s) recherchée(s). Cela a été possible notamment grâce à la stratégie des plans d'expériences (DoE pour « Design of Experiments ») et méthode de surfaces de réponses (SRM pour « Surface Response Methodology ») (Hill & Hunter 1966; Telford 2007). Le DoE est un processus structuré qui permet de mettre en œuvre et d'analyser des tests contrôlés pour évaluer les facteurs

indépendants qui affectent une variable de réponse dans un domaine donné. De plus, cette méthode est multivariable, c'est-à-dire qu'elle permet d'établir des corrélations en faisant varier les facteurs simultanément, ce qui ne se faisait pas avec les tests enzymatiques cinétique usuels. Ainsi, les conditions opératoires telles que le  $pH$ , la température, le ratio  $E/S$ , la concentration en enzyme, la nature de l'enzyme, la concentration en substrat et la nature du substrat, sont autant de facteurs dont l'influence peut être évaluée sur les propriétés de l'hydrolysats telles que le  $DH$ , la  $Xp$ , l'activité microbienne, l'activité anti-radicalaire, l'activité chélatrice, l'activité inhibitrice de ACE, la solubilité, *etc.* (Linder *et al.* 1997; Guerard *et al.* 2007; Guo *et al.* 2009; Chabeaud *et al.* 2009a; Seo *et al.* 2015; Wali *et al.* 2017; Vidal *et al.* 2018; Korkmaz & Tokur 2022).

Cela permet ainsi d'implémenter un (ou des) modèle(s) polynomial(aux) avec des termes significatifs qui mettent en lien les facteurs (conditions opératoires) et les réponses (propriétés) (*cf. Eq. 79 p.108 M&M*). L'avantage de cette méthodologie est qu'elle permet de modéliser un système même si l'on ne connaît pas tous les phénomènes physico-chimiques impliqués, car les valeurs nécessaires au bon ajustement du modèle seront compensées par les constantes du modèle. Ces modèles permettent notamment de trouver les conditions optimales, c'est-à-dire l'ensemble des conditions significatives et leur valeur qui amènent à la capacité maximale (ou minimale) de la propriété recherchée, c'est l'optimisation (Telford 2007).

#### I.2.3.4. Modèles hybrides

Cependant, un modèle polynomial ne correspond pas forcément à toutes les cinétiques enzymatiques. Une méthodologie alternative propose alors de combiner le modèle du mécanisme (qui comprend des paramètres cinétiques) et à la caractérisation simple du procédé en termes des paramètres opératoires (Valencia *et al.* 2014). Pour cela, les constantes et les paramètres cinétiques  $a$ ,  $b$  et/ou  $k$  (*cf. modèles Tableau 5 p.47*) sont les variables dépendantes auxquelles la stratégie DoE attribue des corrélations en fonction des conditions opératoires ( $pH$ ,  $T$ ,  $E/S$ ). Par conséquent, ces modèles permettent de modéliser toute la cinétique réactionnelle et l'évolution d'une propriété en fonction des conditions opératoires appliquées (Valencia *et al.* 2015; Huang *et al.* 2020a; Du *et al.* 2022).

#### I.2.3.5. Modèles empiriques : Equations différentielles

La question de la modélisation du mécanisme protéolytique reste toute de même importante, car la compréhension de la dynamique de l'hydrolyse permet d'une part, de contrôler les propriétés du produit (Andrade *et al.* 2019), et d'autre part, d'accroître le succès d'un

changement de mode de production (d'un *batch* à un mode continu par exemple, où le substrat est ajouté et les produits sont soutirés) ou d'un accroissement de volume de production (extrapolation à l'échelle industrielle) (Saran *et al.* 2007; Punekar 2018). A l'heure actuelle, la généralisation d'outils informatiques (Vorob'ev 1998), des méthodes statistiques (Sousa *et al.* 2003; duVerle & Mamitsuka 2012; Seleme 2019) et des modèles mathématiques (Vorob'ev *et al.* 1987; Meena *et al.* 2010) pour générer des fonctions de plus en plus complexes, ont permis d'élargir les possibilités d'étude de systèmes d'hydrolyse très complexes avec l'intégration des cinétiques de chaque composé. Cependant, il n'y pas encore de méthodes simples, compatibles avec ce qu'un industriel accepterait d'investir en temps et en énergie.

Le problème général réside dans le fait que si un modèle est trop simple, son application sera très limitée, mais s'il est trop complexe, il ne peut être analysé statistiquement avec une précision suffisante (Márquez & Vázquez 1999). Un consensus doit alors être trouvé en ajustant les valeurs d'un modèle le plus adéquat possible sur les expériences empiriques, de cette manière même si tous les phénomènes ne sont pas identifiés, ils seront quand même pris en compte et permettront d'établir un modèle significatif.

Toutes les modélisations citées dans *Tableau 5* sont valables pour un mécanisme de type *one-by-one*. La seule étude mécanistique proposant une modélisation *zipper* est présentée par Trusek-Holownia & Noworyta (2015). Cela suppose néanmoins de connaître la protéine hydrolysée (en l'occurrence  $\beta$ -lactoglobuline), les sites de coupures de l'enzyme utilisée (tyrosine), la réactivité des liaisons peptidiques, afin de présupposer les différentes masses des groupes de monomères libérés pour ajuster les paramètres du modèle appliqué (inhibition ou non, le nombre de monomères, la fraction, l'inactivation de l'enzyme) et ses paramètres cinétiques, qui étaient issus des données de Fernández & Riera (2013). Cela reste donc plutôt applicable dans un cadre académique qu'industriel, étant donné que ce niveau de connaissances demande plusieurs années d'analyses. Il est alors nécessaire de trouver des raccourcis pour rendre le développement plus attractif et abordable.

La solution proposée est alors d'utiliser les données expérimentales et de les combiner aux équations différentielles, qui sont en fait déjà des équations mathématiques des réactions chimiques (*cf.* §1.2.1.3.1 p.33 *EB*). La libération des peptides finaux et intermédiaires au cours des mécanismes *one-by-one* et *zipper* trouve justement leur ressemblance aux réactions chimiques usuelles d'un produit issu du substrat ( $A \rightarrow B$ , *Eq. 17*) ou bien d'un produit devenu substrat intermédiaire ( $A \rightarrow B$  puis  $B \rightarrow C$ , *Eq. 20*) dont les taux de réaction sont aisément écrits

sous forme d'équations différentielles. Dans le premier cas (*Eq. 17*), l'*Eq. 18* est le taux de réaction du réactif *A* qui disparaît, et l'*Eq. 19* est le taux de réaction du produit *B* qui apparaît. C'est une analogie du mécanisme *one-by-one* où chaque peptide provient de la protéine, qui a déjà été appliquée en remplaçant le modèle de M-M par le premier ou second ordre de réaction.



$$\Leftrightarrow \frac{dA}{dt} = -k_1[A] \quad \text{Eq. 18}$$

$$\Leftrightarrow \frac{dB}{dt} = k_2[A] \quad \text{Eq. 19}$$

Dans le deuxième cas (*Eq. 20*), l'*Eq. 21* est le taux de réaction du réactif *A* qui se transforme en produit-réactif *B*, qui lui-même se transforme en produit *C* par le taux de réaction en *Eq. 22* et enfin l'*Eq. 23* et le taux d'apparition du produit *C*. Cette réaction est une analogie du mécanisme *zipper*, où un peptide intermédiaire est libéré de la protéine, puis ce peptide libère un peptide final.



$$\Leftrightarrow \frac{dA}{dt} = -k_1[A] \quad \text{Eq. 21}$$

$$\Leftrightarrow \frac{dB}{dt} = k_1[A] - k_2[B] \quad \text{Eq. 22}$$

$$\Leftrightarrow \frac{dC}{dt} = k_2[B] \quad \text{Eq. 23}$$

Les cinétiques de ces réactions sont illustrées par la *Figure 12*. Dans le premier cas (*Figure 12 A*), la totalité du réactif *A* est transformée en produit *B* donc les courbes sont l'opposé l'une de l'autre. Dans le deuxième cas (*Figure 12 B*), le produit-réactif *B* est libéré au début, puis il est consommé au profit du produit *C*. Une certaine latence est ainsi observée au début pour le produit *C* étant donné qu'il fallait une phase de formation du produit-réactif *B*. Les produits *B* et *C* ont des évolutions bien différentes, et pourtant, la somme des deux définira la même courbe que le produit *B* dans le premier cas (*Figure 12 A*).

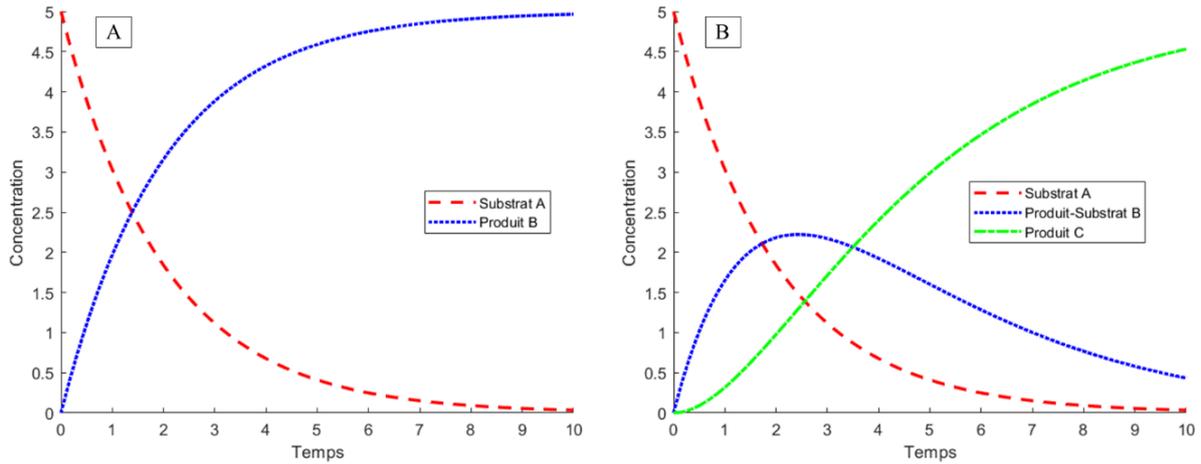


Figure 12 : Simulation de réactions de transformation de réactifs, supposées d'ordre 1. (A) Réactif A en produit B, avec  $k_1 = 0,5$  et  $[A]_0=5$ . (B) Réactif A en B puis en C, avec  $k_1 = 0,5$ ,  $k_2 = 0,33$  et  $[A]_0=5$ . Les valeurs sont arbitraires.

Ainsi, la méthodologie la plus précise pour étudier la protéolyse incluant l'ensemble des produits consisterait à identifier, dans un premier temps, les différentes populations de peptides générés, par CLHP (Sousa *et al.* 2003; Trusek-Holownia & Noworyta 2015) ou par spectrométrie de masse (Munoz-Tamayo *et al.* 2012; Fernández & Riera 2013). Dans un deuxième temps, la cinétique d'hydrolyse est étudiée en suivant les concentrations de chaque peptide (ou fraction peptidique) identifié(e) par les mêmes technologies. Puis, un procédé séquentiel de génération de ces peptides en fonction des populations identifiées (taille, séquence) est proposé. Cela donne le schéma réactionnel qui montre l'intervention de chaque peptide dans le mécanisme d'hydrolyse et ainsi un bilan de matière (taux de réaction) est établi pour chaque composant (protéine, peptide intermédiaire, peptide final). Enfin, les paramètres cinétiques de ces équations de bilan de masse sont ajustés aux expériences. De cette manière Munoz-Tamayo *et al.* (2012) ont identifié les paramètres cinétiques de neuf fragments peptidiques (dont deux intermédiaires) issus de l'hydrolyse de la  $\beta$ -caséine par *Lactococcus lactis*. Les concentrations de l'enzyme ont été prises en compte. Fernández & Riera (2013) ont utilisé la relation de l'Eq. 24 pour les peptides finaux et l'Eq. 25 pour les peptides intermédiaires. Cela a permis de déterminer les paramètres cinétiques pour quinze peptides issus de la  $\beta$ -lactoglobuline digérée par la trypsine.

$$\frac{dPep_x}{dt} = k_x \cdot Pep_x \cdot E \quad \text{Eq. 24}$$

$$\frac{dPep_x}{dt} = k_x \cdot Pep_x \cdot E - k_h \cdot Pep_x \cdot E \quad \text{Eq. 25}$$

Avec  $Pep_x$  un peptide  $x$ ,  $k_x$  la constante d'apparition du peptide  $x$ ,  $k_h$  la constante d'hydrolyse (de disparition) supplémentaire si c'est un peptide intermédiaire, et  $E$  l'enzyme.

### I.2.3.6. Optimisation économique multicritère

Un hydrolysats protéique doit non seulement avoir des propriétés technico-fonctionnelles, mais en plus le processus de sa fabrication doit être économiquement viable, pour un retour sur investissement convenable. Ainsi, même à une étape précoce du développement, il faut tenir compte des coûts de production (Faber *et al.* 2015). Au stade de la protéolyse, les deux critères les plus coûteux sont le temps d'hydrolyse (demande en énergie pour maintenir la température) et la quantité de l'enzyme. Il faut donc trouver un juste compromis en la quantité de l'enzyme, le temps de la réaction, et la propriété de l'hydrolysats à un niveau acceptable. La résolution de ce genre de problématique ne peut pas être facilement déterminée à partir d'une SRM, car l'optimalité réactionnelle se trouve généralement un jeu de conditions qui coûtent cher à la réalisation (température élevée, temps long, quantité d'enzyme élevé) (Reeves & Wright 1999). Ainsi, des outils de résolution spécifiques aux problèmes d'optimisation multicritère ont été développés, notamment les algorithmes évolutionnaires qui permettent d'obtenir un ensemble de solutions optimales respectant les compromis avec un temps de calculs réduit (Sarkar & Modak 2005). Cette dernière approche d'optimisation par l'algorithme génético-évolutionnaire avec la modélisation par les plans d'expériences de paramètres cinétiques (*cf.* §I.2.3.4 p.48 *EB*) a été appliquée avec succès par Beaubier *et al.* (2021a) et représente une méthodologie très utile à l'optimisation des protéolyses en *batch*.

En résumé, la **protéolyse enzymatique** dépend de nombreux paramètres : la **spécificité de l'enzyme**, la **conformation de la protéine** et les **conditions opératoires** (concentration des réactifs,  $pH$ ,  $T$ ,  $E/S$ ). Ces paramètres définissent le **mécanisme** protéolytique (**one-by-one** ou **zipper**), lequel attribuera une certaine **composition** (fractions peptidiques, fraction protéique), certaines **caractéristiques** (hydrophobie, répartition masse molaire, concentration, *etc.*), et à la fin, certaines **propriétés** à l'hydrolysat (émulsion, hydratation, viscosité, bioactivité, *etc.*).

Le **mécanisme protéolytique** peut être **dirigé** par les conditions opératoires, mais pour cela, il faut pouvoir **modéliser** cette **dynamique particulière** et très complexe. Les modèles mécanistiques, appliqués usuellement en enzymologie, ne sont pas adaptés à un système complexe de **plusieurs réactions en parallèle** et **plusieurs produits** qui sont aussi des **réactifs**. Des modélisations basées sur les **données empiriques** et **équations différentielles** ont été développées et appliquées avec succès pour déterminer les **paramètres cinétiques** de **chaque peptide identifié**. Cependant, elles nécessitent une **étude très poussée** de l'enzyme, afin de connaître non seulement sa **spécificité**, mais aussi sa **sélectivité**, et de la protéine, afin d'identifier les peptides et leur **séquence**.

Pour **optimiser la production** de l'hydrolysat sur les **critères technico-économiques** (temps hydrolyse, quantité enzyme), un **modèle hybride**, combinant une SRM et un modèle cinétique, peut être utilisé en tandem avec une méthode **d'optimisation multicritères**. Cela permet d'obtenir des conditions opératoires optimales donnant la **propriété d'hydrolysat ciblée** en accord avec un **compromis économique**.

### I.3. Filtration membranaire

Les propriétés des hydrolysats dépendent généralement de certaines populations cibles de peptides (de taille ou séquence spécifique). Or, en mélange complexe, ces propriétés/activités peuvent être diminuées due à la présence d'autres fractions non-actives. Afin d'enrichir les hydrolysats en peptides d'intérêt pour améliorer leurs activités, des procédés de fractionnement/purification en aval de la protéolyse peuvent être nécessaires. Il s'agit principalement de méthodes de précipitation sélective, chromatographie et séparation membranaire. Cette dernière technique est très avantageuse pour la purification de peptides : elle ne nécessite pas de solvant organique, peut être réalisée en conditions douces (température ambiante et  $pH$  de la solution tampon), ce qui permet de garantir leurs intégrité et activité biologique ; elle permet de séparer une fraction peptidique d'intérêt (fractionnement) ; elle peut être combinée facilement à d'autres opérations unitaires, et donc permet un fonctionnement continu ; ce qui à la fin, permet d'obtenir un rendement élevé en produit (Agyei *et al.* 2016).

Ainsi, cette technologie s'est développée en fonction des différents besoins de clarification, concentration, purification, lavage, fractionnement, amenant à une diversité de techniques, géométries, matériaux et performances. Ce sont des procédés très étudiés et décrits dont les dossiers approfondis sont disponibles dans la revue « Techniques de l'Ingénieur » (Maurel 1993; Aimar & Daufin 2004; Aimar 2006; Causserand 2006; Gésan-Guiziou 2007; Remigy & Desclaux 2007; Rabiller-Baudry 2009; Aimar *et al.* 2010a; Rios 2012) et dont les aspects sont succinctement repris dans cette partie.

#### I.3.1. Notions et mécanismes de base

La séparation à travers une membrane (une couche mince d'un matériau physique perméable et insoluble) nécessite l'action d'une force motrice de transfert, qui peut être une différence de potentiel en termes de pression, de concentration ou électrique. Les constituants perméables à la membrane vont ainsi s'écouler avec la phase liquide dans un compartiment perméat (fraction transmise). Les constituants ne pouvant pas s'écouler dans les pores de la membrane vont eux rester dans le compartiment rétentat (fraction retenue) et s'accumuler sur la membrane (formation d'un dépôt) (*Figure 13 A*) (Rios 2012). La filtration tangentielle applique un flux parallèle à la membrane et permet de limiter le dépôt en perturbant son accumulation avec un cisaillement provoqué par ce flux de recirculation. Cela permet ainsi d'avoir une diminution du flux de perméat plus lente (*Figure 13 B*) (Aimar *et al.* 2010a).

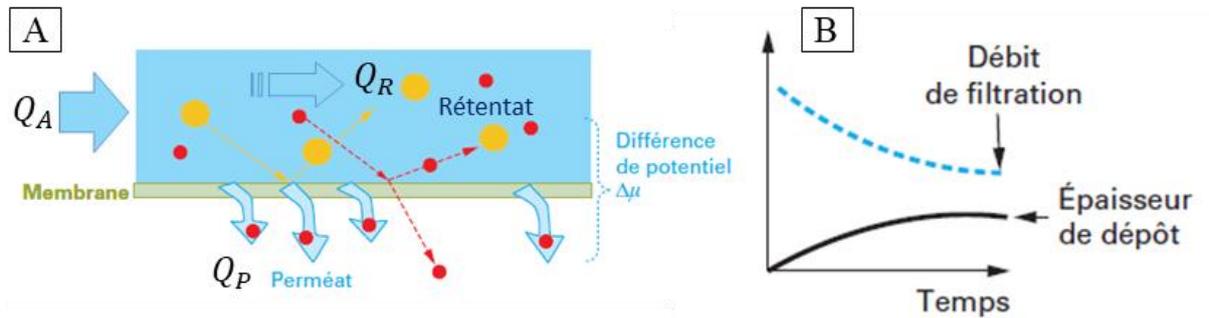


Figure 13 : (A) Illustration du principe de la filtration tangentielle, avec  $Q_A$  le débit d'alimentation de la solution à traiter, qui est divisé en deux, en  $Q_P$ , le débit traversant la membrane, formant le débit de perméat, et  $Q_R$  le débit ne traversant pas la membrane et formant le débit de rétentat. (B) Conséquence de la filtration tangentielle sur le dépôt des composés retenus sur la membrane et sur le débit de perméat (débit de filtration) (Aimar et al. 2010a; Rios 2012).

Un procédé membranaire implique des notions de transfert de matière (écoulement, accumulation), de transfert de solvant (pression transmembranaire) et de transfert membranaire (sélectivité, seuil de coupure) qui sont influencés par la géométrie, les matériaux utilisés et les paramètres de fonctionnement.

### 1.3.1.1. Flux de perméation

Les membranes de filtration sont assimilées à des milieux poreux incompressibles, ainsi le flux de perméat ( $J_{flux}$ ) de solvant pur (eau) est proportionnel à la différence de pression appliquée de part et d'autre de la membrane. Cette caractéristique est décrite par la loi de Darcy (Aimar & Daufin 2004) :

$$J_{flux} = L_p \cdot \frac{\Delta P}{\mu} \quad \text{Eq. 26}$$

Avec  $L_p$  le coefficient de perméabilité (ou juste perméabilité) ( $m$ ),  $\mu$  la viscosité du perméat ( $Pa \cdot s$ ). La pression transmembranaire est la force agissante de l'opération et c'est la moyenne des pressions d'alimentation ( $P_A$ ) et celle dans le compartiment rétentat ( $P_R$ ), à laquelle on soustrait la pression dans le compartiment perméat ( $P_P$ ). Cette dernière vaut en général zéro (Aimar & Daufin 2004) :

$$PTM = \Delta P = \frac{P_A + P_R}{2} - P_P \quad \text{Eq. 27}$$

Tout composé  $i$  dans le rétentat est véhiculé vers le perméat avec une vitesse  $J_{flux}$ , définissant un flux convectif, ou flux de matière,  $C_i \cdot J_{flux}$  ( $g \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ). Ainsi, plus  $J_{flux}$  est élevé, plus de composé  $i$  sera transféré pendant un temps donné. Par conséquent, le flux de perméat est le paramètre principal qui détermine la rentabilité du processus de séparation en termes de réduction du temps et de productivité élevée (Cui et al. 2010).

### 1.3.1.2. Transport de solutés

L'application d'une membrane pour un procédé dépend essentiellement de ses propriétés sélectives, c'est-à-dire de sa capacité à être perméable à certains composés d'une taille particulière. Ainsi, en premier lieu, les membranes ont été considérées comme des tamis et la loi de Ferry (Ferry 1936) a été définie pour décrire le transport de molécules à travers une membrane (Cherkasov 1990). Elle considère que dans un pore de rayon  $r$ , les molécules se répartissent dans un cylindre de rayon  $r - a$ . Avec  $a$  le rayon de Stokes de la molécule. Grâce à cette règle, dans des conditions idéales d'exclusion stérique, le taux de rétention ( $R$ ) peut être approximé par (Aimar & Daufin 2004) :

$$R = \left[ 1 - \left( 1 - \frac{a}{r} \right)^2 \right]^2 \quad \text{Eq. 28}$$

La rétention définit la sélectivité du procédé, avec  $R = 1$  si la molécule est parfaitement retenue, et  $R = 0$  si la membrane est perméable à la molécule (concentration dans le perméat égale à la concentration dans le rétentat). La sélectivité est la capacité de la membrane à retenir les solutés de différentes tailles, indiquée par son seuil de coupure nominal (NMWCO pour « nominal molecular weight cut-off »), lequel est déterminé par le constructeur. Le seuil de coupure est défini comme la masse molaire minimale d'un soluté étalon dont la rétention est supérieure à 90% ou 95% (Causserand 2006). Les membranes d'ultrafiltration ont des seuils de coupure qui varient de 1 à 300  $kg.mol^{-1}$  généralement, ce qui correspond à peu près à des tailles de pores entre 2 et 100  $nm$  (Sablani *et al.* 2006).

Les courbes de tamisage sont usuellement réalisées avec des polymères, notamment la norme NF X45-103 préconisait d'utiliser le dextran ou le polyéthylène glycol (PEG) comme polymère traceur, car ils présentent une grande diversité de tailles et interagissent très peu avec les membranes (Afnor NF X 45-103 1997). Or, la rétention du soluté est basée sur les dimensions efficaces du soluté et non sur le poids moléculaire seul. Les solutés non-sphériques s'orienteront sous le cisaillement, de sorte que leur grand axe soit parallèle aux pores. Ainsi, les dextrans à chaîne linéaire ont un passage plus élevé que les protéines globulaires de même poids moléculaire, car le rayon effectif des protéines augmente (jusqu'à un facteur 4) avec la diminution de la force ionique en raison de la réduction du blindage électrostatique (Pujar & Zydney 1998). Ensuite, les interactions entre la membrane et les peptides en solution sont très fortes et dépendent des conditions opératoires ( $pH$ ,  $T$ , force ionique). Ainsi, par exemple, les particules chargées augmentent la rétention si les charges des particules et de la membrane sont du même type (les particules sont repoussées), et sont à l'origine du phénomène d'adsorption

électrostatique (le flux de matière est bloqué). On peut voir les différences que cela peut amener par la **Figure 14** quand la sélectivité est stérique (effet tamis pur) et quand l'effet électrostatique est ajouté (Aimar 2006). Ainsi, l'indication du seuil de coupure n'est pas une garantie pour obtenir un hydrolysate enrichi uniquement en peptides inférieurs au seuil. Ainsi, une caractérisation plus représentative en fractions peptidiques est nécessaire (Bourseau *et al.* 2009). Notamment, un étalonnage directement avec l'hydrolysate peut être fait, ce qui donne une courbe de sélectivité et cette dernière représente le plus fidèlement possible les fractions peptidiques qui seront retenues et avec quelle intensité (Chabeaud *et al.* 2009c; Kapel *et al.* 2011).

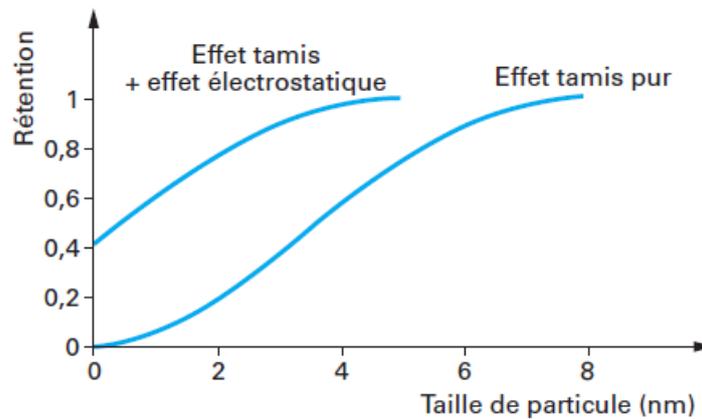


Figure 14 : Courbes de tamisage. Rétention calculée selon la loi de Ferry pour un soluté supposé sphérique pour une membrane supposée homopore (pores uniformes) avec et sans interactions électrostatiques (Aimar 2006).

### 1.3.2. Classification des techniques de séparation membranaire

Les procédés de séparation baro-membranaires sont classifiés en fonction de leur taille des pores, ce qui indique les constituants (particules en suspension ou en solution) qu'ils peuvent retenir, comme schématisé sur la **Figure 15**. La filtration conventionnelle est utilisée pour l'eau brute, pour la purifier de particules supérieures à  $10\ \mu\text{m}$  (émulsions huileuses, certaines bactéries, des complexations de particules coagulées). La microfiltration traite plus ou moins la même catégorie, mais pour des particules entre  $0,1$  et  $10\ \mu\text{m}$  (bactéries et colloïdes complexés ou en floes). Cette technique est souvent utilisée en préfiltration de l'ultrafiltration, pour diminuer l'impact de l'encrassement/colmatage. L'ultrafiltration est utilisée pour des particules entre  $1$  et  $100\ \text{nm}$  qui permet d'avoir une clarification marquée du perméat en enlevant les macromolécules (polymères, protéines, colloïdes, virus, de  $1000$  à  $500\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ ). Ces particules peuvent aussi, au contraire, être concentrées si elles représentent un intérêt. La nanofiltration, est comme le nom l'indique, permet la rétention des composés de l'ordre du nanomètre, notamment les sels ionisés multivalents (calcium, magnésium, sucres composés

organiques entre 100 et 1000  $g.mol^{-1}$ ) et les composés organiques non ionisés de masse molaire supérieure à 300  $g.mol^{-1}$ . L'osmose inverse, enfin, ne laisse passer que l'eau (retient les ions minéraux et peptides, composés organiques de 20 à 100  $g.mol^{-1}$ ) et peut ainsi être utilisée pour le dessalement de l'eau de mer, la production d'eau ultra-pure ou la concentration des jus de fruits (Aimar 2006; Aimar *et al.* 2010a).

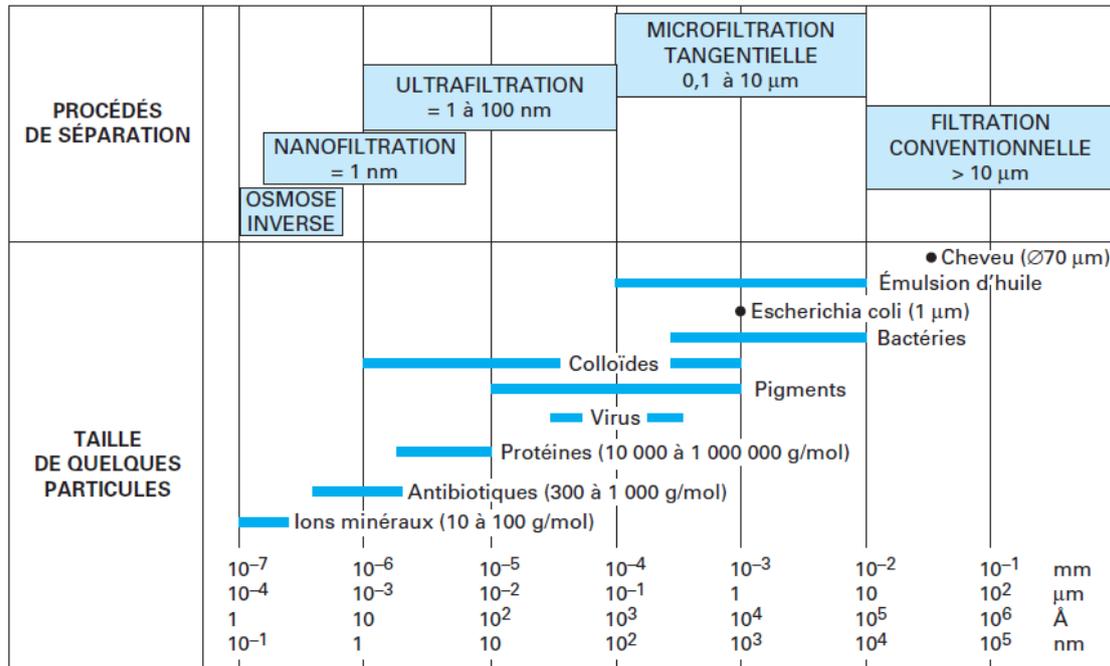


Figure 15 : Techniques de séparation en fonction de la taille des particules (Aimar *et al.* 2010a).

### I.3.3. Géométrie et matériaux

Il existe quatre configurations de membranes principales : fibres creuses (*Figure 16 A*), spiralées (*Figure 16 B*) (qui sont des membranes planes enroulées autour d'un axe), planes (*Figure 16 C*), et tubulaires (comme les fibres creuses, mais avec des canaux plus larges avec possibilité d'un seul canal très large), avec chacune leurs particularités, telles que résumées dans le *Tableau 6*. Les membranes tubulaires et en fibres creuses sont autosupportées, cela veut dire qu'elles n'ont pas besoin d'un support sur lequel serait accrochée la couche active (sélective) de la filtration, contrairement aux membranes planes ou spiralées (Remigy & Desclaux 2007). La distinction entre les membranes tubulaires et fibres creuses se fait au niveau du diamètre des canaux et matériaux utilisés : les membranes tubulaires ont des canaux de plus de 2 *mm* tandis que ceux des fibres creuses ont des diamètres en dessous de 1 *mm*.

Les matériaux utilisés peuvent être des minéraux (technologie céramique) ou des composés organiques (polymères) et doivent être choisis en fonction de l'application (contrainte température, *pH*, *etc.*), du mode du procédé de séparation et de la géométrie possible. Le

**Tableau 7** suivant reprend les avantages et les inconvénients de chaque matériau. Les membranes tubulaires sont surtout minérales, alors que les fibres creuses sont surtout faites de polymères.

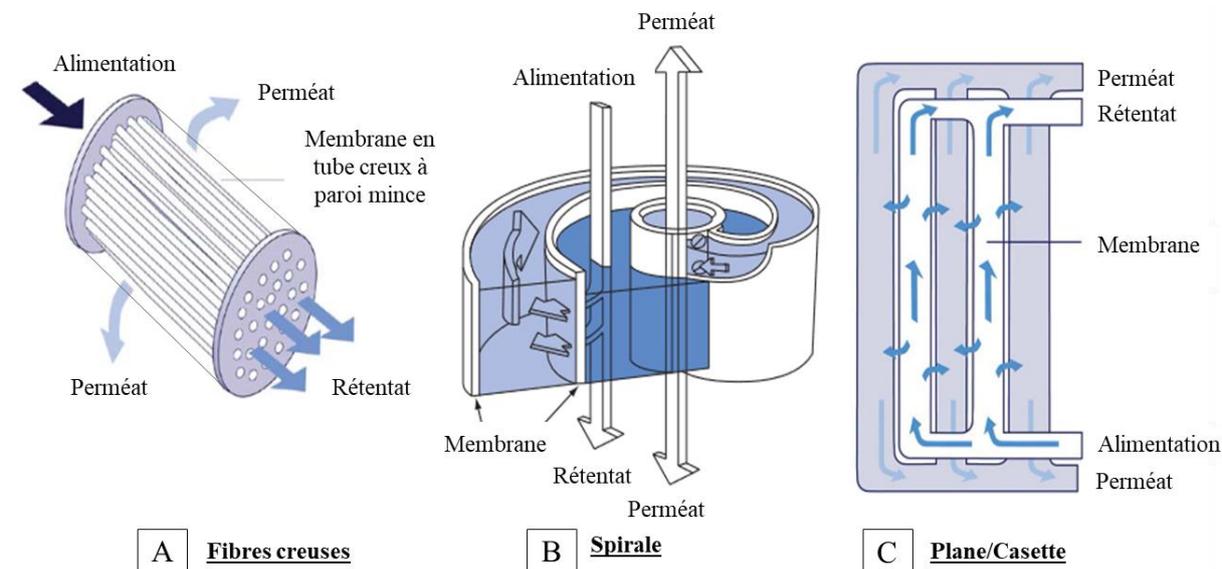


Figure 16 : Schéma des différents modules de filtration (Millipore corporation).

Tableau 6 : Différentes géométries de membranes et leur caractéristiques principales (Aimar & Daufin 2004; Aimar 2006).

Géométrie	Matériaux	Caractéristiques
<b>Plane</b>	Polymères/ céramiques	Montage en filtre-pressé (séparateurs) Changement possible membrane par membrane Démontage facile Adaptée aux faibles pressions Seule géométrie pour des procédés électromembranaires Pas de rétrolavage
<b>Plane spiralée</b>	Polymères	Séparateurs indispensables Nettoyage et désinfection difficile Adaptés aux pressions moyennes à élevées Mal adapté aux débits de filtration élevés Mal adapté aux traitements des suspensions
<b>Fibres creuses</b>	Polymères/ céramiques	Autosupportée Régime laminaire Pression limitée Mal adapté aux suspensions Rétrolavage possible Plusieurs fibres dans une enveloppe
<b>Tubulaire</b>	Céramiques/ Polymères	Autosupportée Régime turbulent la plupart du temps Monocanal ou plusieurs canaux dans une enveloppe Très adapté aux hautes pressions et aux suspensions Pas de rétrolavage

Pour le fractionnement des hydrolysats protéiques, c'est surtout l'ultrafiltration qui est opérée, parfois la nanofiltration pour cibler des peptides de plus petite taille ( $<1 \text{ kg.mol}^{-1}$ ). Les membranes organiques ont été le plus souvent utilisées (cellulose, polysulfone), pour leur coût plus abordable et plus de géométrie et taille des pores disponibles (cf. **Tableau 9** p.69 *EB*). Les performances de séparation des membranes (rendement, sélectivité, flux de perméat, etc.) dépendent fortement de la nature et de la composition de l'hydrolysats, nécessitant souvent un criblage de plusieurs membranes disponibles (matériau et/ou seuil de coupure) pour étudier les phénomènes impliqués et obtenir la séparation voulue (Bourseau *et al.* 2009; Chabeaud *et al.* 2009c).

Tableau 7 : Principales caractéristiques des matériaux les plus courants (Aimar & Daufin 2004; Remigy & Desclaux 2007).

Matériau	Organique/polymère	Minéral/Céramique
<b>Exemple</b>	Acétate de cellulose, cellulose régénérée, polysulfone, polysulfone sulfonée, polyéther-sulfone, difluorure de polyvinyle	Zircone sur carbone, alumine, oxyde de titane sur alumine
<b>Avantages</b>	Grande variété de taille de pore (MF, UF, NF, OI) Grande variété de géométrie (plan, tube, spiralée, fibre creuse) Faible coût	Stabilité thermique ( $T > 300^\circ\text{C}$ ) Stabilité chimique ( $0 < \text{pH} < 14$ , oxydants) Résistances mécaniques aux pressions élevées (10-100 bar) Résistance aux solvants
<b>Inconvénients</b>	Faible stabilité thermique ( $T < 100^\circ\text{C}$ ) Faible stabilité chimique ( $1 - 4 < \text{pH} < 8 - 12$ , oxydants) Faible résistance aux solvants	Coût (facteur 10 par rapport aux membranes organiques) N'existe pas pour des faibles tailles de pore (NF, OI) Géométrie possible tubulaire ou plane

### I.3.4. Lois de comportements et phénomènes associés

#### I.3.4.1. Polarisation de concentration

Contrairement au fonctionnement en eau pure (*Eq. 26* p.55), la présence de solutés entraîne leur accumulation à la membrane, changeant ses propriétés et le comportement du  $J_{flux}$ . Au début du fonctionnement, le flux augmente linéairement avec l'augmentation de la *PTM*, puis il stagne voire diminue à des *PTM* très élevées (Jönsson & Trägårdh 1990; Meireles *et al.* 1991a). Il s'agit de l'encrassement de la membrane et de l'effet de polarisation de concentration. La *Figure 17* présente la formation du dépôt de solutés le long de la paroi d'une membranaire

tubulaire lors d'une filtration tangentielle. Les solutés étant transférés dans le perméat par le flux convectif, une partie s'accumulent à la membrane et forment une couche de plus en plus chargée, la « couche limite ».

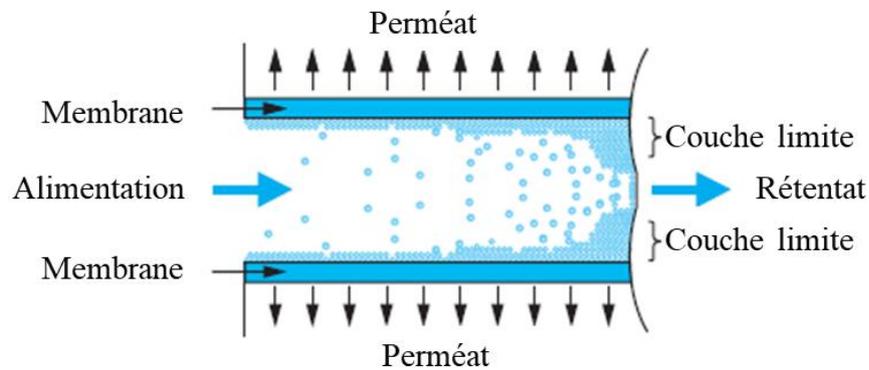


Figure 17 : Formation de la couche de polarisation dans une membrane tubulaire (Aimar et al. 2010a).

La **Figure 18 A** présente en détails ce qui se passe à la surface de la membrane et dans la couche limite. L'accumulation des solutés à la surface de la membrane, due au flux de matière  $J_{flux} \cdot C_0$ , modifie localement la concentration à la membrane ( $C_m$ ), qui peut être jusqu'à 10 fois supérieure à la concentration moyenne initiale ( $C_0$ ) dans la solution à filtrer dans une configuration de fibres creuses (Sanders & Hubble 1991). La conséquence directe est la mise en place d'une couche limite, d'épaisseur  $\delta$ , avec un gradient de concentration entre  $C_m$  et  $C_0$ . Dans un cas extrême (**Figure 18 B**), la concentration à la surface de la membrane peut atteindre la concentration critique de gel ( $C_g$ ) où les solutés ayant atteint leur limite de solubilité, créent un gel compact, formant une sorte de deuxième membrane (Aimar et al. 2010a).

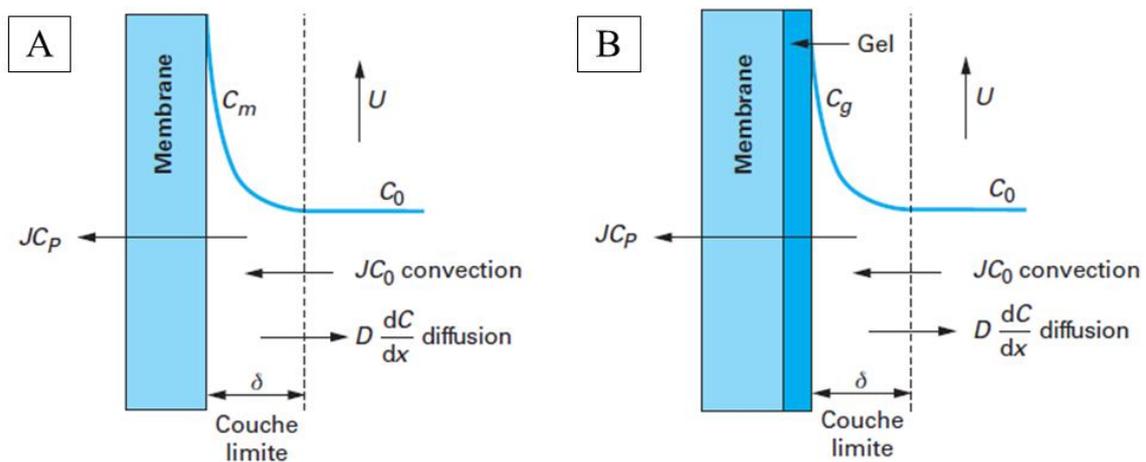


Figure 18 : Représentation de la polarisation par (A) la théorie du film, (B) la théorie du gel.  $U$  est la vitesse moyenne de la solution d'alimentation (rétentat) (Aimar et al. 2010b).

Cette couche de polarisation augmente la résistance au flux de matière par des phénomènes de rétro-diffusion ( $D \cdot \frac{dC}{dx}$ ), qui créé un flux de solutés de la zone concentrée (membrane) vers

la zone diluée (solution à filtrer) et provoque ainsi : une « déconcentration » de la couche limite ; l'interaction de surface (agrégation, adhésion) qui emprisonne les solutés dans la couche limite ; l'interaction hydrodynamique (cisaillement, érosion) qui fait migrer les molécules le long de la membrane, ce qui contribue à déstabiliser le dépôt et à réintégrer la matière dans la solution à filtrer (Aimar *et al.* 2010b).

#### I.3.4.2. Encrassement et colmatage

Le phénomène de polarisation de concentration survient principalement lors de la séparation de macromolécules et molécules de faibles poids moléculaires (inférieurs à  $6 \text{ kg.mol}^{-1}$ ), mais il est réversible, car le flux peut être restauré en appliquant une alimentation en eau pure (Sablani *et al.* 2006). Cependant, un encrassement, voire un colmatage des membranes est observé lors de la mise en œuvre de procédés membranaires. Il est lié à de nombreux phénomènes comme l'obstruction, l'adsorption, le dépôt de gel, la précipitation, *etc.*, illustrés par la **Figure 19** p.63. L'adsorption est le dépôt d'une couche de solutés sur les parties accessibles de la membrane, ce qui diminue la taille des pores. Elle peut être peu gênante pour le transfert, mais l'adsorption d'ions chargés peut changer la charge apparente du matériau de la membrane. Les molécules très petites ( $MM < 1000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) ou très grandes ( $>100 \text{ nm}$ ) ne représentent pas de freins étant donné que la taille des pores n'est pas modifiée par les petites molécules et les grandes molécules s'adsorbent très peu, due à leur faible diffusivité. Les molécules aux tailles moyennes ( $\sim 50 \text{ nm}$ ), comme les macromolécules et les agrégats, posent le plus de problèmes. C'est le cas des protéines qui s'adsorbent assez facilement, dues à leur faible solubilité et une diffusivité relativement élevée – ce qui signifie qu'il n'y a pas besoin d'un flux pour qu'elles s'adsorbent dans les pores – et une capacité à se déformer pour présenter une conformation qui favorise l'adsorption (Meireles *et al.* 1991b; Brião & Tavares 2012; Field *et al.* 2017). Par ces phénomènes d'adsorption et d'interactions hydrophobes, les membranes hydrophobes ont tendance à s'encrasser plus facilement que les membranes hydrophiles. La diminution du  $J_{flux}$  d'une membrane avec un flux initial élevé (MWCO élevé) est plus rapide, par rapport à une membrane au flux initial faible (MWCO faible) (Jönsson & Trägårdh 1990; Dizge *et al.* 2011).

L'obstruction des pores se fait par des molécules de la taille des pores ou supérieure, qui sont entraînées par le liquide et finissent par se bloquer par « promiscuité ». Ce phénomène est très lié aux propriétés individuelles des particules et à leurs interactions avec le matériau et est, en général, la première raison d'une diminution très rapide du flux de perméat (Corbatón-Báguena *et al.* 2015).

Le dépôt est le résultat d'un changement d'état de fluides, la formation de gel ou de solide, due à la criticité de concentration limite de l'ensemble des solutés, qui peuvent obstruer totalement ou partiellement la membrane (Aimar 2006).

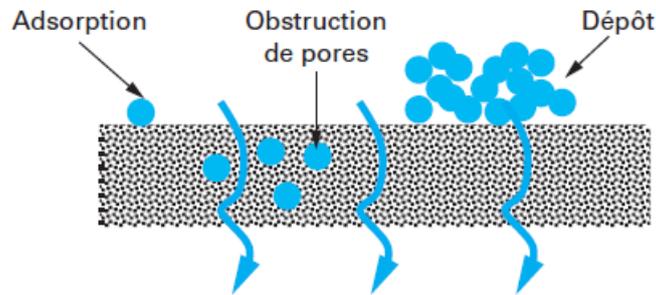


Figure 19 : Principaux mécanismes d'encrassement de membranes (Aimar et al. 2010a)

L'encrassement et l'effet de concentration de polarisation sont des phénomènes apparentés, mais distincts par la nécessité ou non d'un nettoyage chimique (Sablani *et al.* 2006). L'encrassement est donc considéré comme réversible si le nettoyage chimique est efficace. En revanche, il est considéré comme irréversible si ce nettoyage ne suffit pas, qualifié à ce moment de « colmatage ». Ce phénomène survient lorsque les macromolécules parviennent à remplir les interstices du dépôt et ainsi augmentent d'autant plus la résistance totale à l'interface membranaire (Shi *et al.* 2014). La concentration initiale de la solution à filtrer est alors aussi un paramètre à prendre en compte, car plus la concentration est élevée, plus l'encrassement augmente et par la même occasion les risques de colmatage, ce qui diminue rapidement le  $J_{flux}$  et nécessitera un nettoyage approfondi de la membrane (Jönsson & Trägårdh 1990; Chabeaud *et al.* 2009b).

Pour limiter l'effet de polarisation de concentration et l'encrassement, il est possible d'abord de chercher des compromis entre une membrane performante (adsorption minimisée, taille de pores adapté) et le fluide à traiter (concentration,  $pH$ , température) (Field *et al.* 2017). Ensuite, les conditions opératoires (géométrie, vitesse de recirculation,  $PTM$ ) peuvent permettre d'étendre la durée de fonctionnement avec un flux acceptable, comme une vitesse de recirculation élevée qui augmente le taux de cisaillement et le flux, mais cela implique plus d'énergie dépensée par la pompe d'alimentation/gavage (Brião & Tavares 2012) et une dénaturation protéique favorable à l'encrassement (Meireles *et al.* 1991a). Cependant, à un moment donné, le flux ne sera pas satisfaisant et un nettoyage en profondeur devra être réalisé pour retrouver les conditions de fonctionnement requises. Le nettoyage peut être fait de deux manières : chimiquement (avec  $HCl$ ,  $HNO_3$ ,  $NaOH$ , enzymes ou tensioactifs) et

mécaniquement par un « rétrolavage », qui renvoie le solvant du perméat vers le rétentat pour décoller périodiquement le dépôt sur la membrane (Aimar & Daufin 2004; Aimar 2006).

### 1.3.5. Modes de mise en œuvre

#### 1.3.5.1. Pression transmembranaire et flux de perméat

Deux modes de régulation du flux de perméat sont principalement mis en œuvre : par imposition d'un flux de perméat fixe, impliquant une libre augmentation de la *PTM* ; ou par imposition d'une *PTM* fixe, impliquant une diminution de flux non-compensatoire (Grenier 2005). Le mode à pression constante est plus simple à mettre en œuvre pour des pressions moyennes, mais un pressostat est nécessaire pour maintenir la pression imposée. Le mode à flux constant peut être préférable pour éviter un encrassement lourd. Le flux devrait être faible et la pression doit être suivie pour qu'au moment où la limite « haute » de pression est atteinte, le procédé soit arrêté (Aimar 2006).

Dans le cas du fractionnement d'hydrolysats protéiques, deux cas de mises en œuvre de l'ultrafiltration sont principalement rencontrés : en concentration discontinue ou en diafiltration.

#### 1.3.5.2. Concentration discontinue

La concentration discontinue (CD) consiste à relier le bac d'alimentation au module de séparation avec un retour (recyclage) du rétentat au bac d'alimentation, en récoltant le perméat, comme schématisé par la *Figure 20*. Le volume du rétentat diminue au cours du procédé jusqu'à atteindre un volume critique ( $V_{crit}$ ). Le volume critique, ou « volume de travail minimal » est la quantité de fluide du rétentat nécessaire pour faire fonctionner le système au débit souhaité sans entraîner d'air (GE Healthcare 2014). Ce volume dépend de la conception du système (échelle laboratoire ou pilote industriel, réservoir d'alimentation, volume des tuyaux, volume nécessaire pour remplir le module de filtration) et varie de quelques millilitres à quelques litres (GE Healthcare 2008). L'avancement de ce procédé est caractérisé par le facteur de réduction volumique (*FRV*), exprimé par l'*Eq. 29*, avec  $V_0$  le volume initial à traiter et  $V_r$  le volume du rétentat à l'instant  $t$  (Muller *et al.* 1999):

$$FRV = \frac{V_0}{V_r} \quad Eq. 29$$

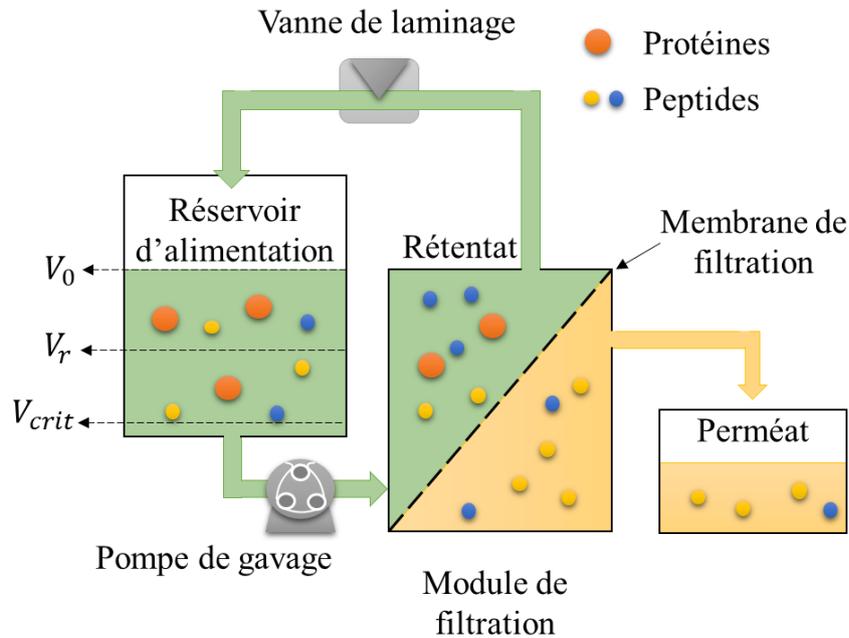


Figure 20 : Schématisation d'une installation fonctionnant en concentration discontinue pour la séparation des protéines et peptides. Adapté d'après (Aimar 2006).

Avec l'avancement de la séparation et de la diminution du volume du rétentat, la concentration de l'hydrolysate dans le rétentat sera de plus en plus élevée, diminuant considérablement le flux de perméat et par conséquent la productivité, la quantité de peptides sortis avec le perméat par unité de temps (Asbi & Cheryan 1992; GE Healthcare, Life Sciences 2011; Baldasso *et al.* 2011).

### 1.3.5.3. Diafiltration à volume constant

Le mode en diafiltration (DF) consiste à remplacer le volume qui s'est écoulé dans le perméat par le même volume en solution aqueuse (ou tampon) dans le rétentat (Figure 21). Le débit de la pompe de transfert est ainsi reproduit sur celui du perméat afin de maintenir le volume initial constant. L'avancement du procédé est alors caractérisé par un nombre de volumes d'eau équivalent au volume initial au rétentat, appelée nombre de diavolumes ( $DV$ ). Il est défini par l'Eq. 30, avec  $V_p$  le volume du perméat et  $V_0$  le volume initial. Pour un bilan de matière, le ratio ( $\alpha$ ) du débit d'eau ajoutée ( $Q_a$ ) sur le débit du gavage ( $Q_G$ ) est nécessaire (Eq. 31), en supposant  $Q_a = Q_p$ , le débit du perméat (Muller *et al.* 1999):

$$DV = \frac{V_p}{V_0} \quad \text{Eq. 30} \quad \alpha = \frac{Q_p}{Q_G} \quad \text{Eq. 31}$$

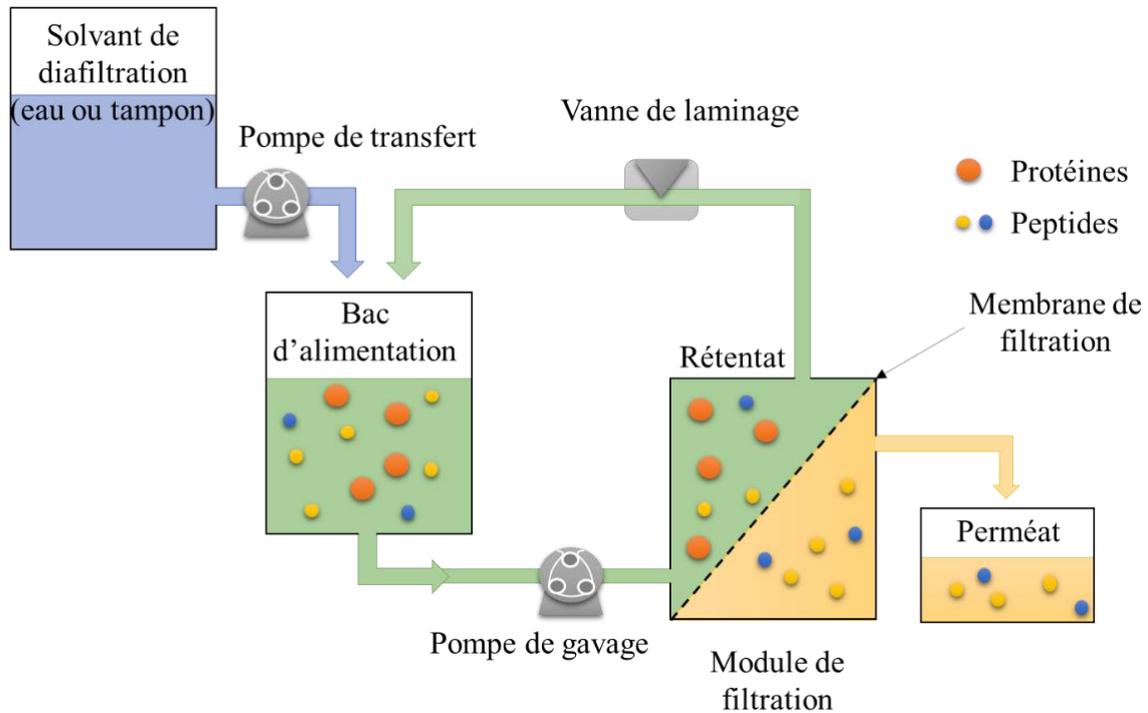


Figure 21 : Schématisation d'une installation fonctionnant en diafiltration pour la séparation des protéines et des peptides. Adapté d'après (Aimar 2006).

Dans ce mode de fonctionnement, le flux de perméat n'est généralement pas affecté et permet d'éliminer les microsolutés. En revanche, l'efficacité d'élimination du rétentat (ou d'enrichissement dans le perméat) dépend du nombre de diavolume et donc de la quantité d'eau utilisée, et non de la concentration en microsolutés (GE Healthcare, Life Sciences 2011). Ainsi, ce procédé engendre une consommation d'eau importante. De ce fait, il n'est pas rare de combiner les deux modes d'implémentation (CD et DF), en réduisant le volume du rétentat qui donne un flux de perméat acceptable, puis de garder ce volume constant en ajoutant de l'eau ou un tampon. Ce mode permet d'obtenir des performances supérieures qu'en CD seule, une consommation en eau plus faible qu'en DF seule et un volume de perméat à traiter convenable (Asbi & Cheryan 1992; Muller *et al.* 1999; Barba *et al.* 2001; Baldasso *et al.* 2011; Al-Mutwalli *et al.* 2020).

### 1.3.6. Suivi de performances

En fonction du but recherché par la séparation, différents critères peuvent être calculés à la fin de l'opération ou en faisant des prélèvements au cours du procédé. Le rendement (*Eq. 32* et *Eq. 33*), la concentration (*Eq. 34* et *Eq. 35*), la pureté (*Eq. 36* et *Eq. 37*) ou l'enrichissement (*Eq. 38* et *Eq. 39*) d'un soluté  $x$  peuvent être calculés dans le compartiment rétentat ou perméat.

Tableau 8 : Quelques formules de calculs de performances utilisées dans la littérature pour l'ultrafiltration d'hydrolysats protéiques (Muller et al. 1999; Chabeaud et al. 2009b; Kapel et al. 2011; Beaubier et al. 2021b).

Rétentat		Perméat	
$Rdm_{r,x} = \frac{m_{r,x}}{m_{0,x}}$	Eq. 32	$Rdm_{p,x} = \frac{m_{p,x}}{m_{0,x}}$	Eq. 33
$C_{r,x} = \frac{m_{r,x}}{V_r}$	Eq. 34	$C_{p,x} = \frac{m_{p,x}}{V_p}$	Eq. 35
$Pur_{r,x} = \frac{C_{r,x}}{\sum_{d=1}^f C_{r,f}}$	Eq. 36	$Pur_{p,x} = \frac{C_{p,x}}{\sum_{d=1}^f C_{p,f}}$	Eq. 37
$\tau_{r,x} = \frac{Pur_{r,x}}{Pur_{0,x}}$	Eq. 38	$\tau_{p,x} = \frac{Pur_{p,x}}{Pur_{0,x}}$	Eq. 39

La concentration en peptides totaux peut être suivie pour évaluer quantitativement le procédé en termes de peptides contenus dans le perméat (Muller *et al.* 1999; Chabeaud *et al.* 2009b; Kapel *et al.* 2011). Cette donnée permet par la suite de calculer des performances qualitatives qui caractérisent l'hydrolysate et le procédé, de manière à discriminer l'efficacité des différents procédés (montage pilote, membrane) (Chabeaud *et al.* 2009c; Arunkumar & Etzel 2014; Md Saleh *et al.* 2021; Song *et al.* 2021) et de les optimiser (Al-Mutwalli *et al.* 2020). La pureté est surtout recherchée pour un (des) composé(s) retenu(s) par la membrane par rapport aux autres molécules présentes dans le rétentat. Le but est donc d'avoir uniquement cette (ces) molécule(s) dans le rétentat et toutes les autres dans le perméat (Bourseau *et al.* 2009; Chabeaud *et al.* 2009b). L'enrichissement dans le perméat est recherché surtout pour un (des) peptide(s) identifié(s) et dont la (les) transmission(s) doit (doivent) être élevée(s) par rapport aux autres molécules non ciblées qui restent dans le rétentat (Beaubier *et al.* 2021b). Le rendement pour la (les) molécule(s) dans le rétentat indique leur rétention effective et donc leur conservation au cours du procédé (Chabeaud *et al.* 2009b; Ng *et al.* 2015). Le rendement pour la (les) molécule(s) dans le perméat indique la fraction des molécules d'intérêt transférées du rétentat et donc l'efficacité d'extraction du procédé en ces molécules ciblées (Muller *et al.* 1999).

### 1.3.7. Applications pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques

Les procédés de fractionnement permettent d'enrichir une fraction en un (ou plusieurs) peptide(s) cible(s) d'un hydrolysate, pour augmenter sa bioactivité. Plus encore, certains hydrolysats avec plusieurs fonctionnalités peuvent donner des fractions enrichies en chacune de ces activités. Par conséquent, cela peut amener à une valorisation supérieure des hydrolysats

protéiques aux propriétés ciblées (Gauthier & Pouliot 2003; Chabeaud *et al.* 2009b; Power *et al.* 2014). Le fractionnement par séparation membranaire est une méthode privilégiée pour des purifications ou enrichissements de molécules d'intérêt lorsqu'elles ont besoin de conditions douces. En effet, la séparation peut être réalisée à température ambiante et dans un tampon adéquat pour la stabilité des molécules, ce qui n'est pas le cas pour une chromatographie qui demande des solvants organiques (Agyei *et al.* 2016).

Le *Tableau 9* suivant, présente quelques exemples de fractionnements réalisés sur différentes sources protéiques hydrolysées par divers systèmes et l'impact engendré sur les bioactivités recherchées. Cette analyse montre qu'une amélioration des propriétés par un fractionnement n'est pas systématique, et dépend non seulement des caractéristiques de l'hydrolysat de départ (enzymes utilisées, conditions opératoires, répartition des masses molaires, présence déjà dans les protéines de la combinaison d'acides aminés favorables à une activité recherchée), mais également du criblage réalisé sur les membranes, notamment, sur les seuils de coupure qui donnent lieu à différentes populations peptidiques plus ou moins bioactives. Ces travaux de criblages en UF restent donc nécessaires, car ils permettent de définir les conditions à assembler pour ensuite produire à plus grande échelle les fractions d'intérêt.

Ainsi, la production des hydrolysats bioactifs a été basée principalement sur une méthodologie empirique, alors que les phénomènes membranaires ont été beaucoup étudiés avec des modélisations valides. Ces modélisations membranaires ont surtout été utilisées pour la prédiction du flux de perméat (Sulaiman *et al.* 2001), qui permettrait de calculer les autres performances générales, la rétention réelle (d'un composé, ou somme de composés) (Bhattacharjee & Datta 1997; Krippel *et al.* 2020), ou bien de faire une optimisation économique (durée, quantité d'eau consommée) (Paulen *et al.* 2011; Sharma *et al.* 2019). Or, l'objectif d'un fractionnement d'hydrolysat est de purifier ou d'enrichir une fraction d'intérêt (bioactive ou fonctionnelle). Certaines études ont réussi à le faire en modélisant la rétention de l'ensemble des solutés présents (Ahmad *et al.* 2006; Kapel *et al.* 2011; Beaubier *et al.* 2021b), mais ils ne représentent pas une généralité par rapport à la quantité d'hydrolysats disponibles avec leurs spécificités d'interactions membranaires.

Tableau 9 : Liste non-exhaustive de travaux réalisés sur le fractionnement d'hydrolysats dans l'optique de mettre en évidence ou d'améliorer leurs propriétés. Indications (si présentes dans l'article initial) de la (des) matrice(s) protéique(s) utilisée(s), des enzymes et des conditions opératoires de l'hydrolyse, du module de filtration (type, matériau, seuil de coupure) et des principaux résultats recueillis. N.D. = pas de données.

Matrice(s) protéique	Enzyme(s) – conditions hydrolyse	Module(s) de filtration	Propriété(s) mise(s) en évidence / améliorée(s) par rapport à l'hydrolysate	Référence
<b>Concentrat de protéines du petit lait (CPL) (34%) <math>\alpha</math>-La <math>\beta</math>-Lg</b>	Trypsine et/ou Chymotrypsine : $pH8 - 50^{\circ}C - 240 \text{ min}$ Pepsine : $pH3 - 50^{\circ}C - 1/330 - 240 \text{ min}$ PTN 3S : $pH8 - 50^{\circ}C - 1/330 - 120 \text{ min}$	UF cellule à agitation (cellulose) MWCO : 1-3-10 $kg.mol^{-1}$	Inhibition ACE augmentée pour les systèmes trypsine/CPL et trypsine/ $\beta$ -lg avec la fraction $< 3 \text{ kg.mol}^{-1}$ .	(Mullally <i>et al.</i> 1997)
<b><math>\alpha</math>-La <math>\beta</math>-Lg</b>	Pepsine : $pH2 - 37^{\circ}C - 1/200 - 3 \text{ h}$ Trypsine : $pH8 - 37^{\circ}C - 1/200 - 3 \text{ h}$ Pepsine (3 h) + Trypsine (7 h) Pepsine (3 h) + Trypsine (3 h) + Chymotrypsine (7 h)	UF (PS) MWCO : 30 $kg.mol^{-1}$ UF (cellulose) MWCO : 1 $kg.mol^{-1}$	Inhibition ACE améliorée par un facteur deux pour le fractionnement $< 1 \text{ kg.mol}^{-1}$ , trypsine/ $\beta$ -lg et par un facteur trois pour trypsine/ $\alpha$ -la. Les autres combinaisons sont aléatoires au niveau des activités améliorées ou non.	(Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> 2000)
<b><math>\beta</math>-Lg</b>	Trypsine ou Chymotrypsine : $pH8 - 42/45^{\circ}C - 1/200 - 45 \text{ min}$	UF (PS) MWCO : 30-1 $kg.mol^{-1}$	Amélioration des propriétés émulsifiantes pour les fractions 21-40 et 41-60.	(Gauthier & Pouliot 2003)
<b>Gluten de maïs</b>	Thermamyl 120L + Flavourzyme® : $pH6 - 80^{\circ}C - 3 \text{ h} - 1/100 +$ $pH7,5 - 50^{\circ}C - 1/100 - 8 \text{ h}$	UF cassette (PES) MWCO : 5-10 $kg.mol^{-1}$	Activité inhibition ACE multipliée par 3 pour la fraction $> 5 \text{ kg.mol}^{-1}$ . Propriétés émulsifiantes multipliées par deux voire trois pour des $pH$ entre 5 et 8. Stabilité nettement améliorée pour les fractions $< 5 \text{ kg.mol}^{-1}$ uniquement. Propriétés moussantes mise en évidence (10-60% de capacité selon $pH$ et fraction) et stabilités supérieures pour les fractions $> 10 \text{ kg.mol}^{-1}$ au $pH$ acide et fractions 5-10 $kg.mol^{-1}$ pour les $pH$ basiques.	(Kim <i>et al.</i> 2004)

Matrice(s) protéique	Enzyme(s) – conditions hydrolyse	Module(s) de filtration	Propriété(s) mise(s) en évidence / améliorée(s) par rapport à l'hydrolysate	Référence
<b>Hydrolysate de poisson commercial (Prolastin)</b>	N.D.	UF tubulaire (PES) MWCO : 4 kg.mol <sup>-1</sup> NF tubulaire (Polyamide/PES) MWCO : 300 g.mol <sup>-1</sup>	Activité du neuropeptide reliée au gène de la calcitonine (réduction risque d'ulcération) 10 fois supérieur après UF. Pas d'augmentation significative d'activité antioxydante, d'inhibition ACE et peptides apparentés aux hormones gastro-intestinales.	(Picot <i>et al.</i> 2010)
<b>Isolat protéique de graines de chanvre</b>	<i>In vitro</i> – Pepsine + Pancréatine : pH2 – 37°C – 1/25 – 2 h + pH7,5 – 37°C – 1/25 – 4 h	UF cellule à agitation (PS) MWCO : 1-3-5 kg.mol <sup>-1</sup>	Activité antiradicalaire augmentée de 15% à 20% pour toutes les fractions. Impact négatif du fractionnement sur la capacité chélatrice de métaux. Pas d'impact du fractionnement sur l'activité antioxydante.	(Girgih <i>et al.</i> 2011)
<b>Isolat protéique de colza</b>	Alcalase ou Thermoysine ou Flavourzyme® : pH8 – 50°C – 1/25 – 4 h Protéinase K : pH7,5 – 37°C – 1/25 – 4 h <i>In vitro</i> – Pepsine + Pancréatine : pH2 – 37°C – 1/25 – 2 h + pH7,5 – 37°C – 1/25 – 4 h	UF cellule à agitation (PS) MWCO : 1-3-5-10 kg.mol <sup>-1</sup>	Amélioration légère de l'activité antiradicalaire surtout pour les fractions 1 – 3 kg.mol <sup>-1</sup> quelle que soit l'enzyme. Amélioration activité chélatrice pour la fraction 5 – 10 kg.mol <sup>-1</sup> pour toutes les enzymes sauf la Thermoysine et la Flavourzyme. Activité antioxydante satisfaisante et stable jusqu'à 5 jours.	(He <i>et al.</i> 2013)
<b>Isolat protéique de colza</b>	Alcalase : pH8 – 60°C – 1/20 – 4 h Trypsine ou Chymotrypsine : pH8 – 37°C – 1/20 – 4 h Pepsine : pH3 – 37°C – 1/20 – 4 h Pancréatine : pH8 – 40°C – 1/20 – 4 h	UF cellule à agitation (PS) MWCO : 1-3-5-10 kg.mol <sup>-1</sup>	Légère amélioration activité radicalaire des fractions <1 kg.mol <sup>-1</sup> pour tous sauf l'Alcalase. Inhibition du radical superoxyde pour la fraction <1 kg.mol <sup>-1</sup> pepsine. Activité antioxydante remarquable sur 7 jours IPC/pepsine <1 kg.mol <sup>-1</sup> .	(Alashi <i>et al.</i> 2014a)

Matrice(s) protéique	Enzyme(s) – conditions hydrolyse	Module(s) de filtration	Propriété(s) mise(s) en évidence / améliorée(s) par rapport à l'hydrolysate	Référence
<b><i>β-Lg</i></b>	Trypsine : <i>pH</i> 8 – 37°C – 1/250 – 24 h	UF (PES) MWCO : 1-5 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> UF (cellulose) MWCO : 2 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup>	Activité antiradicalaire augmentée de 16% à 40%. Inhibition de DPP-IV améliorée de 20% à 30%. Inhibition ACE augmentée par deux que pour la fraction < 1 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> .	(Power <i>et al.</i> 2014)
<b>Extrait protéique du Ficus à feuilles en delta</b>	Trypsine : <i>pH</i> 8 – 50°C – 1/20 – 18 h	UF MWCO : 3-10-30-100 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup>	Activité antimicrobienne améliorée pour toutes les fractions (entre 20 et 85%) contre <i>P. aeruginosa</i> . Pas d'amélioration d'activité contre <i>E.Coli</i> . Amélioration pour les fractions <10 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> et <100 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> (20%) contre <i>S. aureus</i> . Activité antiradicalaire pour toutes les fractions.	(Abdullah <i>et al.</i> 2018)
<b>Isolat protéique de lin</b>	Thermolase® GL-30 : <i>pH</i> 8 – 37°C – 1/32-1/40 – 4 h	UF (PES) MWCO : 1-3-5-10 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup>	Légère amélioration activité antiradicalaire pour toutes les fractions. Faible apparition de l'activité de piégeage de superoxyde pour les fractions > 3 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> . Amélioration activité antiradicalaire hydroxyle pour la fraction 5 – 10 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> . Légère amélioration de chélation de métaux surtout pour la fraction 3 – 5 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> . Activité de chélation d'ions ferreux spécifique surtout pour la fraction > 1 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> .	(Nwachukwu & Aluko 2018)
<b>Protéines de son de riz</b>	<i>In vitro</i> – Pepsine + Trypsine : <i>pH</i> 1,5 – 37°C – 1/100 – 2 h + <i>pH</i> 8 – 37°C – 1/100 – 2 h	UF plane (cellulose) MWCO : 3-5-10 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup>	Amélioration des propriétés antiradicalaires dans toutes les fractions par un facteur quatre. Activité chélatrice de métaux améliorée par un facteur trois pour la fraction 3 – 5 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup> .	(Phongthai <i>et al.</i> 2018)
<b>Collagène (peaux de poissons)</b>	Hydrolyse physique haute température (150 – 250°C) – moyenne pression (350 – 3900 <i>kPa</i> ) – 10 min	UF cellule à agitation (PS) MWCO : 1-3-5-10 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup>	Activité antiradicalaire multipliée par 2 après fractionnement. Pas d'amélioration pour l'activité anti-âge générale. Seulement 20% d'amélioration de l'inhibition de la collagénase pour la fraction 5 – 10 <i>kg.mol</i> <sup>-1</sup>	(Park & Jo 2019)

Matrice(s) protéique	Enzyme(s) – conditions hydrolyse	Module(s) de filtration	Propriété(s) mise(s) en évidence / améliorée(s) par rapport à l'hydrolysats	Référence
<b>Collagène (co-produits calamar)</b>	Protéase XIV : <i>pH8 – 37°C – 1/500 – 30 min</i>	UF spirale (PS) MWCO : 5-10 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i>	Amélioration des propriétés antiradicalaire (15% à 40%) et antimutagènes (20% – 50%) pour toutes les fractions. Aucun impact sur l'activité antiproliférative.	(Suárez-Jiménez <i>et al.</i> 2019)
<b>Foie de porc</b>	Papaine : <i>pH6 – 37°C – 1/100 – 10 h</i> Bromélaïne : <i>pH6 – 40°C – 1/100 – 10 h</i> Alcalase : <i>pH8 – 50°C – 1/100 – 10 h</i>	UF (cellulose) MWCO : 5-10-30 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i>	Meilleure activité antiradicalaire pour l'Alcalase aux fractions 30 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i> et 10 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i> . Meilleure activité antibactérienne pour la Bromélaïne à la fraction 30 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i> .	(Borrajó <i>et al.</i> 2020)
<b>Hémoglobine bovine</b>	Pepsine : <i>pH3,5 – 23°C – 1/11 – 2,5 min / 10 min / 3 h / 24 h</i>	UF plane (cellulose) MWCO : 1-3 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i>	Enrichissement ciblé du peptide antimicrobien NTK. Conditions déterminées à <i>DH</i> 3%, <i>FRV</i> de 5 et 3 pour les membranes de 3 et 1 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i> respectivement. Pureté de 79%.	(Beaubier <i>et al.</i> 2021b)
<b>Crabes des Rocheuses fraîchement cueillis du Golfe Persique, congelés et pulvérisés</b>	Alcalase® 2,4L : <i>pH8,5 – 55°C – 1/50 – 3 h</i>	UF cellule à agitation MWCO : 3-10-30 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i>	Activité antiradicalaire améliorée jusqu'à fois deux pour les fractions <3 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i> et activité chélatrice de fer jusqu'à 3 fois pour la même fraction. Activité anticancer contre les cellules MCF-7 pour les fractions 3 – 10 et <3 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i> .	(Emadi Shaibani <i>et al.</i> 2021)
<b>Hémoglobine bovine</b>	Pepsine : <i>pH3,5 – 23°C – 1/11 – 2,5 min / 10 min / 3 h / 24 h</i>	Electrodialyse UF (PES) MWCO : 10 <i>kg.mol<sup>-1</sup></i> Récupération de cations	Récupération des peptides antimicrobiens TSKYR meilleur à <i>DH</i> 5%, car donne lieu à une grande proportion de peptides entre 500 et 1000 <i>g.mol<sup>-1</sup></i> .	(Przybylski <i>et al.</i> 2021)

### I.3.8. Modélisation de la séparation membranaire

#### I.3.8.1. Modélisation du flux de perméat

L'efficacité du procédé membranaire est directement liée au flux de matière et donc au flux de perméat. Par conséquent, les phénomènes influençant son évolution ont été beaucoup étudiés et ont donné deux modèles généraux de polarisation : la théorie du film et le modèle du gel.

L'augmentation de la concentration à la surface de la membrane ( $C_m$ ) est donc un équilibre entre les flux qui diffusent de part et d'autre de la membrane et de la couche limite. Cela conduit à une notion de flux de perméat en régime stationnaire déterminé par cet équilibre (théorie du film) :

$$J_{stat} = \frac{D}{\delta} \cdot \ln \left( \frac{C_m - C_p}{C_0 - C_p} \right) \quad Eq. 40$$

Avec le quotient  $D/\delta$ , le coefficient de diffusion du soluté et l'épaisseur de la couche limite de diffusion, qui est plus généralement noté  $k_{cl}$ , le coefficient de transfert de matière du soluté ( $m \cdot s^{-1}$ ). L'équation devient :

$$J_{stat} = k_{cl} \cdot \ln \left( \frac{C_m - C_p}{C_0 - C_p} \right) \quad Eq. 41$$

Si la concentration  $C_m$  à la membrane atteint la concentration de gel,  $C_g$ , le transfert n'est plus possible donc la concentration dans le perméat est nulle ( $C_p = 0$ ). Le flux stationnaire devient alors le flux limite et l'équation devient (modèle du gel) :

$$J_{lim} = k_{cl} \cdot \ln \left( \frac{C_g}{C_0} \right) \quad Eq. 42$$

Ainsi ces modèles mettent en évidence la proportionnalité entre  $J_{stat}$  ou  $J_{lim}$  et  $k_{cl}$ , et varient avec la vitesse tangentielle de la solution. Ils sont également indépendants des caractéristiques de la membrane et de la pression (Aimar *et al.* 2010b).

Ces modèles sont indispensables pour estimer le flux et donc la productivité des procédés, mais ils peuvent être compliqués à résoudre étant donné que la concentration à la membrane ne peut pas être mesurée directement (*cf.* §I.3.8.2.2 p.77 *EB*). A ces modèles, on peut ajouter le modèle en série (*Eq. 43*), le modèle osmotique (*Eq. 45*) et le modèle hybride (*Eq. 46*) (Poddar *et al.* 1999). Le terme osmotique est lié à une possible contre-pression osmotique qui réduit l'effet de la *PTM* appliquée. Le modèle indique que si la *PTM* est égale à  $\Delta\Pi$  (différence de pression osmotique entre le rétentat concentré et le perméat dilué), les forces s'annulent et donc

il n'y a plus de flux. Et si la  $PTM$  est supérieure, nous serons dans le cas d'une osmose inverse (Aimar *et al.* 2010a). Le modèle des résistances en série vient de la loi de Darcy (Eq. 26 p.55) en remplaçant le terme de perméabilité ( $L_p$ ) par son inverse, la résistance intrinsèque de la membrane ( $Res_m$ ) (Eq. 43) qui est le facteur qui limite le flux. Ensuite, à cette résistance s'ajoutent les résistances liées à la couche de polarisation et/ou à l'encrassement ou encore de la couche adsorbée ( $\sum Res$  ou  $Res_{pl}$ ,  $Res_{encr}$  et  $Res_{ads}$ ), qui restreignent d'autant plus  $J_{flux}$  (Jönsson & Trägårdh 1990; Persson & Nilsson 1991; Aimar 2006).

$$L_p = \frac{1}{Res_m} \quad Eq. 43$$

$$\Leftrightarrow J_{flux} = \frac{PTM}{\mu \cdot (Res_m + \sum Res)} \quad Eq. 44$$

$$\Leftrightarrow J_{flux} = \frac{PTM - \Delta\Pi}{\mu \cdot Res_m} \quad Eq. 45$$

$$\Leftrightarrow J_{flux} = \frac{PTM - \Delta\Pi}{\mu \cdot (Res_m + \sum Res)} \quad Eq. 46$$

La **Figure 22** résume les différences de flux induites par ces phénomènes de résistance. Dans le cas de l'eau pure (**Figure 22 ①**), le flux de perméat est proportionnel à la  $PTM$ . Pour une eau avec des solutés, le flux augmente linéairement jusqu'à un flux critique ( $J_{crit}$ ) (**Figure 22 ②**) en dessous duquel la polarisation de concentration est réversible si l'on diminue la  $PTM$ . Au delà de cette valeur, l'effet s'accroît vers un encrassement (voire un colmatage) qui est irréversible et ne permet pas de revenir au  $J_{flux}$  initial en diminuant la  $PTM$  (**Figure 22 ③**).

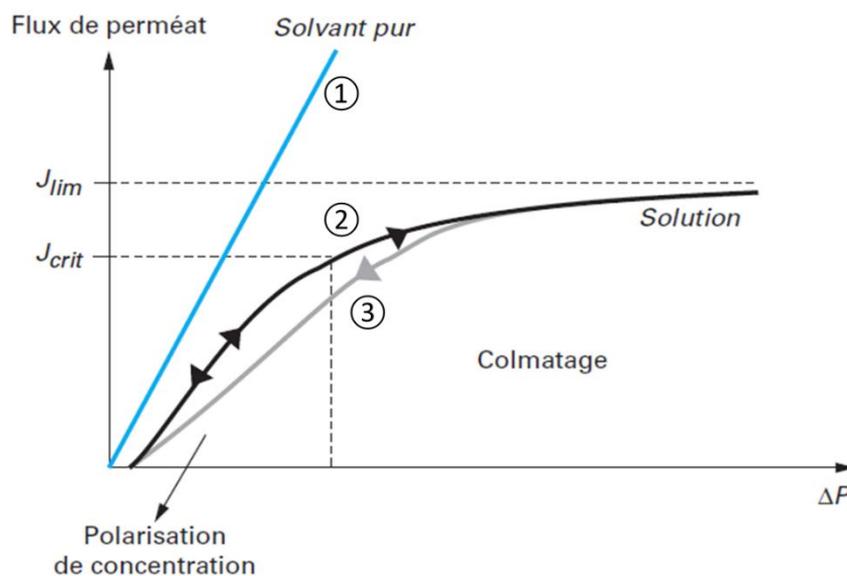


Figure 22 : Schématisation de l'effet de polarisation et du colmatage sur le flux du perméat en fonction de la  $PTM$  (Aimar *et al.* 2010b).

Ces modèles (*Eq. 43, Eq. 44, Eq. 45, Eq. 46* p.74) permettent alors de déterminer ces résistances, car contrairement à la résistance intrinsèque de la membrane, la polarisation et l'encrassement varient au fur et à mesure du procédé. Ces phénomènes peuvent être estimés après une première mise en œuvre en relevant les flux en eau (avant lavage), qui donneront la valeur de l'ensemble des résistances et dont la résistance intrinsèque devrait être enlevée, ou bien cela peut être en faisant des régressions sur les modèles choisis avec des constantes à déterminer en fonction du temps ou de la concentration fixées (ou tout autre paramètre notoire) et du flux de perméat relevé (Yeh *et al.* 2000, 2003; Wang *et al.* 2009; Barjoveanu & Teodosiu 2010; Quezada *et al.* 2021). Le but final étant de pouvoir prédire le comportement du flux en fonction de ces paramètres et/ou en fonction du temps.

### I.3.8.2. Modélisation de la concentration des constituants d'un mélange en UF

Pour déterminer les performances d'un procédé UF, il est possible de modéliser la concentration de chaque constituant dans chaque compartiment en fonction du temps. Pour cela, il faut connaître les concentrations initiales et les valeurs de rétention (ou transmission) de chaque constituant. La concentration initiale est facilement obtenue par CLHP-ES. La rétention peut être réelle ou observée, en fonction de l'importance des phénomènes à la surface membranaire.

#### I.3.8.2.1. Rétention observée

Avec tous les phénomènes agissants au cours de la filtration (électrostaticité, rétro-diffusion, polarisation, interactions de surface, encrassement), la loi de Ferry (*Eq. 28* p.56) n'est pas la plus adaptée pour évaluer la rétention de chaque composé pour des mélanges complexes tels que les hydrolysats protéiques (Cherkasov 1990). Ainsi, dans la littérature les courbes de tamisage (étalonnage de la sélectivité de la membrane) sont de plus en plus réalisées directement avec l'hydrolysate avant l'implémentation finale, afin d'évaluer en amont si les performances de purification ou d'enrichissement en molécules d'intérêt ciblées de l'hydrolysate seront satisfaisantes (Bourseau *et al.* 2009; Chabeaud *et al.* 2009c; Kapel *et al.* 2011). Pour cela, l'hydrolysate est filtré dans le système mis en place en recirculation totale du rétentat et du perméat, qui sont redirigés dans le réservoir d'alimentation. La concentration des composants de l'hydrolysate est mesurée dans le rétentat et dans le perméat, par CLHP-ES. Cette méthode a, en effet, été proposée comme un moyen d'étalonnage universel pour les membranes d'ultrafiltration, car elle permet de séparer les molécules en fonction de leur rayon hydrodynamique, ce qui est plus précis qu'en fonction de la masse molaire en poids réel ou par

le rayon de Stokes (Cherkasov 1990; Aimar & Meireles 2010). De cette manière, la rétention observée  $R_{obs}$  pour chaque molécule  $x$  présente, est calculée grâce à l'Eq. 47. La transmission ( $Tr_{obs}$ ) est une autre approche qui calcule le transfert des peptides (Eq. 48), et est l'opposé de la rétention. L'une ou l'autre des méthodes peut être utilisées pour caractériser la sélectivité des membranes.

$$\begin{array}{l} \text{Rétention} \\ \text{observée} \end{array} \quad R_{obs,x} = 1 - \frac{C_{p,x}}{C_{r,x}} \quad \text{Eq. 47}$$

$$\begin{array}{l} \text{Transmission} \\ \text{observée} \end{array} \quad Tr_{obs,x} = \frac{C_{p,x}}{C_{r,x}} \quad \text{Eq. 48}$$

La valeur de la rétention (ou de la transmission) permet ainsi de déterminer la concentration du soluté dans le perméat en fonction de la concentration dans le rétentat, pour un fonctionnement en concentration discontinue ou en diafiltration, grâce aux équations de bilan de matière qui expriment les concentrations (Eq. 49 et Eq. 50) et les volumes (Eq. 31 p.65, Eq. 51 et Eq. 52) dans les deux compartiments en fonction du temps, par l'intermédiaire du débit de perméat ( $Q_p$ ).

$$\begin{array}{l} \text{Concentration} \\ \text{rétentat} \end{array} \quad \frac{dC_{r,x}}{dt} = \frac{C_{r,x}}{V_r} \cdot Q_p \cdot (R_{obs,x} - \alpha) \quad \text{Eq. 49}$$

$$\begin{array}{l} \text{Concentration} \\ \text{Perméat} \end{array} \quad \frac{dC_{p,x}}{dt} = \frac{Q_p \cdot (C_{r,x} \cdot (1 - R_{obs,x}) - C_{p,x})}{V_p} \quad \text{Eq. 50}$$

$$\begin{array}{l} \text{Variation} \\ \text{volume rétentat} \end{array} \quad \frac{dV_r}{dt} = Q_p \cdot (\alpha - 1) \quad \text{Eq. 51}$$

$$\begin{array}{l} \text{Variation} \\ \text{volume perméat} \end{array} \quad \frac{dV_p}{dt} = Q_p \quad \text{Eq. 52}$$

Ainsi, cette méthode a été appliquée avec succès pour différentes modélisations de séparation avec des hydrolysats de lactosérum, poisson et hémoglobine bovine (Chabeaud *et al.* 2009b; Kapel *et al.* 2011; Bodin 2016; Beaubier *et al.* 2021b). Ces modélisations peuvent prédire les évolutions de concentrations ou des critères de performances (*cf.* **Tableau 8** p.67) dans les deux compartiments sur base de chromatogramme d'exclusion stérique entier, représentatif de toutes les masses molaires présentes dans l'hydrolysate.

Ces équations peuvent également s'écrire de manière analytique en fonction de *FRV* (Eq. 29 p.64), de *DV* (Eq. 30 p.65) et la concentration initiale (Muller *et al.* 1999) :

$$\text{Rétentat CD} \quad C_{r,x} = C_{0,x} \cdot FRV^{R_{obs,x}} \quad \text{Eq. 53}$$

$$\text{Perméat CD} \quad C_{p,x} = C_{0,x} \cdot \frac{FRV - FRV^{R_{obs,x}}}{FRV - 1} \quad \text{Eq. 54}$$

$$\text{Rétentat DV} \quad C_{r,x} = C_{0,x} \cdot e^{(R_{obs,x}-1) \cdot DV} \quad \text{Eq. 55}$$

$$\text{Perméat DV} \quad C_{p,x} = C_{0,x} \cdot \frac{1 - e^{(R_{obs,x}-1) \cdot DV}}{DV} \quad \text{Eq. 56}$$

### 1.3.8.2.2. Rétention réelle

Ces modèles, utilisant la rétention observée, s'appliquent pour la séparation d'hydrolysats n'entraînant pas de phénomène de polarisation important, ce qui permet de supposer qu'il n'y a pas de gradient de concentration, et la concentration à la membrane est égale à celle dans le réservoir du rétentat (Muller *et al.* 1999). Autrement, la méthodologie la plus répandue et valable pour de nombreux solutés (sels, mono- et polysaccharides, PEG, lignine, protéines pures et issues de co-produits industriels) consistait à utiliser la théorie du film (Bhattacharjee & Bhattacharya 1992; Bhattacharjee *et al.* 1996; Combe *et al.* 1997; Ahmad *et al.* 2006; Kuhn *et al.* 2010), sans laquelle la prédiction des performances serait toujours surestimée (Sulaiman *et al.* 2001). La modélisation prend en compte le phénomène de concentration de polarisation avec la concentration à la membrane, pour intégrer la rétention réelle  $R_{réel}$  au bilan de matière, telle que définie dans l'Eq. 57 :

$$\text{Rétention réelle} \quad R_{réel,x} = 1 - \frac{C_{p,x}}{C_{m,x}} \quad \text{Eq. 57}$$

Cependant, cette concentration  $C_m$  ne peut être mesurée directement et nécessite des expériences complémentaires ou de chercher des modèles d'approximation correctes ou bien de se référer à la littérature et trouver des auteurs qui ont fait ce travail. En général, le modèle de polarisation de concentration (Eq. 41 p.73) ou du gel (Eq. 42 p.73) sont pris en considération pour estimer la concentration à la membrane ( $C_m$ ) et le coefficient de transfert de matière ( $k_{cl}$ ), voire directement  $R_{réel}$  (Zydney 1997; Yeh *et al.* 1998; Paulen *et al.* 2011; Bakhshayeshi *et al.* 2012). Pour cela, il est possible de faire une régression sur un modèle choisi (polynomial, puissance, *etc.*) ou faire des estimations par des techniques itératives. Ces estimations donnent les valeurs des variables recherchées qui correspondent à la résolution du modèle de polarisation (Bhattacharjee & Datta 1996; Poddar *et al.* 1999; Kuhn *et al.* 2010; Sarkar *et al.* 2011; Oueslati *et al.* 2015).

Une autre manière, plus traditionnelle, est de linéariser l'Eq. 41 (p.73) en Eq. 58 après avoir remplacé  $C_r$  et  $C_m$  par  $R_{obs}$  et  $R_{réel}$  :

$$\ln\left(\frac{1 - R_{obs}}{R_{obs}}\right) = \ln\left(\frac{1 - R_{réel}}{R_{réel}}\right) + \left(\frac{J_{flux}}{U^\alpha}\right) \quad \text{Eq. 58}$$

Cela implique donc de faire des expériences où il faut varier le débit d'alimentation/gavage (ou la  $PTM$ ) et de relever les flux de perméat et les concentrations pour tracer une relation linéaire entre  $J_{flux}$  et  $R_{obs}$  (Nakao & Kimura 1981; Aimar 2006; Causserand 2006; Aimar *et al.* 2010a) :

$$f(J_{flux}) = \ln\left(\frac{1 - R_{obs}}{R_{obs}}\right) \quad \text{Eq. 59}$$

Cette relation linéaire ( $f(x) = ax + b$ ) permet de déterminer que :

$$a = \frac{1}{U^\alpha} = \frac{1}{k_{cl}} \quad \text{Eq. 60}$$

$$b = \ln\left(\frac{1 - R_{réel}}{R_{réel}}\right) \quad \text{Eq. 61}$$

Le transfert de matière  $k_{cl}$  est, en effet, approximé par  $U^\alpha$ , qui n'est pas la vitesse de recirculation du fluide fixée par la pompe d'alimentation/gavage, mais la vitesse moyenne du fluide de recirculation dans le module de filtration. Le coefficient  $\alpha$  est souvent pris égal à  $\pm 0,8$  (Nakao & Kimura 1981), mais il peut aussi être ajusté aux données expérimentales qui donnent la meilleure corrélation (Ahmad *et al.* 2006).

Enfin, des corrélations ont été établies pour le coefficient transfert de matière en fonction du nombre de Sherwood, ce dernier étant déterminé expérimentalement en fonction de la géométrie et du régime d'écoulement, laminaire (Eq. 62) ou turbulent (Eq. 63). Si des auteurs ont travaillé sur des modules similaires, ces valeurs peuvent être utilisées en première approximation ou pour valider la modélisation par l'expérimentation de sa propre installation (Aimar *et al.* 2010a; Aguirre Montesdeoca *et al.* 2016) :

$$\text{Régime laminaire} \quad \frac{k_{cl} \cdot d_h}{D} = Sh = \alpha_1 \cdot \left(Re \cdot \frac{d_h}{L}\right)^{\alpha_2} \cdot Sc^{\alpha_3} \quad \text{Eq. 62}$$

$$\text{Régime turbulent} \quad \frac{k_{cl} \cdot d_h}{D} = Sh = 0,023 \cdot (Re)^{\alpha_1} \cdot Sc^{\alpha_2} \quad \text{Eq. 63}$$

Les coefficients  $\alpha_x$  dépendent des géométries des modules de filtrations utilisés.

En résumé, le **fractionnement membranaire** d'hydrolysats présente de nombreux **avantages** tant pour sa **mise en œuvre** (conditions douces, pas de solvants organiques, facilement couplé à d'autres procédés) que sa **polyvalence** (géométrie, matériaux, sélectivité), et surtout pour son **rendement élevé**, ce qui rend le procédé **économiquement intéressant**.

Au cours du procédé, des phénomènes de **polarisation de concentration** et d'**encrassement** diminuent la productivité en **augmentant la résistance** par la rétro-diffusion et le blocage des pores. Ces phénomènes sont dépendants des **conditions opératoires** (mode d'implémentation, *PTM*, vitesse de recirculation, concentration initiale) qui peuvent être modulées afin de diminuer leurs **impacts sur le flux de perméat**. De plus, ces phénomènes peuvent être modélisés par des **modèles mécanistiques** et **bilan de matière**, pour prédire les performances en fonction du **flux de perméat** et de la **rétenion**, ce qui permettrait de déterminer les **meilleures conditions** de mise en œuvre.

De nombreux fractionnements membranaires d'hydrolysats protéiques ont été réalisés pour **améliorer leur fonctionnalité**. Cependant, dû à la complexité d'un mélange peptidique, qui a de nombreux solutés, très peu d'études ont intégré une méthodologie de fractionnement précise avec une **modélisation de composition des rétentat et perméat entiers**.

## I.4. Réacteurs enzymatiques à membrane

### I.4.1. Généralités

#### I.4.1.1. Principe et intérêts

Un procédé de protéolyse en continu consiste à ajouter en permanence le substrat (protéines) tout en retirant le produit de l'hydrolyse (peptides) et en gardant la même quantité d'enzyme pendant tout le procédé, c'est le recyclage. Pour permettre cela, il faut rajouter un module de séparation, comme une membrane qui permet de retenir les enzymes et les protéines du côté de la réaction, tout en laissant passer les peptides. Le montage est analogue à la diafiltration, excepté la solution d'ajout qui contient le substrat cette fois-ci (*Figure 23*). Cette combinaison technologique est simple, car c'est un réacteur traditionnel à cuve agitée en continu (CSTR) couplé à une unité de séparation. Cette configuration est dite « à boucle externe », « en recirculation » ou « flux latéral ». L'inconvénient est le volume mort (pompe, tuyaux) et le taux de cisaillement qui doit être adapté à la biomasse ou aux enzymes, ainsi qu'une consommation énergétique élevée des pompes externes (Aimar & Daufin 2004). Cependant, cela n'a pas empêché le développement de ces réacteurs enzymatiques à membrane (REM) depuis les années 1970 pour diminuer la consommation d'enzymes et donc les coûts de mise en œuvre discontinu des réactions enzymatiques dans les domaines de technologies vertes et industrielle (Bouhallab & Touzé 1995; Mišún *et al.* 2008).

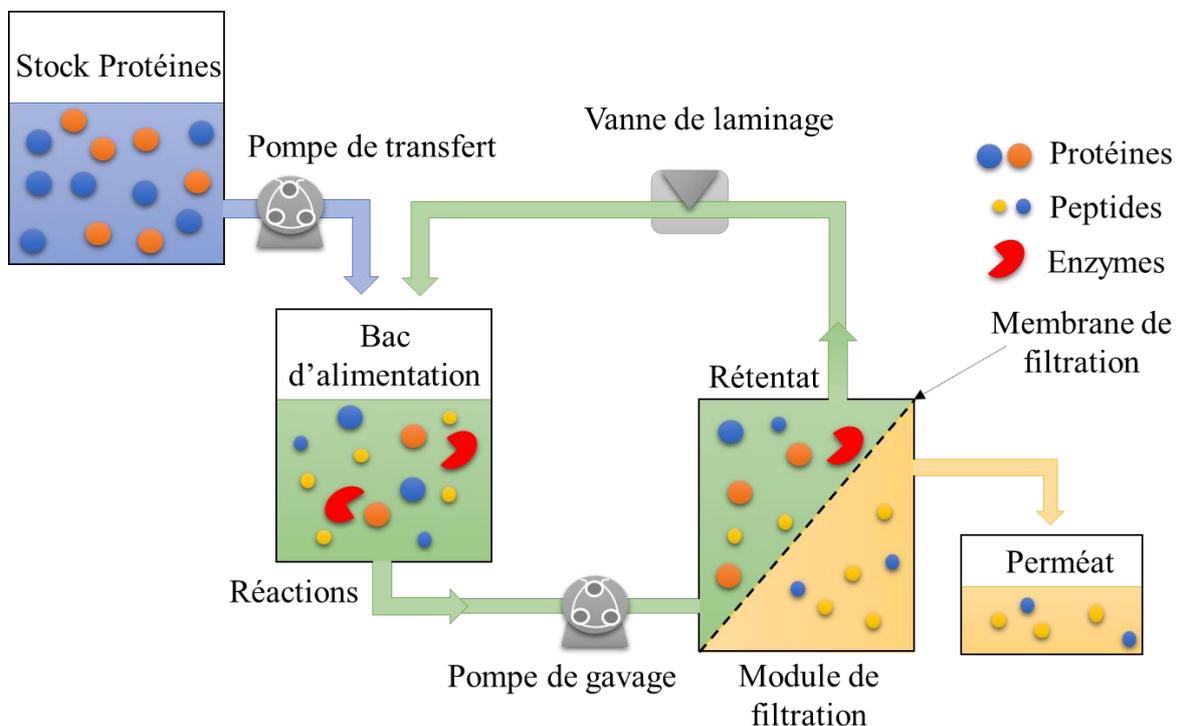


Figure 23 : Illustration d'un réacteur enzymatique à membrane en flux latéral pour la protéolyse continue.

Les avantages des REM sont nombreux (Prazeres & Cabral 1994; Rios *et al.* 2004; Plumb 2005; Korhonen & Pihlanto 2006; Cole & Johnson 2018) :

- ✓ Deux procédés intégrés en un seul, ce qui permet un gain de temps.
- ✓ Productivité et rendement augmentés en retenant l'enzyme, ce qui étend son activité dans le temps.
- ✓ Contrôle des propriétés des produits par la spécificité de l'enzyme et de la sélectivité de la membrane, ce qui déplace aussi l'équilibre réactionnel (Adje *et al.* 2013; Beaubier *et al.* 2021a).
- ✓ Inhibition diminuée de l'enzyme, car les produits sont transférés dans le perméat.
- ✓ Produit final purifié sans enzymes et sans substrat (si perméat récupéré).
- ✓ Volumes des cuves d'alimentation raisonnables pour une production équivalente en *batch*, ce qui diminue le risque d'accidents (inondation, chute, écrasement) et plus économique en développement (deux *batch* de 10 000 L remplacés par une installation en continu de 16 L (Bodmann & Marti 2015)).
- ✓ Plus de facilité à mettre en œuvre plusieurs unités du même procédé continu avec un volume raisonnable qu'une unité d'un procédé *batch* au volume élevé, ce qui permet en gain de plusieurs mois/année de la phase de développement pour une commercialisation plus rapide.
- ✓ Production stabilisée (qualité uniforme) nécessitant cependant d'atteindre l'état stationnaire tant au niveau de l'hydrolyse, qu'au niveau de la séparation.
- ✓ Réduction de la quantité de produits chimiques à utiliser, ce qui est lié aux avantages des membranes.

Ces avantages sont accompagnés de l'inconvénient aussi inhérent aux membranes, l'encrassement/colmatage, dont s'en suit une diminution de flux de perméat. De plus, la couche de polarisation implique une hétérogénéité de concentration et ainsi de réaction, entre la surface de la membrane et le réservoir d'alimentation. Enfin, l'enzyme perd de son activité au cours du temps, ce qui est dû à une dénaturation thermique, des forces de cisaillement, l'adsorption par la membrane, *etc.* (Prazeres & Cabral 1994; Paolucci-Jeanjean *et al.* 2001). Cependant, ces problèmes n'entravent pas la prévalence des performances des REM sur les classiques *batch*-séparation. Ainsi, le plus limitant serait l'encrassement de la membrane, dont les paramètres de fonctionnement devraient être réfléchis pour le retarder ou développer un cycle de lavage efficace, comme il est de rigueur pour les membranes (*cf.* §I.3.4.2 p.62 *EB*).

Toutefois, la mise en œuvre de procédés en continu n'est pas autant utilisée que les opérations discontinues, car le bénéfice (productivité élevée et économie d'énergie) doit être largement supérieur au coût de l'implémentation (durée du développement, ressources mobilisées, nouvelle technologie à appréhender, *etc.*) (Plumb 2005; Cole & Johnson 2018). Par exemple, si un procédé en *batch* permet de faire une quantité suffisante de produit, un changement de méthode de production n'est pas nécessaire. D'autre part, un procédé continu ne s'appliquerait pas à un produit dont l'exploitation exclusive est de courte durée, comme le brevet, dont la protection est effective pendant 20 ans, mais qui n'est pas suffisante pour le retour sur l'investissement employé pour le développement et la commercialisation (Plumb 2005). Enfin, l'apprentissage de nouveaux concepts demande du temps de l'investissement qui n'est pas en faveur du procédé continu. Notamment, les compétences nécessaires regroupent le génie chimique, mécanique, la chimie analytique avancée, l'automatisation et la modélisation des processus. Si un procédé est amené à durer longtemps, le processus devra être sous un contrôle constant afin de garantir la stabilité et de détecter d'éventuels problèmes. Cela comprend notamment le contrôle précis des débits massiques et des produits, requérant des systèmes supplémentaires d'automatisation et de contrôle des processus et des technologies de suivi analytique en ligne de procédé (rétroaction des débitmètres massiques, sondes de température, transmetteurs de pression, capteurs de niveau, spectroscopie infrarouge, CLHP, *etc.*) (Plumb 2005; Cole & Johnson 2018).

Néanmoins, en ce qui concerne les hydrolysats protéiques, qui présentent un très haut potentiel pour des applications diverses et variées (*Tableau 9* p.69), il y aurait un fort intérêt à implémenter directement un procédé continu avec une séparation intégrée. En effet, la quantité de peptides bioactifs peut être de l'ordre de moins de 5% sur les peptides totaux de l'hydrolysat, ce qui est très faible par rapport à l'énergie dépensée. En effet, il faudrait au moins deux opérations à la suite avec leur temps de mise en œuvre et d'arrêt, la production et la séparation, ce qui se répercuterait sur un coût final très élevé (*cf. §I.2.2* p.39 *EB*).

#### 1.4.1.2. Classifications des réacteurs

La classification des réacteurs membranaires peut se faire de différentes manières et ressemble un peu à la classification des modules de filtration, avec en plus l'ajout de la fonction et de la nature des catalyseurs (*Figure 24* p.84). Un premier niveau est basé sur la fonction de transport de la membrane : extracteur, distributeur et contacteur. L'action d'extracteur dans le perméat de la membrane d'un ou plusieurs produits permet l'amélioration de la conversion et/ou de la sélectivité des réactants encore présents dans le rétentat. C'est le cas typique des

productions continues des peptides d'intérêt. Le fonctionnement comme un distributeur est décrit comme dosant les réactifs par leur diffusion du rétentat dans le perméat où la réaction sera faite. Cela augmente la sélectivité des réactions cinétiquement contrôlées telles que l'hydrogénation et l'oxydation (Fontanova & Drioli 2010). La configuration de contacteur permet le contact entre les réactifs dans des phases immiscibles. Cela élimine le besoin d'un solvant commun et permet un contrôle actif de la concentration des réactifs à proximité des sites catalytiques. Ce système est développé surtout pour l'oxydation des composés dissous dans l'eau afin de réduire la demande chimique en oxygène et en carbone organique total dans les eaux usées industrielles (Iojoiu *et al.* 2006).

Vient ensuite la nature du matériau membranaire (organique ou inorganique), puis le rôle de la membrane dans le processus catalytique. Si la membrane est elle-même catalytiquement active, le réacteur est indiqué comme « réacteur à membrane catalytique » (RMC). Les enzymes peuvent être soit prises au piège dans la membrane (en trempant la membrane dans la solution d'enzymes ou en réalisant un cycle d'ultrafiltration), soit gélifiées sur la membrane (en enrobant préalablement les enzymes dans des polymères gélifiants), soit liées à la membrane par différents mécanismes : l'adsorption physique (forces de van de Waals, électrostatiques et liaison hydrogènes), liaison ionique, liaison covalente (nécessite de recouvrir la surface et les pores de la membranes de groupes actifs (amino, hydroly, carboxy, azido, *etc.*) par des méthodes chimiques, induction d'ultraviolets, *etc.*), ou réticulation (par application d'agents bifonctionnels) (Drioli & Giorno 2010; Cen *et al.* 2019). Si la fixation des enzymes à un support peut les rendre plus stables, elle peut présenter certains désavantages conséquents : avant de procéder à la réaction à proprement parler, il faut réaliser cette transformation et cela comprend plusieurs étapes et donc du temps et des composants chimiques en plus, ce qui se répercute sur le coût total. De plus, la fixation peut rendre *a contrario* certaines enzymes instables voire inactives. De ce fait, il faudrait optimiser déjà le procédé d'activation de la membrane et trouver une enzyme compatible, ce qui rajoute des étapes de développement qu'il faut être capable d'assurer (Rios *et al.* 2004; Rodrigues *et al.* 2013).

Alternativement, si la membrane n'assure qu'une fonction de séparation et que le catalyseur est en solution, en configuration « enzyme libre », « lit fixe » ou « lit fluidisé », le système est désigné comme réacteur inerte ou assisté par membrane et est appelé simplement « réacteur enzymatique à membrane » (REM). Enfin, la nature du catalyseur, biologique ou artificiel, termine la caractérisation (Fontanova & Drioli 2010).

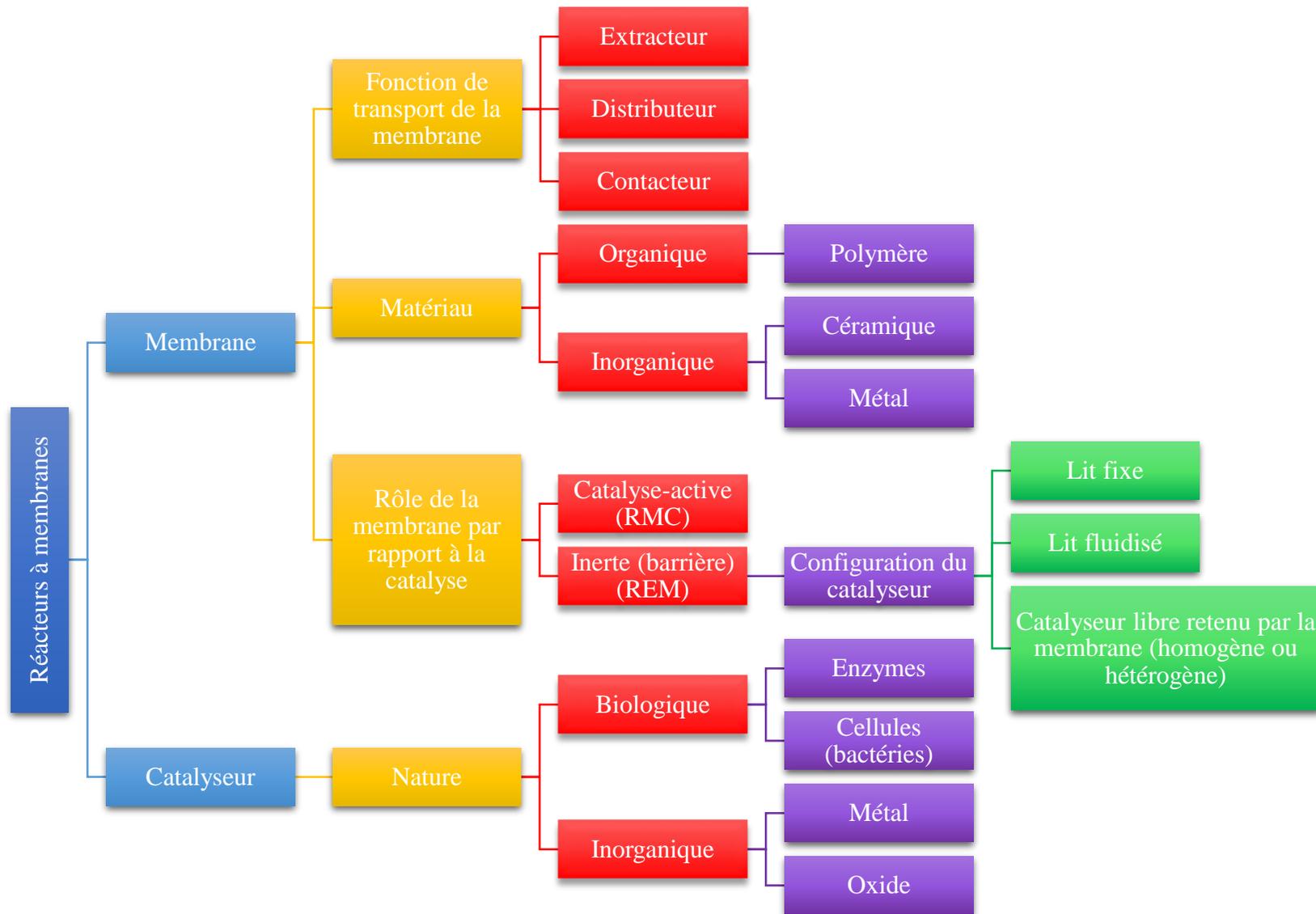


Figure 24 : Classification des réacteurs à membrane par la fonctionnalité de leurs composants. Adapté de (Fontanova & Drioli 2010).

### I.4.2. Applications des REM

Les développements en continu des REM ont abouti tout de même à un certain nombre d'applications pour des grands biopolymères comme l'amidon (Kędziora *et al.* 2006), la cellulose (Bélafi-Bakó *et al.* 2006), la chitine (Kuroiwa *et al.* 2009) et les protéines (Trusek-Holownia 2008).

La valorisation des co-produits de la mer est une filière en très fort accroissement pour la production par exemple des chitooligosaccharides (COS) à partir du chitosan. Les COS ont aussi des activités biologiques et sont utilisées comme compléments alimentaires en capteurs de graisses (Ylitalo *et al.* 2002), nanofibres dans des applications biomédicales (Jayakumar *et al.* 2010) ou encore en biostimulants de défenses végétales (van Aubel *et al.* 2016). Un dispositif continu avec des enzymes immobilisées et des membranes aux différents seuils de coupure a permis, d'une part, de produire des COS avec des longues chaînes, ce qui est limitant dans un mode discontinu, et d'autres part, d'avoir différentes fractions aux différentes tailles de COS ciblées qui pourrait être utilisée sans d'autres étapes d'hydrolyse ou de purification (Jeon & Kim 2000).

La lignocellulose est la biomasse la plus abondante avec  $2,0 \times 10^{11}$  de tonnes disponibles par an. Elle est notamment utilisée pour la production de bioéthanol à partir de co-produits des filières végétales. Le bioéthanol est produit à partir du glucose, fermentation alcoolique. Au préalable, une hydrolyse de la cellulose est nécessaire pour rendre disponible le glucose. Cette étape n'est plus limitante avec une hydrolyse en continu de la cellulose (Stickel *et al.* 2018; Lischeske & Stickel 2019; Al-Mardeai *et al.* 2022a, b).

L'hydrolyse de l'amidon est une méthode développée depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle (à partir du maïs, patate douce, blé ou riz) pour produire du sirop de glucose ou de maltose, produit très utilisé en cuisine pour les pâtisseries (Sarbatly & England 2004). Hydrolyse exclusivement acide et en *batch* au départ, la biocatalyse continue a permis d'améliorer la qualité et la conformité des sirops avec des degrés DE (dextrose équivalents) contrôlables et stables (Sims & Cheryan 1992; Woo & McCord 1994; Bayramoğlu *et al.* 2004).

En industrie agroalimentaire, l'application des REM se trouve surtout dans la production d'alcool (boissons alcoolisées), l'hydrolyse de pectines (clarification des jus de fruits et vins), l'hydrolyse des lipides (émulsifiants, principes actifs) ou encore la production d'additifs alimentaires (L-acide malique). L'hydrolyse des matières protéiques concerne le traitement du lait, pour le rendre digestible par l'être humain, pour l'alimentation infantile (hydrolyse du

lactose et des caséines) et pour attendrir la viande (Giorno & Drioli 2000). Ces applications peuvent être largement étendues comme le montrent de nombreuses recherches, résumées dans le *Tableau 10*. Ainsi, les REM permettent d'avoir un contrôle sur les performances de l'hydrolyse protéique, les peptides produits et la sélectivité, aboutissant à des intérêts applicatifs en adéquation avec les attentes de responsabilité écologique des consommateurs et des objectifs économiques des industriels.

Tableau 10 : Liste non-exhaustive de développements de REM réalisés pour l'hydrolyse continue des protéines. Indications (si mentionnées dans l'article initial) de la (des) matrice(s) protéique(s) utilisée(s), des enzymes et des conditions opératoires de l'hydrolyse continue, du module de filtration (type, matériau, seuil de coupure), des paramètres de soutirage (volume du rétentat, flux du perméat) et des principaux résultats recueillis.

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblé(s)	Référence
<b>Caséine</b>	Alcalase : pH 8,8 – 40-50°C – 1/100 – 120-150 h Pré-hydrolyse 5 h Enzyme libre et stabilisée par glutaraldéhyde.	UF cellule agitée (PS) MWCO : 30 kg.mol <sup>-1</sup> V <sub>r</sub> = 300 mL J <sub>flux</sub> constant et variable	Rétention meilleure de l'enzyme stabilisée. Perte d'activité enzymatique d'environ 50% au bout de 24 h pour l'enzyme libre, mais seulement 25% pour l'enzyme stabilisée. Contamination microbienne légère et constante sur 5 jours. Application d'enrichissement en peptides solubles dans les jus de fruits.	(Boudrant & Chefrel 1976)
<b>Isolat protéique de soja (93%)</b>	Pronase® : pH 8 – 50°C – 1/16-1/400 – 100 h	UF fibres creuses (PS) MWCO : 10 kg.mol <sup>-1</sup> V <sub>r</sub> = 550-2750 mL J <sub>flux</sub> constant	Plus l'espace-temps est faible plus les peptides sont de haut poids moléculaire. Même chose avec l'avancement de la réaction à cause de l'inactivation enzymatique, la conversion diminue et les peptides sont gros. Bonne capacité de solubilisation, clarification et sorption d'humidité, mais faibles capacités moussantes et émulsifiantes. Augmentation d'amertume. La conversion diminue avec la concentration en substrat et l'augmentation du flux. La conversion augmente avec le volume du réacteur et le temps de séjour.	(Deeslie & Cheryan 1988) (Deeslie & Cheryan 1981a)
<b>Isolat protéique de soja (93%)</b>	Pronase® : pH 8 – 37-50°C – 1/16-1/400 – 7 h	UF fibres creuses (PS) MWCO : 10 kg.mol <sup>-1</sup> V <sub>r</sub> = 550 mL J <sub>flux</sub> variable	La capacité du réacteur diminue avec la concentration enzymatique et le volume du réacteur, mais la conversion augmente. La conversion diminue avec le flux et la concentration en substrat, mais la capacité de réacteur augmente avec le flux. L'index de rendement enzymatique augmente avec flux et avec une faible concentration enzymatique. Production stable jusqu'à 10 volumes de remplacements et peu de différences en doublant le J <sub>flux</sub> ou en changeant la température.	(Cheryan & Deeslie 1983)

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblé(s)	Référence
<b>Muscle du lieu jaune d'Alaska</b>	Samoase® : $pH 7,7 - 60^{\circ}C - 1/66 - 1/425 - 220-700 \text{ min}$	UF fibres creuses (PS) MWCO : $3 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 250 \text{ mL}$ $J_{flux}$ variable	Conversions élevées (>90%). Modélisation et ajustement des paramètres cinétiques sur modèle M-M sur les expériences en <i>batch</i> mais déviation avec l'expérience en continu. Stabilisateur $\text{CaCl}_2$ inefficace. Une faible vitesse de recirculation permet un meilleur maintien de l'activité enzymatique. Cependant, seulement entre 30 et 10% d'activité restante à la fin.	(Nakajima <i>et al.</i> 1992)
<b><math>\beta</math>-caséine</b>	Chymosine : $pH 6,2 - 32^{\circ}C - 1/2000 - 420 \text{ min}$ Temps de séjour 37,5-300 <i>min</i>	UF tubulaire (minéral) MWCO : $10 \text{ kg.mol}^{-1}$ UF spirale (cellulose) MWCO : $3 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 1,5 \text{ L}$ $J_{flux}$ constant	Conversion de 90%. Faible transmission des peptides avec membrane minérale (5%) et satisfaisante avec la membrane organique (34%). Index de rendement enzymatique pour les peptides immuno-modulateurs de $160 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{g}_E^{-1}$ .	(Bouhallab <i>et al.</i> 1993)
<b>Hémoglobine bovine</b>	Pepsine : $pH 2 - 40^{\circ}C - 1/49 - 24 \text{ h}$	UF tubulaire (minéral) MWCO : $20 \text{ kg.mol}^{-1}$ UF fibres creuses (PS) MWCO : 3,5-5-10-20 $\text{kg.mol}^{-1}$ $V_r = 1,8 \text{ L}$ $J_{flux}$ variable	Passage enzyme dans perméat pour membrane organique : 0,53%, 4%, 23%, 47%. Activité enzymatique de 40% restante dans rétentat après 24 h. Au $pH = pI$ de la protéine la transmission peptidique est maximale (~20%) pour les membranes minérale et organique. Autolyse de la pepsine réduite en présence de l'hémoglobine.	(Sannier <i>et al.</i> 1994)
<b>Caséino- macropeptide (CMP)</b>	Trypsine : $pH 7,5 - 40^{\circ}C - 1/1560 - 6-7 \text{ h}$ Ajout enzyme à 0 et 3 h	UF tubulaire (minéral) MWCO : $10 \text{ kg.mol}^{-1}$ UF spirale (cellulose) MWCO : $3 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 1,5 \text{ L}$ $J_{flux}$ constant	Rétention des peptides entre 20 et 50%. Valeur $k_{cat}$ 10 fois inférieur en réacteur continu qu'en <i>batch</i> . Enrichissement en peptides antithrombotiques de 59% après REM et 89% avec une nanofiltration additionnelle ( $400 \text{ g.mol}^{-1}$ organique).	(Bouhallab & Touzé 1995)

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblé(s)	Référence
<b>Concentrat de protéines de lait (35%)</b>	Alcalase® 0.6L : <i>pH</i> 8,5 – 50°C – 1/4-1/40 – 10 h	UF fibres creuses (PS) MWCO : 10 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 100-1000 mL$ $J_{flux}$ constant	La conversion augmente avec le temps de séjour et le <i>E/S</i> , mais diminue après 2 h de fonctionnement (désactivation enzymatique). La capacité du réacteur diminue avec augmentation du <i>E/S</i> (plus d'enzyme) et l'augmentation du temps de séjour. Index enzymatique doublé par rapport au <i>batch</i> avant la fin du premier volume de remplacement. Capacité moussante optimale avec un faible temps de séjour, mais stabilité plus élevée avec un très haut temps de séjour (petits peptides). Activité enzymatique résiduelle dans le perméat de 16%.	(Perea & Ugaldé 1996)
<b><math>\beta</math>-caséine</b>	Trypsine : <i>pH</i> 8,2 – 50°C – 1/50 – 4 h	Sept membranes planes à différentes <i>pH</i> préparées à base de polyacrylamide.	Pas de <i>PTM</i> mais flux hydrique dans toutes les chambres et application d'un champ électrique. Conversion > 90%. Haute purification des peptides (phosphopeptides, casomorphines) par leur <i>pI</i> .	(Righetti <i>et al.</i> 1997)
<b>Lait de chèvre</b>	Pepsine : <i>pH</i> 2 – 40°C – 1/50 – 4 h	UF tubulaire (minéral) MWCO : 30 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 100 mL$ $J_{flux}$ variable	Protéolyse sélective de l' $\alpha$ -lactalbumine. Résistance de la $\beta$ -lactoglobuline. Rendement molaire de 3,81% pour l' $\alpha$ -lactorphine (opioïde).	(Bordenave <i>et al.</i> 1999)
<b>Isolat protéique de soja</b>	Flavourzyme® type A et Alcalase® 2,4L : Ratio F/A 3/2 – <i>pH</i> Ø – 50°C – 1/40 — 16 h	UF fibres creuses (PS) MWCO : 3-30 $kg.mol^{-1}$ $V_r = \emptyset$ $J_{flux}$ variable	Solubilités totales des hydrolysats entre <i>pH</i> 2 et 9. Fuite enzyme au bout de 8 h. Peu de différences de profil molaire des peptides entre les deux membranes. Index de rendement enzymatique supérieur par rapport au <i>batch</i> après un deuxième volume de remplacement. Augmentation de la capacité de sorption de l'eau par 2-3 fois. Augmentation de l'activité antioxydante de 3 à 72%.	(Chiang <i>et al.</i> 1999)

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblé(s)	Référence
<b>CMP (80%)</b>	Trypsine : <i>pH</i> 8 – 40°C – 1/48- 1/2500 – 4 <i>h</i>	UF tubulaire (minéral) $V_r = 1,25 L$ $J_{flux}$ fixe	Mécanistiques et cinétiques des groupes peptidiques différent en fonction du ratio <i>E/S</i> . Le processus hydrolytique consiste en trois liaisons coupées, les deux premières sont clivées consécutivement, mais la dernière est contrôlée par l'accumulation de peptides intermédiaires. La dernière coupure dépend donc du ratio <i>E/S</i> mais aussi de l'alimentation en solution protéique.	(Martin-Orue <i>et al.</i> 1999)
<b>Hémoglobine bovine</b>	Papaïne : <i>pH</i> 8 – 55°C – 1/3-1/15 – 4 <i>h</i> Pré-hydrolyse 1 <i>h</i>	MF tubulaire (minéral) Taille pores : 0,14 $\mu m$ UF tubulaire (minéral) MWCO : 10 $kg.mol^{-1}$ $J_{flux}$ variable	40% activité enzymatique résiduelle dans le perméat pour l'UF et 20% pour la MF. 75% d'activité restante dans le rétentat au bout de 4 <i>h</i> pour l'UF et près de 90% pour la MF. L'adsorption des protéines et peptides sur la membrane changent de manière spectaculaire les propriétés de perméabilité et de sélectivité membranaire. La vitesse du fluide tangentielle augmente le <i>DH</i> . Plus le ratio <i>E/S</i> est faible (augmentation de substrat pour une quantité d'enzyme fixe) plus de temps sera nécessaire pour atteindre un état stationnaire.	(Belhocine <i>et al.</i> 2000)

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblé(s)	Référence
<b>CMP (80%)</b>	Trypsine : <i>pH</i> 8 – 40°C – 1/400- 1/1250 – 4 h	UF cellule agitée (cellulose) MWCO : 3 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 400 mL$ $J_{flux}$ variable	Etude mode discontinu de la rétention des peptides : rétention des petits peptides plus élevée à une <i>PTM</i> plus faible. Rétention plus élevée à des concentrations plus élevée sauf pour les fractions chargées négativement et hydrophobe. Rétention diminuée avec ajout de sels ( $NaNO_3$ ). Etude des rétentions en continu : légère augmentation de rétention à plus haute concentration en substrat. Pas de différence de conversion en fonction de la <i>PTM</i> . Distribution du temps de séjour (9-24 h) en correspondance avec une distribution d'un réacteur parfait, mais le soutirage des peptides est plus lent que le taux de production. 82% d'activité enzymatique résiduelle dans le rétentat.	(Prata-Vidal <i>et al.</i> 2001)
<b>Hémoglobine bovine</b>	Pepsine : <i>pH</i> 3 – 25°C – 1/40 – 48 <i>min</i> Pré-hydrolyse 2 <i>min</i>	UF cassette (cellulose) MWCO : 10 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 40 mL$ $J_{flux}$ constant	Enrichissement en peptide intermédiaire LVVh-7 (opioïde) par production continue en fixant le temps de séjour à 2 <i>min</i> ( <i>DH</i> 3%), car il est produit à 2 <i>min</i> de l'hydrolyse.	(Kapel <i>et al.</i> 2003)
<b>Isolat protéique de soja (IPS)</b>	Alcalase® 2,4L : <i>pH</i> 9 – 50°C – 1/40 – 8 h	UF spirale (PES) MWCO : 10 $kg.mol^{-1}$ $J_{flux}$ constant	Peptides avec activité ACE inhibitrice 10 fois supérieure à l'IPS. Activité liée aux peptides < 1 $kg.mol^{-1}$ . Deux volumes de remplacements suffisent pour être plus compétitif que le <i>batch</i> en index de rendement enzymatique. Stabilité de production entre 1 et 8 h de fonctionnement.	(Chiang <i>et al.</i> 2006)
<b>Protéines de lait</b>	Protex® 6L : <i>pH</i> 8,5 – 50°C – 1/16 – 16 h	UF casette (PES) MWCO : 3 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 2 L$ $J_{flux}$ variable	Suivi du colmatage (facteur 10 entre le début et la fin). Faible diminution d'activité enzymatique après 13 h (<10%). Pas d'influence sur l'activité enzymatique par le taux de cisaillement ou l'adsorption membranaire. Conversion de 80% et hydrolysats avec allergénicité diminuée de ~100%.	(Guadix <i>et al.</i> 2006)

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblé(s)	Référence
<b>Concentrat protéique de luzerne</b>	Delvolase® : $pH9,5 - 37^{\circ}C - 1/50 - 20$ $h$	UF tubulaire (minéral) MWCO : $10 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 32 \text{ L}$ $J_{flux}$ fixe	Temps de séjour fixé à $8 \text{ h}$ pour une production de petits peptides, dont 75% responsables de l'activité inhibitrice d'ACE. Activité d'inhibition ACE de l'hydrolysate de luzerne 20 fois supérieure à l'hydrolysate de soja.	(Kapel <i>et al.</i> 2006)
<b>Isolat protéines de lait (87%)</b>	Protease N : $pH7 - 55^{\circ}C - 1/16 - 2-5 \text{ h}$	UF cassette (PES) - cassette (cellulose) MWCO : $10-3 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 1 \text{ L}$ $J_{flux}$ variable	Allergenicité diminuée et/ou augmentation activité anti-radicalaire dans certaines configurations. En général, l'allergenicité est supérieure pour peptides $> 10 \text{ kg.mol}^{-1}$ puis entre $10$ et $3 \text{ kg.mol}^{-1}$ , et faible pour ceux $< 3 \text{ kg.mol}^{-1}$ . De même, les plus hautes activités antiradicalaires sont attribuées aux fractions $< 3 \text{ kg.mol}^{-1}$ .	(Cheison <i>et al.</i> 2007b)
<b>Protéines de lait ovin (20%)</b>	Promod® 439L : $pH8,5 - 40^{\circ}C - 1/100 - 3 \text{ h}$ Pré-hydrolyse $1 \text{ h}$	UF tubulaire monocanal (minéral) MWCO : $8 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 1,5 \text{ L}$ $J_{flux}$ constant	Temps de séjour moyen de $1 \text{ h}$ . Sans réglage $pH\text{-stat}$ . Hydrolysate avec meilleure pureté peptidiques que <i>batch</i> . Gain enzymatique de 50%. Conversion protéique légèrement meilleure en continu qu'en <i>batch</i> . La pré-hydrolyse diminue la <i>PTM</i> pour le même $J_{flux}$ .	(Mišun <i>et al.</i> 2008)
<b>Gluten de blé</b>	Alcalase® 2,4L : $pH9 - 40^{\circ}C - 1/33 - 6-10 \text{ h}$ Pré-hydrolyse $5 \text{ min}$	UF cassette (PES) MWCO : $10 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 500 \text{ mL}$ $J_{flux}$ constant	Index de rendement enzymatique supérieur au <i>batch</i> au bout de 2 volumes de remplacement. $J_{flux}$ moyen diminué avec la concentration du substrat, mais augmente avec <i>E/S</i> et <i>PTM</i> . Conversion protéique inchangée (28%) avec concentration en substrat et <i>PTM</i> , augmente avec <i>E/S</i> . Capacité réacteur diminue avec <i>E/S</i> . Perte activité enzymatique de 45%.	(Cui <i>et al.</i> 2011)

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblée(s)	Référence
<b>Isolat protéique de sésame</b>	Protéase A Amago 2G : <i>pH</i> 7 – 50°C – 1/1000-1/50 – 30 min Pré-hydrolyse 10 min	UF cassettes (PES) MWCO : 5-2-1 $kg.mol^{-1}$ $J_{flux}$ variable	<i>DH</i> augmente avec <i>E/S</i> . La population peptidique change en fonction du <i>E/S</i> vers des plus petits peptides. Activité antioxydante et antiradicalaires plus importantes après UF à 1 $kg.mol^{-1}$ que 5 $kg.mol^{-1}$ (60-50% contre 20-25%). Activité antioxydante efficace pendant 10 jours. Comportement inhabituel d'encrassement des membranes.	(Das <i>et al.</i> 2012)
<b>Caséine bovine</b>	Pancréatine : <i>pH</i> 8 – 37°C – 1/100 – 3 h Pré-hydrolyse 20 min	UF cassette (PES) MWCO : 5-1 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 2 L$ $J_{flux}$ variable	Ajout d'une purification par chromatographie pour distinguer les peptides anioniques (34 phosphopeptides identifiés), des peptides cationiques (antimicrobiens) des inhibiteurs d'ACE (24 peptides identifiés). Toutes les fractions ont des activités antimicrobiennes contre <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> (20-100%).	(Wu <i>et al.</i> 2013)
<b>Protéines de blé (85%)</b>	Flavourzyme® : <i>pH</i> 5 – 50°C – 1/5 – 24 h	UF cassettes (PES) MWCO : 1-5-10 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 10 mL$ $J_{flux}$ constant	Production stable et supérieur par la membrane 10 $kg.mol^{-1}$ . Index de rendement enzymatique multiplié par deux par rapport au <i>batch</i> (20 h). Etendu à 9 jours, c'est un facteur vingt. Inhibition par la L-Cystéine mais stabilité correcte de l'enzyme. Optimisation par méthode de plan d'expériences pour augmenter le rendement de l'espace-temps.	(Berends <i>et al.</i> 2014) (Berends <i>et al.</i> 2016)
<b>Collagène de peau de poisson (Oreochromis niloticus)</b>	Alcalase : <i>pH</i> 8 – 50°C – 3/4 – 6 h Pré-hydrolyse 0 à 60 min	UF fibres creuses (PS) MWCO : 1 $kg.mol^{-1}$ $J_{flux}$ variable	Pré-hydrolyse de 60 min permet de doubler l'index de rendement enzymatique. Elle diminue la résistante irréversible de la membrane (facteur 4) et augmente légèrement la conversion protéique. Pas d'impact sur la désactivation enzymatique (perte de 25% dans tous les cas). Pas de différence sur l'activité inhibitrice d'ACE. Capacité de réacteur la plus faible sans pré-hydrolyse.	(Tantong <i>et al.</i> 2014)

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblé(s)	Référence
<b>Protéines du blanc d'œuf (12%)</b>	Neutrase® 0.8L : <i>pH</i> 7 – 50°C – 9/10 – 135 min Papaine : <i>pH</i> 7 – 55°C – 1/2-1/14 – 135 min Alcalase® 2,4L : <i>pH</i> 8 – 50°C – 1/3 – 135 min	UF cassette (PES) MWCO : 10 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 300 mL$ $J_{flux}$ constant	Optimisation par plan d'expérience pour Alcalase pour la capacité de réacteur et <i>DH</i> . Capacité de réacteur supérieure avec une agitation de mélange et <i>E/S</i> faible et un flux élevé. Pour un haut <i>DH</i> , il faut une agitation rapide et faible flux. Apparition de l'activité antiradicalaire (10-90%) pour toutes les conditions, pas forcément corrélé à un haut <i>DH</i> , sauf pour l'Alcalase.	(Jakovetić <i>et al.</i> 2015)
<b>Gluten de blé</b>	Flavourzyme® 1000L : <i>pH</i> 7,5 – 37°C – 1/1000-1/10000 – 16-96 h	UF fibres creuses (minéral) MWCO : 1-5-10 $kg.mol^{-1}$ $V_r = 1 L$ $J_{flux}$ variable	Contrôle microbiologique par ajout d'éthanol. Activité enzymatique dans le perméat entre 1 et 10%. Inhibition par produits très présente pour des grandes concentrations en substrat ( <i>DH</i> divisé par deux). Mais le rendement de l'espace-temps est quand même meilleur pour la plus haute concentration et stable. Meilleure production pour une concentration en substrat moyenne (100 $g.L^{-1}$ ). Rendement de l'index enzymatique supérieur qu'en <i>batch</i> .	(Merz <i>et al.</i> 2015b)

Matrice(s) protéique(s)	Enzyme(s) – CO	Module de filtration et caractéristiques	Résumé études fonctionnement / production(s) activité(s) ciblé(s)	Référence
<b>Protéines de lait</b> (34%)	Neutrase : $pH 7 - 50^{\circ}C - 1/2,6 - 300$ <i>min</i>	UF cassette (cellulose) MWCO : $5 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 1,3 \text{ L}$ $J_{flux}$ variable	Comparaison entre alimentation en substrat puis en eau (AWFS), en substrat seulement (CCFS) et graduelle en substrat dilué en eau (GDFS). Les différents modes ne changent pas la concentration des peptides dans le perméat. La perte de flux la plus importante est pour le mode CCFS, le mode GDFS permet de garder le flux stable. Dans le rétentat une accumulation de protéines se produit pour le mode CCFS. Le mode GDFS est stable sans accumulation, et le mode AWFS présente une accumulation puis une diminution marquée une fois que l'eau est alimentée. Le mode GDFS présente la meilleure conversion (67%), meilleur rendement peptidique (67%), meilleur index de rendement enzymatique, et meilleure activité inhibitrice d'ACE.	(Huang <i>et al.</i> 2020b)
<b>Protéines de soja fermenté</b> (51%)	Papaine : $pH 6,8 - 40^{\circ}C - 1/20-1/7$ $- 5 \text{ h}$ Temps de séjour 5-9 h	UF cassette (PES) MWCO : $10 \text{ kg.mol}^{-1}$ $V_r = 90 \text{ ml}$ $J_{flux}$ constant	Ajustement automatique du flux (contrôleur PID). Pas d'influence du ratio $E/S$ sur la production de peptides totaux, aux activités antioxydantes (équivalent au substrat) ou inhibiteurs d'ACE (supérieur de 10% au substrat). Les différents temps de séjour moyens n'ont pas d'influence significative sur ces paramètres et sensiblement les mêmes grandeurs. Des UF aux seuils de coupure plus faibles ( $5-4-2 \text{ kg.mol}^{-1}$ ) par la suite permettent de doubler la valeur des bioactivités.	(Sitanggang <i>et al.</i> 2021)

### I.4.3. Performances des REM

Dans certaines études de performances du *Tableau 10* précédent, des grandeurs ont été mises en place pour pouvoir caractériser, quantifier et surtout comparer la production du REM par rapport à une mise en œuvre *batch*.

Le plus incontournable est le temps de séjour moyen ou le temps de passage ( $t_s$ ), qui détermine de temps de réaction dans le compartiment et permet de déplacer l'équilibre de réaction (*Eq. 64*). Ainsi, plus le volume du réacteur est grand ou plus le flux de perméat est faible, plus la conversion du substrat en produit sera élevée et plus la capacité du réacteur ( $\kappa$ ) sera faible (Cheryan & Deeslie 1983).

Le temps de séjour moyen peut inclure la quantité en enzyme, substrat ou produit, il est alors appelé l'espace-temps (*STY*) (*Eq. 65* ou *Eq. 66*). Ainsi, en prenant en compte toutes ces variables opérant dans le réacteur, il est possible d'évaluer de manière plus précise la capacité de l'équipement, l'économie de la réaction et la stabilité (Cheryan & Deeslie 1983; Berends *et al.* 2016).

La capacité de réacteur ( $\kappa$ ) est la valeur de performance des peptides produits par unité de temps et par enzyme (*Eq. 72*). Il permet de faire des comparaisons entre les différents réacteurs ou de suivre les effets d'une variable (Cheryan & Deeslie 1983; Bressollier *et al.* 1988).

L'incontournable critère économique est l'index de rendement enzymatique ( $Y_{N/E_{REM}}$ ) (appelé parfois « productivité » (Tauntong *et al.* 2014)), qui montre le gain principal de masse produite pour une quantité d'enzyme inchangée par rapport à un système *batch* (*Eq. 73*) (Cheryan & Deeslie 1983; Jakovetić *et al.* 2015).

La conversion protéique ( $X_p$  ou  $X_m$ ) peut être de même notion que pour une hydrolyse (*Eq. 71*). Parfois c'est la conversion entre le substrat *entrée* (hydrolyse et alimentation en nouveau substrat), et le produit *sorti* (après la membrane) qui est prise en compte, ce qui peut donner la notion d'une conversion protéique « membranaire »  $X_m$ . Ainsi, si le produit est encore dans la partie réténtat, il ne compte pas dans la conversion (Perea & Ugalde 1996).

Enfin la distribution du temps de séjour ( $F(t)$ ) (*Eq. 75*) des produits en sortie est comparée à une distribution théorique (*Eq. 76*) et permet de confirmer si, même en étant dans un système combiné avec une membrane, le montage a un comportement d'un mélange parfaitement agité (CSTR) (Bressollier *et al.* 1988).

Tableau 11 : Quelques grandeurs de caractérisation du fonctionnement en continu. Les notations dans les articles ayant été parfois très différentes, les équations ont été unifiées et adaptées en reprenant la codification du présent manuscrit.

Paramètre	Formule de calcul	Références
<b>Temps de séjour/passage</b> (min ou h)	$t_s = \frac{V_r}{J_{flux}}$ Eq. 64	(Cheryan & Deeslie 1983) (Bressollier et al. 1988)
<b>Espace-temps</b> ( $g_E \cdot g_{Pep}^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$STY = E \cdot \frac{V}{[S]} \cdot J_{flux}$ Eq. 65	(Deeslie & Cheryan 1981a) (Cheryan & Deeslie 1983) (Bressollier et al. 1988)
<b>Rendement espace-temps</b> ( $g_{Pep} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$STY = \frac{m_{Pep}}{t_{REM} \cdot V_r} = J_{flux} \cdot \frac{[Pep]}{V_r}$ Eq. 66	(Berends et al. 2014) (Merz et al. 2015b)
<b>Performance</b> ( $g_{Pep} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ )	$Pr = STY \cdot \frac{DH}{100}$ Eq. 67	(Merz et al. 2015b)
<b>Michaelis-Menten combiné avec bilan de masse par la conversion</b>	$k_2 \cdot \frac{E \cdot V_r}{S_0 \cdot J_{flux}} = Xp + \frac{K_m \cdot Xp}{S_0 \cdot (1 - Xp)} = V_{max} \cdot \tau$ Eq. 68	(Cheryan & Deeslie 1983) (Belhocine et al. 2000) (Cui et al. 2011) (Huang et al. 2020b) (Bressollier et al. 1988) (Qu et al. 2013)
	ou $\frac{V_{max} \cdot t_s}{K_m} = \frac{S_0 \cdot Xp}{K_m} + \frac{Xp}{1 - Xp} = k_2 \cdot E \cdot t_s$ Eq. 69	
<b>Michaelis-Menten - conversion</b>	$\frac{Xp}{1 - Xp} = V_{max} \cdot \tau$ Eq. 70	(Boudrant & Cheftel 1976)
<b>Conversion protéique membranaire</b> (%)	$Xp = X_m = \frac{Pep_p}{S_{0,r}}$ Eq. 71	(Cheryan & Deeslie 1983) (Perea & Ugalde 1996)

Paramètre	Formule de calcul	Références
<b>Capacité de réacteur</b> $(g_{Pep} \cdot \text{min}^{-1} \cdot g_E^{-1})$	$\kappa = \frac{[Pep] \cdot J_{flux}}{g_E}$ <p style="text-align: right;">Eq. 72</p>	(Cheryan & Deeslie 1983) (Perea & Ugalde 1996) (Cui <i>et al.</i> 2011) (Jakovetić <i>et al.</i> 2015)
<b>Index de rendement enzymatique</b> $(g_{Pep} \cdot g_E^{-1})$	$Y_{N/EREM} = \frac{[Pep] \cdot J_{flux} \cdot t_{REM}}{m_E}$ <p style="text-align: right;">Eq. 73</p>	(Cheryan & Deeslie 1983) (Perea & Ugalde 1996) (Chiang <i>et al.</i> 1999) (Cui <i>et al.</i> 2011)
<b>Productivité en peptides</b> $(g_{Pep} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$Pr_{REM} = \frac{m_{Pep} \cdot J_{flux}}{V_r}$ <p style="text-align: right;">Eq. 74</p>	(Perea & Ugalde 1996)
<b>Distribution du temps de séjour par rapport à une distribution idéale</b>	$F(t) = \frac{[Pep]}{[S]_{\text{Solution ajout}}}$ <p style="text-align: right;">Eq. 75</p> $F(t)_{\text{idéal}} = 1 - e^{-\frac{t}{t_s}}$ <p style="text-align: right;">Eq. 76</p>	(Bressollier <i>et al.</i> 1988) (Prata-Vidal <i>et al.</i> 2001)

#### I.4.4. Modélisation et optimisation des REM protéolytiques

Dans un REM, la conversion protéique se fait dans le compartiment rétentat, avec une alimentation en substrat et un soutirage du produit, en continu. La maîtrise du système se fait essentiellement par les conditions opératoires de la réaction, du débit d'alimentation et soutirage sous le contrôle de la pression transmembranaire appliquée. Ce procédé permet une très grande capacité de production, une fois les conditions opératoires connues pour un produit d'intérêt. Toutefois, l'étude de la protéolyse entre un couple enzyme/substrat en régime continu peut être un processus fastidieux et coûteux, ne permettant pas sa généralisation. Pour pallier ce problème, des simulations peuvent être faites à partir des équations de cinétique enzymatique et des paramètres du module de séparation, à condition de n'avoir qu'un système simple (Bressollier *et al.* 1988). En effet, la simulation de la composition des peptides dans le perméat d'un REM doit être réalisée au substrat et à chaque peptide. Elle doit intégrer la bioconversion par réaction dans le compartiment rétentat (élimination du substrat et production de peptides) et la transmission des peptides vers le compartiment perméat par séparation membranaire. Or, le système est complexe, car les produits sont des mélanges de nombreux peptides (plusieurs dizaines de peptides différents), produits avec des vitesses variables et transmis avec des vitesses et efficacités également différentes. Il est donc très difficile de maîtriser le système et d'identifier les conditions (conditions de réaction, seuil de coupure des membranes et débits) qui permettent d'avoir un soutirage stable d'une population peptidique d'intérêt. Cela limite essentiellement la mise en œuvre de ce type de procédé pour la protéolyse enzymatique (Guadix *et al.* 2006).

Une méthodologie basée sur la simulation et l'optimisation de la composition en protéines et peptides dans les compartiments du REM, en fonction des conditions opératoires réactionnelles et séparatives, permettrait de surpasser les difficultés liées au coût de développement (Vos *et al.* 1993; Noworyta *et al.* 2018; Costandy *et al.* 2019).

Basiquement, pour la mise en place d'un REM, Cole & Johnson (2018) ont déterminé les questions suivantes à se poser :

- ✓ Comment définir le produit d'intérêt ?
- ✓ Comment déterminer les conditions d'obtention de ce produit d'intérêt pendant le processus ?
- ✓ Comment valider la stabilité de la production du produit d'intérêt ?
- ✓ Quelles sont les limites d'acceptabilité des caractéristiques du produit ?

- ✓ Dans le cas d'un suivi en ligne, quelle est la fréquence d'échantillonnage analytique appropriée et le rôle des technologies de suivi analytique en ligne avant et après la validation du procédé ?
- ✓ Quelle est l'ampleur et la durée acceptables des perturbations de processus qui n'affectent pas le produit ?
- ✓ Comment envisager des opérations unitaires, délibérément non-stationnaires telles que des réactions où l'activité du catalyseur évolue dans le temps ?
- ✓ Comment mettre en place un nettoyage et un rinçage périodiques au solvant hors ligne pour éliminer l'accumulation de solides ?
- ✓ Comment intégrer au mieux la modélisation numérique dans la stratégie de contrôle ?
- ✓ Comment procéder au mieux à la validation des processus ?

La mise en place de réacteurs pour l'hydrolyse continue des protéines a commencé il y a une cinquantaine d'années, et quelques essais de simulation ont été réalisés (Adu-Amankwa *et al.* 1981; Adu-Amankwa & Constantinides 1984; Tsibanov *et al.* 1985). Ces études ont élaboré des modèles d'équations cinétiques basés sur M-M et bilan de matière, amenant au premier ordre de réaction ou une expression polynomiale, avec différents paramètres liés au REM (concentration en substrat, volume, concentration en enzyme, dénaturation enzymatique, coefficient de transfert) pouvant être ajustés sur l'expérimentation avec des coefficients additionnels :

$$\frac{d \sum S_{sol}}{dt} = \frac{\frac{E_0^{immo}}{E_0^{batch}} k_1 [S_0 - k_2 (S_0 - S_{sol})] e^{-k_3 t}}{1 + k_4 S_0 + k_5 (S_0 - S_{sol})} \quad Eq. 77$$

$$\frac{d \sum P}{dt} = S_0 \sum_{i=1}^j f_i k_i E_0 - t \cdot S_0 \sum_{i=1}^j f_i (k_i E_0)^2 \quad Eq. 78$$

Pour l'Eq. 77,  $S_{sol}$  est le substrat soluble,  $E_0^{immo}$  l'enzyme immobilisée,  $E_0^{batch}$  l'enzyme « décrochée » et éluee dans le réservoir,  $k_x$  diverses constantes de vitesse de réaction déterminées sur une mise en œuvre *batch*. Pour l'Eq. 78,  $f_i$  est la fraction molaire du substrat  $i$  (liaison peptidique) dans le mélange protéique/peptidique avec  $S_0$  liaisons possibles, et  $k_i$  la constante de vitesse de dissociation liée au substrat  $i$ .

Toutefois, ces études ont été confrontées, comme démontré précédemment, au problème de modélisation du système complexe d'hydrolyse protéique avec multiples substrats et produits. Par ailleurs, le manque de moyens analytiques poussés a conduit à une interprétation limitée ou

« formelle » des modèles cinétiques. Ainsi, ces études ont pu modéliser seulement la solubilisation des protéines ou leur conversion.

La modélisation des REM nécessite de prendre en compte les modèles cinétiques et les lois de conservation de matière pour l'estimation des performances. En ce qui concerne la séparation membranaire seule, des modélisations fiables ont été développées, comme présentées dans la partie précédente (cf. §I.3.8.2 p.75 *EB*). Nombre de modélisations ont été concluantes que ce soit pour des séparations avec peu de solutés ou bien plus complexes, comme les hydrolysats protéiques (Muller *et al.* 1999; Ahmad *et al.* 2006; Sarkar *et al.* 2011; Bodin 2016). Cela permet de savoir quelle consommation en eau sera nécessaire pour atteindre un certain critère de pureté ou de rendement ou quel mode (ou combinaison de modes) serait le plus favorable, ou en encore quelles conditions permettront un enrichissement d'une certaine fraction, par exemple, ayant un composé bioactif (Beaubier *et al.* 2021b). Cependant, ces modélisations sont applicables à un système fixe avec un hydrolysat « statique ». Pour un hydrolysat produit en continu, l'évolution dans le temps des concentrations de toutes les molécules qui le composent doit être connue. A l'heure actuelle, les paramètres cinétiques pour l'hydrolyse des protéines sont déterminés pour les produits totaux de l'hydrolysat, souvent simplifié avec le paramètre du *DH* alors qu'il ne reflète pas la complexité du mécanisme protéolytique opérant (cf. §I.2.3 p.41 *EB*).

Des travaux de modélisation-optimisation par la méthode de plan d'expériences ont également été réalisés, mais ils restent très fastidieux et peu explicatifs, dû au nombre important d'expériences qui génèrent finalement encore des modèles de paramètres généraux, tels que le rendement de l'espace-temps, le *DH*, le rendement en peptides totaux ou la capacité de réacteur (Jakovetić *et al.* 2015; Berends *et al.* 2016). L'analyse pour chaque peptide serait extrêmement laborieuse à réaliser en plus de se confronter à une limite d'interprétation, car les mécanismes de l'hydrolyse et de la séparation ne seront pas correctement modélisés dans leur ensemble. En outre, en ce qui concerne le criblage de conditions opératoires sur l'hydrolyse (temps, *T*, *pH*) les conclusions des performances sont semblables, donc il n'est pas intéressant de faire cet effort sur un montage continu alors qu'une simple étude en *batch* suffirait (Margot *et al.* 1998).

A date, il n'existe pas de méthodologie efficace et rapide pour modéliser et optimiser le système dans son ensemble pour un REM, ce qui est un frein considérable au développement des productions continues d'hydrolysats protéiques.

Néanmoins, cela semble possible avec les études qui s'orientent vers une modélisation du système de protéolyse dans son entièreté, avec les nombreux peptides et leurs cinétiques propres (Sousa *et al.* 2003; Munoz-Tamayo *et al.* 2012; Fernández & Riera 2013; Trusek-Holownia & Noworyta 2015) (*cf.* §I.2.3.5 p.48 **EB**). En combinant ces modèles cinétiques aux modèles de séparation membranaire (*cf.* §I.3.5 p.64 **EB**), il serait alors possible de modéliser l'évolution de la concentration de chaque composé (protéines, peptides) par bilan de matière, ce qui indiquera la répartition massique le perméat et le rétentat (Bodin 2016). Par conséquent, l'ensemble formera une modélisation fonctionnelle d'un REM pour une protéolyse enzymatique.

### Conclusion de l'étude bibliographique

Les hydrolysats protéiques représentent des débouchés applicatifs divers et variés, intéressants non seulement du point de vue nutritionnel, technico-fonctionnel et bioactif, mais également par la dimension de valorisation de co-produits des filières alimentaires.

Leurs applications nécessitent cependant un certain nombre d'étapes :

- La recherche de l'enzyme et des conditions opératoires ( $pH$ ,  $T$ ,  $E/S$ ,  $t$ ) résultant sur le mécanisme qui conduit à la propriété d'hydrolysat recherchée.
- Développer une méthode de production rentable et économique.

Si le premier point peut être aisément développé à l'échelle du laboratoire, le second à l'échelle industrielle demande plus d'efforts d'études de faisabilité et d'optimisation. La méthode la plus intéressante est en mode continu, *via* la mise en œuvre d'un réacteur enzymatique à membrane, qui combine une hydrolyse du substrat avec une séparation des produits. Le système d'une membrane inerte et d'une enzyme libre en solution, constitue le montage le plus simple et le plus rapide à mettre en œuvre pour fonctionner comme un extracteur de peptides. Les avantages sont nombreux, la production à l'échelle de laboratoire de perméats applicatifs est validée, mais ce développement, spécifiquement pour les protéines, est encore très empirique et très coûteux.

La solution est l'utilisation de modèles mathématiques, qui aident à diminuer les coûts du développement en permettant de faire des simulations et/ou des optimisations numériques. La difficulté étant de réussir la bonne modélisation du système comprenant la séparation membranaire de plusieurs peptides et la modélisation de la protéolyse qui comprend différentes cinétiques et mécanismes mis en jeu par la multitude des peptides produits.

Cette dernière décennie, des travaux ont été réalisés pour modéliser la mécanistique de ces systèmes complexes avec des moyens analytiques de pointe (CLHP, spectrométrie de masse), et surtout en s'éloignant du modèle de Michaelis-Menten.

La solution, entrevue pour développer une méthodologie de mise en œuvre d'un REM, se base sur le développement d'un modèle protéolytique, comprenant des équations différentielles au plus proche des mécanismes opérants, qui seraient couplées au modèle de séparation membranaire.



# MATÉRIELS & MÉTHODES

## II. Matériels et Méthodes

### II.1. Matériels et réactifs

Des protéines totales de colza (PTC) ont été produites à partir d'un tourteau de colza broyé fourni par Olead (Pessac, France). La teneur initiale en protéines de la farine était de 34,4% sur la base de la matière sèche. La préparation de l'isolat de protéines de colza a été faite selon Defaix *et al.* (2019a). Brièvement, les PTC ont été extraites en milieu aqueux à température ambiante avec un ratio solide-liquide de 1:9 et  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$  de *NaCl*. Le *pH* a été ajusté à 7 et maintenu constant par addition de  $2 \text{ mol. L}^{-1}$  de *NaOH*. Le mélange a été agité à 450 *rpm* et l'extraction a duré 30 *min*. Ensuite, le mélange a été centrifugé à  $15000 \times g$  pendant 30 *min* et le surnageant a été récupéré et clarifié sur papier filtre. Les PTC ont ensuite été purifiées par des procédés membranaires comprenant la CD et la DF avec l'unité semi-automatique de filtration tangentielle Aktä « flux 6 » (Cytiva, Marlborough, Etats-Unis). L'extrait clarifié a été concentré jusqu'à  $FRV = 4$  avec une cartouche de fibres creuses de  $4800 \text{ cm}^2$ , de seuil de coupure de  $3 \text{ kg.mol}^{-1}$ , (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Etats-Unis) à un débit de gavage/alimentation de  $1 \text{ L.min}^{-1}$  et une *PTM* de 1,5 *bar*. Les PTC ont ensuite été purifiées par diafiltration avec 6 *DV* d'eau ultra-pure. Le rétentat final a été récupéré et lyophilisé. La pureté des PTC a été analysée par la méthode de Kjeldahl avec un facteur de conversion azote-protéine de 6,25. La pureté a été mesurée à  $92,8 \pm 2,7\%$  sur base de matière sèche, correspondant au grade isolat. Les proportions initiales de la napine et de la cruciférine dans l'isolat des PTC, déterminées par chromatographie d'exclusion stérique, ont été évaluées à 47,3% et 52,7% respectivement.

L'enzyme ProlyvePAC® (PAC 30L), issue d'*Aspergillus niger* avec une activité spécifique de 582 *UPAC/g*, a été achetée chez Soufflet Biotechnologies (Nogent-sur-Seine, France). La protéase était de qualité alimentaire et conservée à 4°C.

Les hydrolysats ont été ultrafiltrés avec l'unité semi-automatique de filtration tangentielle Aktä « flux s » (Cytiva, Marlborough, Etats-Unis). L'unité était équipée d'une membrane de fibres creuses en polysulfone (Cytiva, Marlborough, Etats-Unis) avec un seuil de coupure nominal (NMWCO) de 3, 5, 10, 30, 50 ou  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ . La surface de filtration était de  $140 \text{ cm}^2$  avec 30 fibres d'un diamètre interne de 0,56 *mm* (*Tableau 12* p.106). Avant les expériences d'ultrafiltration, les débits en eau à température ambiante de la membrane sont vérifiés. Après utilisation, la membrane est lavée jusqu'à récupération du même débit en eau (à température ambiante) qu'avant expérience. Le lavage est fait avec *NaOH* 0,1 *M*, Sodium-Dodécyl-Sulfate 0,1%, Terg-A-zyme® 0,2%, et/ou *NaOCl* 50 *ppm*, une heure de chaque à

50°C. La vitesse de recirculation était de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  et *PTM* de 0,5 bar. Le stockage de la membrane est fait dans du *NaOH* 0,1 M à 4°C.

Tableau 12 : Caractéristiques constructeur des membranes d'ultrafiltration utilisées dans l'étude.

Cartouche de fibres creuses	
<i>Matériau</i>	Polysulfone (PS)
<i>Surface membrane</i>	140 cm <sup>2</sup>
<i>Chemin d'écoulement</i>	30 cm
<i>Nombre de fibres</i>	30
<i>Température d'opération</i>	< 80°C
<i>Plage pH</i>	2–13
<i>Limite pression</i>	2,4 bar (> 50°C)
<i>Diamètre interne fibre</i>	0,56 mm

## II.2. Hydrolyses enzymatiques

L'hydrolyse de l'isolat de PTC a été réalisée dans un réacteur à double enveloppe de 200 mL. La température était contrôlée au bain-marie (Isotemp, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et le *pH* a été maintenu constant avec un système 902 Titrande (Metrohm Ltd., Herisau, Suisse) avec  $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  *HCl*. La concentration initiale en protéines était de 1% (*p/v* basé sur la pureté en protéines). La suspension a été amenée à des conditions appropriées (température et *pH*) avant l'ajout de l'enzyme.

### II.2.1. Hydrolyse sélective non-optimale

L'hydrolyse sélective initiale sur l'isolat de PTC avec l'enzyme ProlyvePAC® a été fixée à *pH* 3, 50°C et un rapport *E/S* de 1/500 ( $g_E \cdot g_S^{-1}$ ). Le volume final était de 50 mL. La réaction a été stoppée après 7 heures d'hydrolyse par un changement de *pH* avec 12 µL de *NaOH* à 2 mol.L<sup>-1</sup>.

### II.2.2. Ultrafiltration de l'hydrolysats non-optimal

Les peptides et les protéines non hydrolysées ont été séparées en ultrafiltration avec, premièrement, une concentration volumétrique d'un facteur 2, suivi d'une diafiltration avec 5 diavolumes d'eau ultra-pure. Une membrane de cellulose régénérée de  $3 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  a été utilisée (88 cm<sup>2</sup>, Millipore, Burlington, Massachusetts, États-Unis) sur un système Cogent µScale TFF (Millipore, Burlington, Massachusetts, États-Unis) à température ambiante et 2,5 bar de *PTM*. Le perméat a été recueilli, concentré 5 fois avec Rotavapor Büchi (Marshall Scientific, Hampton, New Hampshire, États-Unis), congelé à -80°C, lyophilisé et broyé au mortier-pilon.

### II.2.3. Hydrolyse pour l'étude du mécanisme

Pour l'étude mécanistique de l'hydrolyse par la ProllyvePAC©, la suspension des PTC a été ajoutée à un volume final de 60 mL. Les plages de température et de pH ont été choisies selon les données du fournisseur : 40 – 50 – 60°C et pH 3 – 4 – 5. Le rapport enzymatique  $E/S$  variait de 1/100 – 1/500 – 1/1000. Les échantillons ont été prélevés par 1 mL à 0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 3 – 5 heures et la réaction a été arrêtée par changement de pH avec un ajout de 10 µL de NaOH 8 mol. L<sup>-1</sup>.

### II.2.4. Hydrolyse pour la modélisation cinétique (plan d'expériences)

La suspension des PTC a été hydrolysée par la quantité indiquée (*Tableau 13* p.108 *M&M*) de ProllyvePAC© dans un volume final de 60 mL. Une fois que la température a atteint la valeur indiquée par le plan d'expériences, le pH est ajusté à 3 et maintenu constant par le système Titrand. Les échantillons ont été prélevés par 1 mL à 0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 3 – 5 heures et la réaction a été arrêtée par changement de pH avec 10 µL de NaOH 8 mol. L<sup>-1</sup>.

### II.2.5. Hydrolyse de validation du plan d'expériences

La suspension des PTC a été hydrolysée par la quantité indiquée (*Tableau 14* p.109 *M&M*) de ProllyvePAC© dans un volume final de 60 mL. Une fois la température montée à la valeur indiquée par le plan de validation, le pH a été ajusté à 3 et maintenu constant par le système Titrand. Les échantillons ont été prélevés par 1 mL à 0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 3 – 5 heures et la réaction a été arrêtée par changement de pH avec 10 µL de NaOH 8 mol. L<sup>-1</sup>.

### II.2.6. Hydrolyse dans les conditions optimales de Pareto

#### II.2.6.1. Conditions de temps de réaction final de 2 heures

Pour l'étude cinétique, la suspension des PTC a été hydrolysée par un ratio de 1/448 de ProllyvePAC© dans un volume final de 60 mL. Une fois la température montée 55°C le pH a été ajusté à 3 et maintenu constant par le système Titrand. Les échantillons ont été prélevés par 1 mL à 0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 – 3 – 5 heures et la réaction a été arrêtée par changement de pH avec 10 µL de NaOH 8 mol. L<sup>-1</sup>.

Pour des productions d'hydrolysats en grande quantité, la suspension a été hydrolysée avec un ratio de 1/448 d'enzyme à 55°C dans un volume final de 2 L. Au bout de 2 heures, la réaction est stoppée par changement de pH de 3 à 9 avec NaOH 8 mol. L<sup>-1</sup>. L'hydrolysats est ensuite congelé à -80°C puis lyophilisé. La pureté de l'hydrolysats obtenu a été mesurée à 79,2 ± 2% sur base de matière sèche.

### II.2.6.2. Cinétique de temps de réaction final de 50 minutes

Pour l'étude cinétique, la suspension des PTC a été hydrolysée par un ratio de 1/170 de ProllyvePAC® dans un volume final de 60 mL. Une fois la température montée à 55°C, le pH a été ajusté à 3 et maintenu constant par le système Titrando. Les échantillons ont été prélevés par 1 mL à 0 – 2 – 5 – 10 – 15 – 20 – 30 – 40 – 50 – 60 – 120 – 180 min et la réaction a été arrêtée par changement de pH avec 10 µL de NaOH 8 mol.L<sup>-1</sup>.

## II.3. Modélisation – Optimisation hydrolyse

### II.3.1. Modélisation hybride de l'hydrolyse

La cinétique de protéolyse de ProllyvePAC® a été modélisée selon la méthode de Beaubier *et al.* (2021). Brièvement, la constante cinétique  $k_c$  était supposée suivre la vitesse de réaction du second ordre, puis sa régression a été effectuée dans un ensemble de conditions opératoires, défini par un plan factoriel complet avec 2 facteurs ( $T$  et  $E/S$ ) à 3 niveaux. Enfin, des corrélations ont été établies entre  $k_c$  et les conditions opératoires en ajustant les modèles aux cinétiques expérimentales. Un plan d'expérience composite à face centrée ( $\alpha = 1$ ) a été réalisé. Les deux facteurs ont 3 niveaux codifiés (Tableau 13). La matrice était composée de 12 expériences dont 3 étaient la réplique du point central. La réponse  $k_c$  ( $Y$ ) a été obtenue par régression de la cinétique modifiée du second ordre (Eq. 79). Le modèle de corrélation est une équation polynomiale avec les deux facteurs comme variable ( $T$  et  $E/S$  en tant que  $X_1$  et  $X_2$ ), leur coefficient d'interception ( $b_0$ ), linéaires ( $b_i$ ), interaction ( $b_{ij}$ ) et quadratiques ( $b_{ii}$ ).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 b_{ij} \cdot X_i \cdot X_j \quad \text{Eq. 79}$$

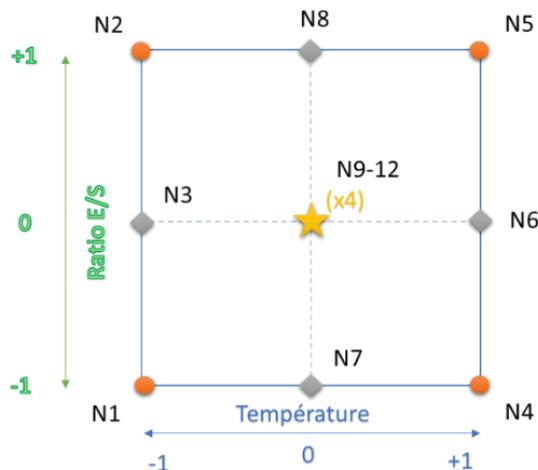


Tableau 13 : Codification des conditions opératoires d'hydrolyse.

Niveau	T (°C)	E/S
-1	35	1/2000
0	45	1/285
1	55	1/154

Figure 25 : Représentation du domaine du plan d'expérience. N1-12 : les numéros des différentes expériences et leur position sur le domaine étudié.

Des expériences de validation supplémentaires ont été réalisées pour confirmer la modélisation cinétique et la prédiction conformément aux indications du **Tableau 14**.

Tableau 14 : Validation du DoE, valeurs codées et réelles de la température et du ratio E/S.

Nom de l'expérience de validation	T (°C)		E/S	
<b>A</b>	-0,75	37,5	-0,75	1/801
<b>B</b>	-0,75	37,5	0,75	1/174
<b>C</b>	0,75	52,5	-0,75	1/801
<b>D</b>	0,75	52,5	0,75	1/174

Le logiciel MATLAB® (R2020a, MathWorks, Natick, Massachusetts, Etats-Unis) a été utilisé pour ajuster les données à l'équation polynomiale. Une ANOVA a été utilisée pour évaluer la significativité statistique de ces coefficients. Les modèles de corrélation finaux ont été obtenus en supprimant les termes non significatifs (valeur de  $p > 0,05$ ). Les coefficients  $R^2$  et  $Q^2$ , l'écart type relatif (RSD), la reproductibilité et l'inadéquation de l'ajustement ont été analysés pour caractériser la qualité de l'ajustement du modèle.

### II.3.2. Modélisation de la déplétion protéique

Beaubier *et al.* (2019a) ont fait plusieurs hypothèses selon lesquelles, premièrement, la conversion protéique ( $Xp$ ) suit une réaction cinétique de second ordre, sur la base des travaux de Deng *et al.* (Deng 2018; Deng *et al.* 2018) :

$$Xp (\%) = Xp_{max} - \frac{Xp_{max}}{(1 + k_{Xp} \times Xp_{max} \times t)} \quad \text{Eq. 80}$$

Avec  $k_{Xp}$  la constante cinétique de  $Xp$  et  $Xp_{max}$  le taux de conversion protéique maximal. Deuxièmement, le paramètre cinétique  $k_{Xp}$  dépend de l'accessibilité du site de clivage et de l'effet des conditions opératoires sur l'activité enzymatique. Par conséquent, le  $pH$ , la température et le rapport  $E/S$  affectent ces paramètres cinétiques et une corrélation polynomiale a été établie par la méthodologie des plans d'expériences. Notre hypothèse est que la même stratégie pourrait être assignée à la concentration, car le  $Xp$  est le rapport de la concentration massique de la protéine à un temps  $t$  ( $C_t$ ) sur sa concentration initiale ( $C_0$ ). Donc, si l'équation initiale pour le calcul de  $Xp$  est la suivante :

$$Xp_t = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) \quad \text{Eq. 81}$$

Alors  $Xp_{max}$  apparaît lorsque plus aucune protéine ne peut être hydrolysée. Il y a donc une concentration minimale ( $C_{min}$ ) qui ne serait pas hydrolysée, et  $Xp_{max}$  équivaut à :

$$Xp_{max} = \left(1 - \frac{C_{min}}{C_0}\right) \quad Eq. 82$$

En plaçant l'Eq. 82 dans l'Eq. 80, on aboutit à :

$$C_t = \left( \frac{C_{min}}{C_0} + \frac{1 - \frac{C_{min}}{C_0}}{1 + \left(1 - \frac{C_{min}}{C_0}\right) \times k_C \times t} \right) \times C_0 \quad Eq. 83$$

Avec  $k_C$  le paramètre cinétique de variation de la concentration en protéine. Puis, comme cela avait déjà été fait (Beaubier *et al.* 2021a), l'influence des conditions de fonctionnement peut être étudiée à travers une méthodologie de plan d'expériences.

### II.3.3. Optimisation multicritère

#### II.3.3.1. Algorithme génético-évolutionnaire

L'optimisation multicritère du processus de protéolyse enzymatique des protéines est mise en œuvre sur des critères économiques. Les conditions opératoires optimales pour la production d'hydrolysats sélectionnés sont ainsi recherchées afin de minimiser deux critères de performance, (1) le temps de réaction et (2) le coût enzymatique. Un programme sous MATLAB®, un algorithme génético-évolutionnaire (R2020a, MathWorks, Natick, Massachusetts, États-Unis) a été développé au laboratoire (Muniglia *et al.* 2004), et a été utilisé pour identifier le front et le domaine de Pareto.

Globalement, les algorithmes génétiques (AG) se basent sur les grands principes d'évolution naturelle, qui permettent une capacité d'adaptation à une population donnée, aux contraintes extérieures au cours de générations successives (Perrin *et al.* 1997). Pour ce faire, une population initiale composée de  $N$  individus est générée aléatoirement à partir de gènes et d'allèles donnés ( $T$ ,  $E/S$ ), puis les générations se succèdent par les phases de sélection et de reproduction jusqu'à atteindre le critère recherché (minimisation de critères de performances) :

- 1) Phase sélection : la population est soumise au décès, où les individus sont triés selon leur capacité d'adaptation et seuls les meilleurs sont gardés.
- 2) Phase reproduction : les premiers individus sont conservés pour la phase de naissances, où un certain nombre d'enfants viables (qui sont au moins aussi bons que parent le moins

performant) est généré. Les individus enfants sont reconstruits par l'action d'opérations secondaires :

- a. Croisement : échange inter-chromosomique aléatoire des allèles du génome parental.
- b. Mutation : pour un enfant sélectionné, tri aléatoire de la totalité des gènes et des dominances des deux chromosomes avec une probabilité  $M$ .
- c. Homozygotie : modification de l'enfant en recopiant son phénotype sur ses deux chromosomes avec une probabilité  $H$ .

Les deux phases principales se succèdent et l'évolution se termine lorsqu'à la fin d'une génération l'écart entre les valeurs extrêmes des fonctions à optimiser est faible (Perrin *et al.* 1997).

Deux principales fonctions objectives ont ainsi été définies pour minimiser le coût d'utilisation de l'enzyme (en € par  $kg$  de protéines, €. $kg_S^{-1}$ ) et le temps ( $h$ ) d'hydrolyse sur la base de la formule de pureté de la napine (Eq. 92 p.114). Pour ce faire, les concentrations de cruciférine et de napine ont été incluses avec leurs formules cinétiques (Eq. 83 p.110), déterminées à partir du modèle cinétique en fonction des conditions opératoires de l'hydrolyse (Eq. 79 p.108). La variation de la napine étant supposée nulle, son rendement a été fixé à 0,94. La pureté de la napine a été fixée à 84% (maximum pouvant être atteint). Une population de 2000 individus a été générée aléatoirement par le programme. Parmi les solutions possibles, la meilleure solution de compromis unique a été choisie par la méthode « min-max » (Zio *et al.* 2009).

### II.3.3.2. Choix de la meilleure solution par la méthode « min-max »

Une fois le front de Pareto généré, toutes les solutions sont équivalentes. Cependant, pour rendre la sélection la plus objective possible, des méthodes ont été développées, basées sur des critères quantitatifs qui permettent de sélectionner le meilleur compromis du front. La méthode la plus populaire est appelée « min-max ». On considère un point  $Q$  dans le front de Pareto avec les fonctions  $f_1(x)$  et  $f_2(x)$ . Supposons  $f_1^{min}$  est le *minimum* de  $f_1(x)$  et  $f_2^{min}$  est le *minimum* de  $f_2(x)$ . Ainsi, les déviations,  $z_1$  et  $z_2$  de meilleures solutions de chaque fonction respective sont (Belegundu & Chandrupatla 2019) :

$$z_1 = |f_1(x) - f_1^{min}| \quad \text{Eq. 84}$$

$$z_2 = |f_2(x) - f_2^{min}| \quad \text{Eq. 85}$$

On cherche alors la localisation du point  $Q$  de telle manière que ces déviations maximales soient minimisées et conduisent à l'unique point  $x^*$  du Pareto :  $\max [\min \{z_1, z_2\}]$ . La déviation  $z_i$  est habituellement normalisée par rapport à l'amplitude de la fonction :

$$z_i = \frac{|f_i(x) - f_i^{\min}|}{f_i^{\max} - f_i^{\min}} \quad \text{Eq. 86}$$

Cela conduit à une colonne par déviation  $z_i$ . S'en suit une sélection de la valeur de déviation maximale sur chaque ligne dans une nouvelle colonne  $z_{\max}$ . Enfin, dans cette dernière colonne la valeur minimale est recherchée, et son index de ligne indique la place point  $x^*$  qui recoupe le centre des fonctions  $f_1(x)$  et  $f_2(x)$  et indique enfin les coordonnées du point  $Q$ , comme le montre la *Figure 26*.

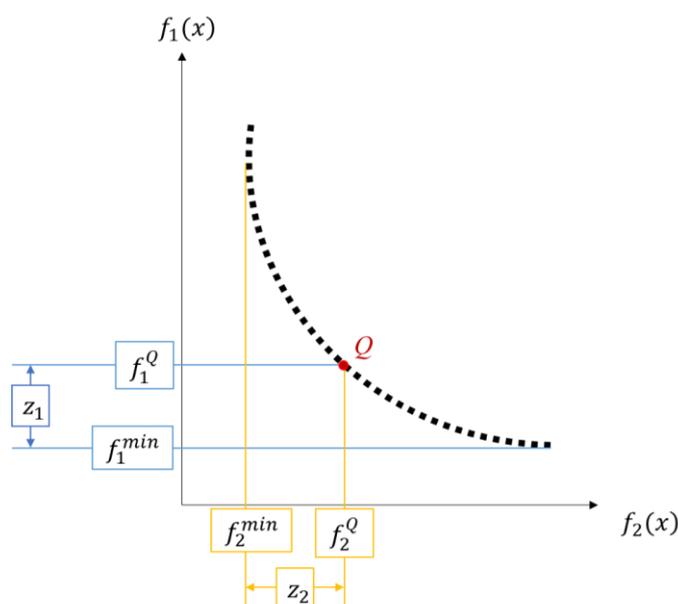


Figure 26 : Schéma de l'approche « min-max » (Belegundu & Chandrupatla 2019).

## II.4. Méthodes analytiques

### II.4.1. Calibration colonne CLHP-ES

La colonne Biosep-SEC-s2000 300×7,8 mm, 5 μm (Phenomenex, Torrance, Californie, États-Unis) maintenue à 35°C, connectée à un système Shimadzu modèle LC20 (Shimadzu Corporation, Japon), a été calibrée avec 38 peptides de synthèse, avec une injection de 10 μL à 1 g.L<sup>-1</sup>. L'élution est isocratique à 0,6 ml.min<sup>-1</sup> avec un solvant eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique (TFA) aux proportions 54,9/45/0,1 (v/v/v). Le signal UV est enregistré à 214 nm avec une cellule optique de longueur de 1 cm. L'équation de calibration obtenue par

régression linéaire ( $R^2 = 0,9$ ) de la transformation logarithmique des masses molaires ( $MM$ ) en fonction du temps de rétention ( $TR$ ) donne la relation suivante :

$$MM = 10^{-0.2394 \times TR + 6.0189} \quad \text{Eq. 87}$$

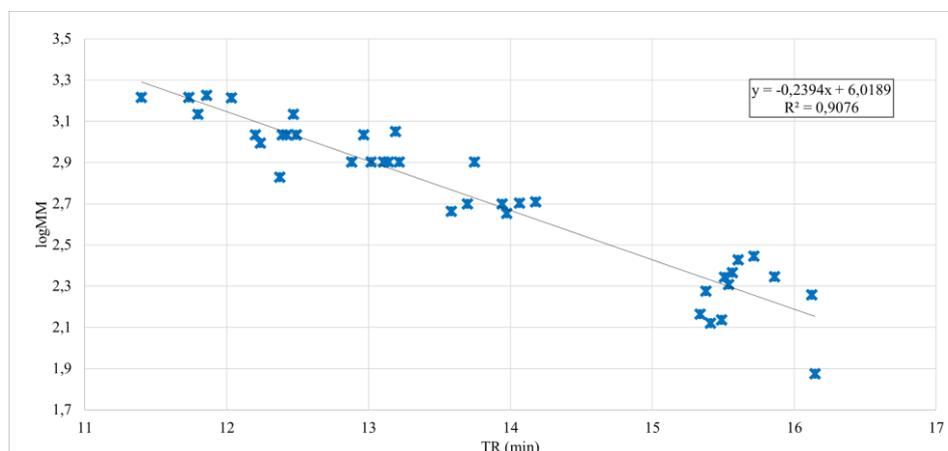


Figure 27 : Calibration de la colonne CLHP-ES Biosep-SEC-s2000 avec 38 peptides de synthèse.

#### II.4.2. Analyse CLHP des protéines et peptides

Les hydrolysats de PTC ont été analysés selon la méthodologie décrite par Defaix *et al.* (2019a) : 5  $\mu\text{L}$  d'échantillon ont été injectés et analysés avec la colonne Biosep-SEC-s2000 300 $\times$ 7,8 mm, 7  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, Californie, États-Unis), maintenue à 35°C, connectée à un système Shimadzu modèle LC20 (Shimadzu Corporation, Japon). Une élution isocratique a été utilisée pour séparer les échantillons à 0,6  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$  avec un solvant eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique (TFA) : 54,9/45/0,1 ( $v/v/v$ ). Le signal UV est enregistré à 214 nm avec une cellule optique de longueur de 1 cm.

#### II.4.3. Quantification et qualification des protéines

La conversion des protéines ( $Xp$ ) a été faite selon la méthodologie de Beaubier *et al.* (2019). Brièvement, la protéine hydrolysée est évaluée en comparant le signal protéique à l'instant  $t$  au signal protéique initial suivant la formule :

$$Xp_t(\%) = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100 \quad \text{Eq. 88}$$

Où  $Xp_t(\%)$  est le taux de conversion des protéines à un instant  $t$  de la réaction,  $A_t$  est le signal d'absorbance de la protéine à l'instant  $t$  et  $A_0$  est l'absorbance initiale de la protéine sans enzyme. L'intégration du signal du pic protéique est transformée en concentration massique de la protéine par la loi de Beer-Lambert en approximant le coefficient d'extinction de masse inconnu ( $\epsilon_{Prot}$ ) de la protéine par les données de Kuipers & Gruppen (2007) :

$$\varepsilon_{Prot} = \frac{\varepsilon_{liaison} \times nb_{liaisons\ peptidiques} + \sum_{i=1}^{20} \varepsilon_{aa_i} \times nb_{aa_i}}{MM_{Prot}} \quad Eq. 89$$

$$C_{Prot} = \frac{Q_v}{V_{ing} \times l} \times \int_{TR_{début}}^{TR_{fin}} \frac{A_{Prot}}{\varepsilon_{Prot}} \cdot dTR \quad Eq. 90$$

Où  $Q_v$  est le débit ( $mL \cdot min^{-1}$ ),  $V_{ing}$  le volume injection ( $\mu L$ ),  $l$  la longueur du trajet optique ( $cm$ ),  $A_{Prot}$  l'air de l'intensité du signal à 214  $nm$  de la protéine,  $\varepsilon_{Prot}$  le coefficient d'extinction de masse de la protéine ( $L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) et  $TR$  le temps de rétention ( $min$ ).

La masse molaire des protéines  $MM_{Prot}$  provient de la base de données UniProt : BnC1 de *Brassica napus* [UniProt - P33523 (CRU1\_BRANA)] pour la cruciférine et Napin-3 de *Brassica napus* [UniProt – P80208 (2SS3\_BRANA)] pour la napine. Le rendement et la pureté de la napine ont été calculées à partir des équations suivantes :

$$Rdm_{Nap} = \frac{C_{Nap}(t)}{C_{Nap}(t_0)} \quad Eq. 91$$

$$Pureté_{Nap} = \frac{C_{Nap}(t)}{C_{Nap}(t) + C_{Cruc}(t)} \quad Eq. 92$$

#### II.4.4. Quantification et qualification des hydrolysats

Selon (Adler-Nissen 1976), la définition du degré d'hydrolyse est le pourcentage du nombre total de liaisons peptidiques dans une protéine qui ont été clivées lors de l'hydrolyse, qui peut être calculé à partir des paramètres  $Xp_t$  et  $\overline{Naa}$ , le nombre d'acides aminés moyens :

$$DH_t(\%) = \frac{1}{\overline{Naa}} \times Xp_t(\%) \quad Eq. 93$$

Le nombre d'acides aminés moyen  $\overline{Naa}$  est calculé comme suit :

$$\overline{Naa} = \frac{n_{aa}}{n_p} \quad Eq. 94$$

Avec  $n_{aa}$  la quantité de matière d'acides aminés et  $n_p$  la quantité de matière (*mole*) des peptides dans l'hydrolysats. Les deux valeurs étant calculées sur base de chaque point  $x$  du chromatogramme représentant le signal d'un mélange peptidique :

$$n_{aa} = Q_v \cdot \int_{TR_{début}}^{TR_{fin}} (C_{Pep_x} \cdot \bar{N}aa_x) dt \quad Eq. 95$$

$$n_p = Q_v \cdot \int_{TR_{début}}^{TR_{fin}} (C_{Pep_x}) dt \quad Eq. 96$$

Avec  $Q_v$  le débit d'élution et  $dt$  la fraction éluee. Suivant les travaux de Bodin *et al.* (2015),  $C_{Pep_x}$  la concentration d'un peptide au point  $x$  du chromatogramme est calculée avec la loi de Beer-Lambert :

$$C_{Pep_x} = \frac{A_x}{\varepsilon_x \cdot l} \quad Eq. 97$$

Avec  $A_x$  l'absorbance du point  $x$ ,  $\varepsilon_x$  le coefficient d'extinction molaire correspondant ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ), et  $l$  la longueur du trajet optique ( $cm$ ). Le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon_x$  est déterminé par :

$$\varepsilon_x = \varepsilon_{liaison} \cdot \left( \frac{MM_x}{\overline{MM}_{aa}} - 1 \right) + \bar{\varepsilon}_{aa} \cdot \left( \frac{MM_x}{\overline{MM}_{aa}} \right) \quad Eq. 98$$

Avec  $\varepsilon_{liaison}$  le coefficient d'extinction molaire d'une liaison peptidique donné par Kuipers et Gruppen (Kuipers & Gruppen 2007),  $MM_x$  la masse molaire au point  $x$ ,  $\overline{MM}_{aa}$  la masse molaire moyenne des acides aminés et  $\bar{\varepsilon}_{aa}$  le coefficient d'extinction moyen des acides aminés, sont calculés à partir de l'aminogramme de la protéine hydrolysée :

$$\overline{MM}_{aa} = \sum_{i=1}^{20} w_i \cdot MM_i \quad Eq. 99$$

$$\bar{\varepsilon}_{aa} = \sum_{i=1}^{20} y_i \cdot \varepsilon_{aa_i} \quad Eq. 100$$

Avec  $MM_i$ ,  $w_i$ ,  $\varepsilon_{aa_i}$  et  $y_i$  correspondant respectivement à la masse molaire, le ratio massique, le coefficient d'extinction molaire et ratio molaire de l'acide aminé  $i$  de l'aminogramme. Enfin, le nombre moyen d'acides aminés du mélange peptidique pour chaque point  $x$  est déterminé par :

$$\bar{N}aa_x = \frac{MM_x}{\overline{MM}_{aa}} \quad Eq. 101$$

La *Figure 28* résume l'utilisation des différentes équations et de l'aminogramme (*Tableau 15*) pour calculer la concentration massique à partir du chromatogramme d'exclusion stérique, et par la suite, différentes autres caractéristiques que ce soit en réaction protéolytique en *batch* ( $X_p$ , distribution des masses), ou en ultrafiltration par la détermination de la courbe d'étalonnage de la rétention. La courbe de rétention permet d'obtenir la rétention réelle, et par la suite de calculer la concentration de part et d'autre de la membrane en chaque soluté  $x$ . Ces données permettent finalement de calculer toute autre caractéristique de l'ultrafiltration en mode CD ou DV, mais aussi en REM (pureté, rendement, *etc.*).

Tableau 15 : Aminogrammes de la cruciférine et de la napine (P33523 (CRU1\_BRANA) et P80208 (2SS3\_BRANA)).

Acide aminé	Masse molaire résidu ( $g \cdot mol^{-1}$ )	$\epsilon$ acide aminé ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	Composition Cruciférine	Composition Napine
<b>A</b>	71,0788	32	33	7
<b>R</b>	156,1875	102	29	7
<b>N</b>	114,1038	136	28	2
<b>D</b>	115,0886	58	20	0
<b>C</b>	103,1388	225	5	8
<b>E</b>	129,1155	78	23	4
<b>Q</b>	128,1307	142	55	27
<b>G</b>	57,0519	21	48	8
<b>H</b>	137,1411	5125	11	4
<b>I</b>	113,1594	45	23	4
<b>L</b>	113,1594	45	44	9
<b>K</b>	128,1741	41	13	7
<b>M</b>	131,1926	980	4	2
<b>F</b>	147,1766	5200	21	3
<b>P</b>	97,1167	30	26	13
<b>S</b>	87,0782	34	38	7
<b>T</b>	101,1051	41	21	4
<b>W</b>	186,2132	29050	5	1
<b>Y</b>	163,176	5375	10	1
<b>V</b>	99,1326	43	33	7
	$\overline{MM}_{aa}$ ( $g \cdot mol^{-1}$ )		117,33	118,14
	$\bar{\epsilon}_{aa}$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )		810,43	654,19

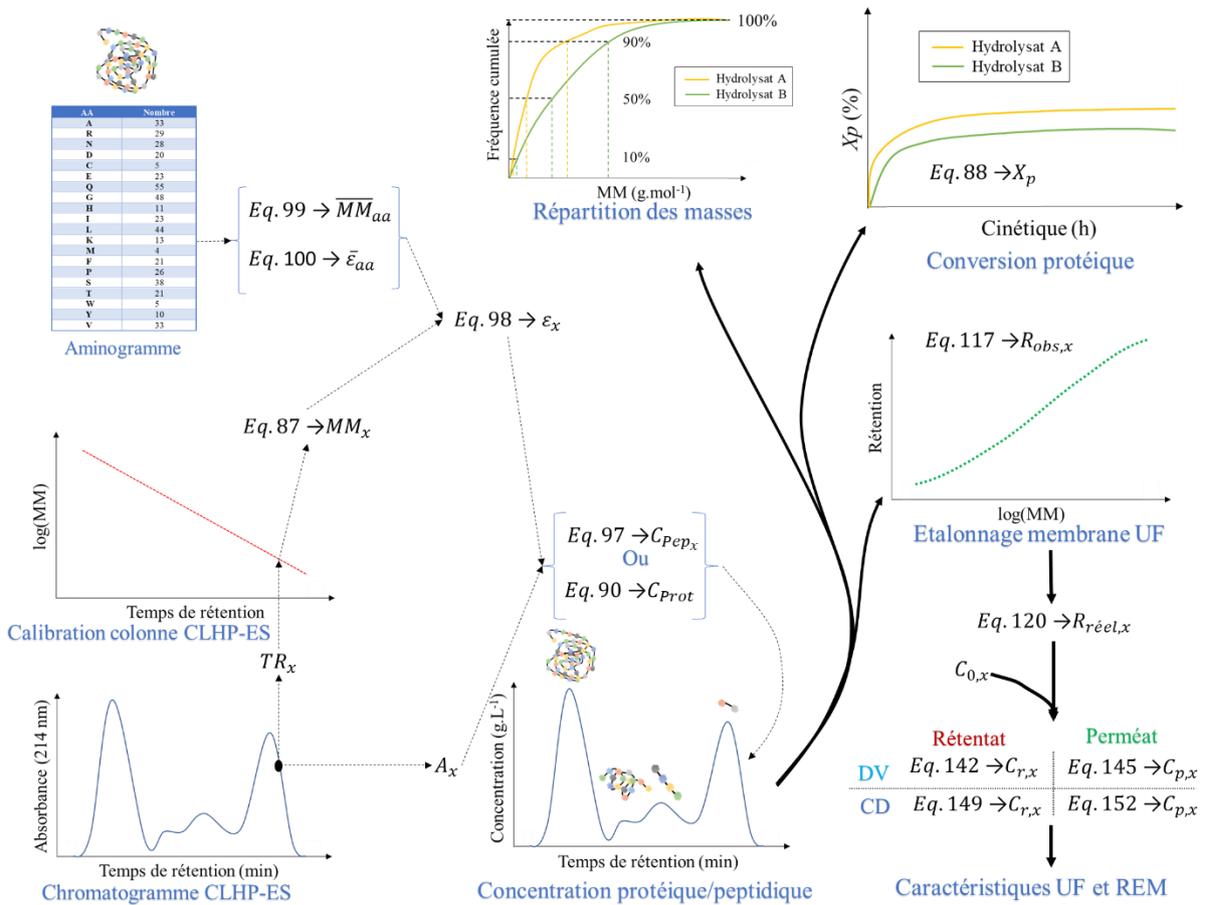


Figure 28 : Méthodologie de transformation du chromatogramme en concentration permettant des quantifications et caractérisation d'hydrolysats protéiques en hydrolyse batch, ultrafiltration, et réacteur enzymatique à membrane.

## II.4.5. Transformation des concentrations modélisées en chromatogrammes

La simulation des chromatogrammes, est faite par la même méthode que celle des concentrations : les mêmes hypothèses de formation ont été prises en compte (groupes de peptides et protéines sont définis par un temps de rétention donné) et les mêmes équations différentielles de lois de vitesse de réaction ont été utilisées (*Figure 29*). A la seule différence que c'est uniquement la valeur de l'apex qui est prise compte, et non plus l'aire. La concentration prédite est enfin représentée en chromatogramme grâce à la pseudo-fonction de Voigt sur la base du chromatogramme de l'hydrolysate expérimental (Ida *et al.* 2000). L'apex est modélisé, les largeurs à mi-hauteur (FWHM) sont ajustées au chromatogramme expérimental ( $f_G$  pour le profil Gaussien et  $f_L$  pour le profil de Lautentz), et la position  $x$  de chaque molécule est conservée à partir du chromatogramme expérimental.

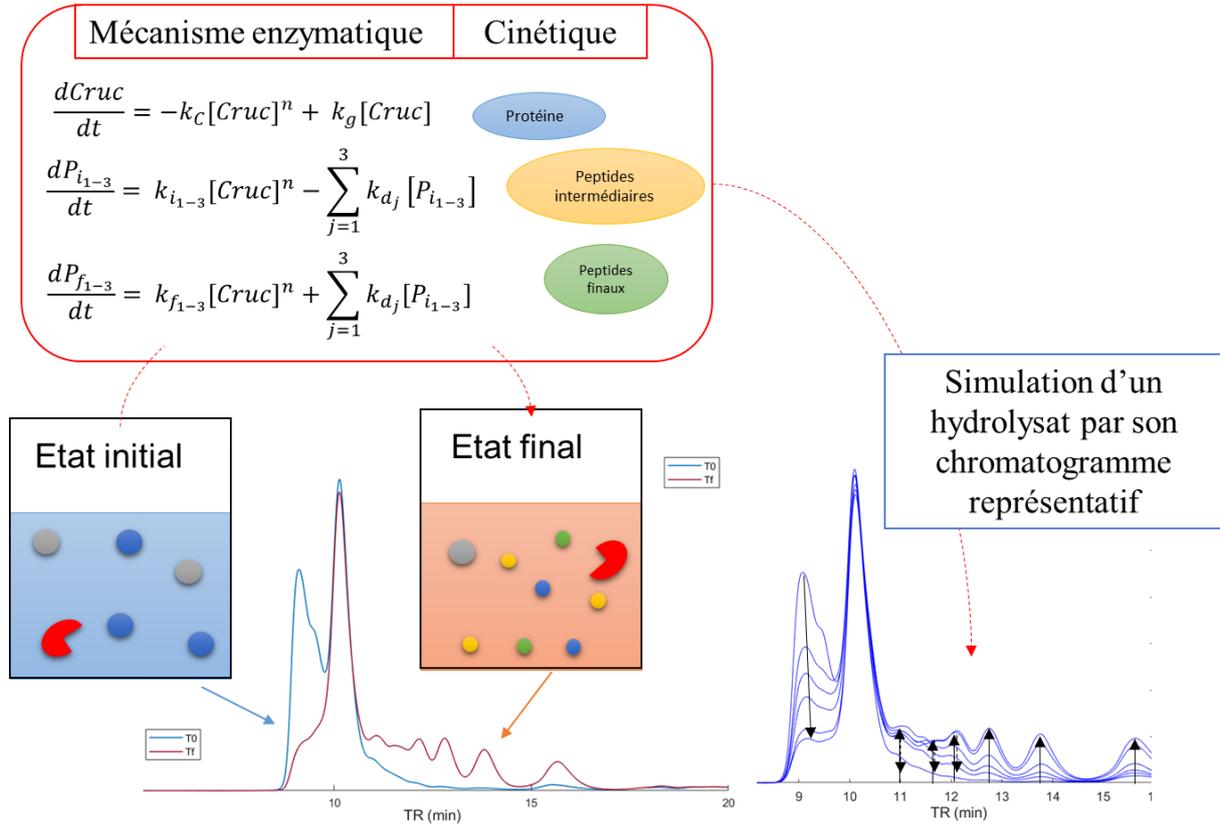


Figure 29 : Méthodologie générale de représentation cinétique d'un l'hydrolysats par chromatogramme. *Cruc* : Cruciférine.  $k_c$  : Constante de déplétion de la protéine (cruciférine).  $P_i$  : Peptide intermédiaire.  $P_f$  : Peptide final.  $k_i$  : Constante d'apparition des peptides intermédiaires à partir de la cruciférine.  $k_f$  : Constante d'apparition des peptides finaux à partir de la cruciférine.  $k_d$  : Constante de disparition des peptides intermédiaires au profit des peptides finaux.  $k_g$  : Constante d'agrégation de la cruciférine (cruciférine non-hydrolysable).

La pseudo-fonction de Voigt ( $V_p(x, f)$ ) est une relation linéaire entre une fonction de Gauss ( $G(x, f)$ ) et de Lorentz ( $L(x, f)$ ), avec la même position et la même aire :

$$V_p(x, f) = \eta \times L(x, f) + (1 - \eta) \times G(x, f) \quad \text{avec } 0 < \eta < 1 \quad \text{Eq. 102}$$

Le facteur de proportionnalité  $\eta$  (appelé aussi facteur de Lorentz) est calculé comme suit :

$$\eta = 1,36603 \times \left(\frac{f_L}{f}\right) - 0,47719 \times \left(\frac{f_L}{f}\right)^2 + 0,11116 \times \left(\frac{f_L}{f}\right)^3 \quad \text{Eq. 103}$$

Enfin le paramètre  $f$  (FWHM globale) est calculé avec la formule suivante :

$$f = (f_G^5 + 2,69269 \cdot f_G^4 \cdot f_L + 2,42843 \cdot f_G^3 \cdot f_L^2 + 4,47163 \cdot f_G^2 \cdot f_L^3 + 0,07842 \cdot f_G \cdot f_L^4 + f_L^5)^{\frac{1}{5}} \quad \text{Eq. 104}$$

## II.5. Mesure d'activité chélatrice ion fer (II)

Les échantillons ont été préparés dans 2,7 mL d'eau ou de méthanol. Les concentrations dans l'échantillon ont été adaptées pour couvrir des taux de chélation du fer (II) de 0% à 100%. L'absorbance des échantillons a d'abord été contrôlée à 560 nm (absorbance  $A_1$ ) dans une cuvette de spectrophotomètre, à température ambiante. Ensuite, 250  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_2$ ) à 500  $\mu\text{M}$  dans l'eau ont été ajoutés. Après 5 minutes, la réaction a été initiée en ajoutant 50  $\mu\text{L}$  d'une solution de FerroZine™ (19,8 mM), et l'absorbance a été enregistrée après 45 secondes ( $A$ ). Les témoins ont été réalisés avec un solvant organique pur et de l'EDTA. La capacité de chélation a été mesurée selon l'équation suivante :

$$\text{Taux de chélation (\%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A)}{A_0} \times 100 \quad \text{Eq. 105}$$

Où  $A_0$  était l'absorbance du témoin ( $\text{FeCl}_2$  et FerroZine™ sans échantillon). Les résultats exprimés en  $\mu\text{M}$  chélatant le fer (II) / mg d'échantillon, ont été exploités par l'équation de relation linéaire du fer (II) chélaté total à différentes concentrations d'échantillon. Les résultats en  $\text{EC}_{50}$  ont été exprimés en tant que quantité (en  $\mu\text{g}$ ) d'échantillons nécessaire pour chélater 50% (~7,9  $\mu\text{g}$ ) de fer (II) issus de  $\text{FeCl}_2$ .

## II.6. Criblage de l'ultrafiltration

### II.6.1. Détermination des résistances

#### II.6.1.1. Résistance membranaire intrinsèque

La résistance membranaire intrinsèque (ou hydraulique) est déterminée dans les conditions de l'hydrolyse, c'est-à-dire que l'eau est mise à 55°C dans la cuve à double enveloppe et à pH 3 avant les mesures de débit de sortie. Le mode était en recirculation totale et la vitesse de recirculation variait de 50 à 150  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$  pour pouvoir appliquer différentes valeurs de  $\text{PTM}$  de 0,4 à 2,4 bar. Le débit de sortie donne la valeur de la densité de flux notée  $J_{flux}$  :

$$J_{flux} = \frac{Q_p}{Surf} \quad \text{Eq. 106}$$

Avec  $Q_p$  le débit volumique du perméat ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ) et  $Surf$  la surface membranaire ( $\text{m}^2$ ). Pour calculer la résistance membranaire intrinsèque, il faut la notion de la perméabilité de la membrane au solvant,  $L_p$ . Intervient alors la loi de Darcy (Eq. 26 p.55 EB), qui établit les conditions d'écoulement d'un liquide de viscosité  $\mu$  à travers un milieu poreux ( $J_{flux}$ ), avec un gradient de pression ( $\frac{dP}{dx}$ ) selon la profondeur du milieu poreux ( $x$ ) :

$$J_{flux} = -\frac{\alpha_p}{\mu} \times \frac{dP}{dx} \quad \text{Eq. 107}$$

Avec l'intégration de cette relation sur le système de la membrane,  $\alpha_p$  est le coefficient de perméabilité ( $m^2$ ),  $dP = PTM$ ,  $dx = e$  l'épaisseur à traverser ( $m$ ). La perméabilité de la membrane  $L_p$  est égale ainsi le rapport de  $\alpha_p$  sur l'épaisseur  $e$  :

$$J_{flux} = \frac{\alpha_p}{\mu} \times \frac{PTM}{e} = \frac{L_p}{\mu} \times PTM \quad \text{Eq. 108}$$

De ce fait, la résistance  $Res_m$  ( $m^{-1}$ ) est l'inverse de la perméabilité  $L_p$ , ce qui donne l'équation finale suivante (Aimar *et al.* 2010a) :

$$J_{flux} = \frac{PTM}{\mu \times Res_m} \quad \text{Eq. 109}$$

Avec  $\mu$  la viscosité dynamique (Pa.s). Etant donné qu'en l'absence d'espèces retenues, le flux de densité à travers la membrane est proportionnel à la  $PTM$ , un premier coefficient de proportionnalité  $L_p^*$  (appelé aussi perméabilité à l'eau, en  $m.Pa^{-1}.s^{-1}$ ) est calculé en traçant une droite (Aimar *et al.* 2010a):

$$f(PTM) = L_p^* \times J_{flux} \quad \text{Eq. 110}$$

Ici  $L_p^*$  comprend la notion de viscosité (Pa.s), dépendante de la température, or la perméabilité doit être une propriété et ne devrait pas dépendre de cette grandeur. La perméabilité membranaire  $L_p$  ( $m$ ) est donc calculée ainsi (Aimar *et al.* 2010a) :

$$L_p = \mu \times L_p^* \quad \text{Eq. 111}$$

Enfin, la résistance intrinsèque de la membrane  $Res_m$  est égale à :

$$Res_m = \frac{1}{L_p} \quad \text{Eq. 112}$$

### II.6.1.2. Résistance de la couche de polarisation

L'hydrolysate lyophilisé des PTC (préparation stock en grande quantité, cf. § II.2.6.1 p.107 *M&M*) a été mis en suspension à  $10 g.L^{-1}$  dans  $150 mL$  d'eau ultra-pure et est amenée à  $55^\circ C$  dans une cuve à double enveloppe, puis le  $pH$  a été ajusté à 3. Le système Titrande maintenait le  $pH$ . La suspension de l'hydrolysate était reliée au système d'ultrafiltration « Aktä s ». La vitesse de recirculation de  $3000 s^{-1}$  a été appliquée pendant 10 minutes en recirculation totale,

puis une  $PTM$  de 1  $bar$  a été appliquée pendant 20 minutes avant le prélèvement des débits. La résistance de la couche de polarisation avec l'hydrolysate optimal est calculée avec le modèle des résistances en série (Fane & Fell 1987). Ce modèle est simple et indique qu'en présence de particules qui peuvent obstruer les pores, de la résistance s'ajoute à celle de la membrane. Il y a donc une résistance totale  $Res_{tot}$  qui est la somme de la résistance membranaire intrinsèque, et celle due à la couche de polarisation ( $Res_{pl}$ ) (Aimar 2006) :

$$J_{flux} = \frac{PTM}{\mu \times Res_{tot}} \quad Eq. 113$$

$$Res_{tot} = Res_m + Res_{pl} \quad Eq. 114$$

$$Res_{pl} = Res_{tot} - Res_m \quad Eq. 115$$

La présence d'une résistance due à l'encrassement ( $Res_{encr}$ ) est négligée et est prise en compte avec la  $Res_{pl}$ .

## II.6.2. Calibration de la rétention des fibres creuses

La rétention des cartouches de fibres creuses a été mesurée en mode de recirculation totale : le perméat et le rétentat étaient recyclés dans le réservoir d'alimentation. L'hydrolysate optimal lyophilisé a été remis en suspension à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  sur base de pureté protéique dans  $150 \text{ mL}$  d'eau, dans une cuve à double enveloppe reliée au bain-marie. La suspension est chauffée à  $55^\circ\text{C}$  puis le  $pH$  est ajusté à 3 avec le système Titrande. S'en suit une recirculation pendant 10 minutes sans application de la pression transmembranaire ( $PTM$ ) puis avec pendant 20 minutes dans les conditions opératoires indiquées dans le *Tableau 16*. Ensuite, le relevé des débits du perméat est effectué, suivi par les prélèvements de  $0,5 \text{ mL}$  du rétentat et du perméat pour les analyses en CLHP. La calibration a été faite en trois fois.

Tableau 16 : Criblage de l'influence des paramètres d'ultrafiltration sur la sélectivité des membranes.

Seuil de coupure ( $\text{kg.mol}^{-1}$ )	Taux de cisaillement ( $\text{s}^{-1}$ )	$PTM$ ( $bar$ )
<b>3</b>	3000	1
<b>5</b>		
<b>10</b>		
<b>30</b>	6000	2
<b>50</b>		
<b>100</b>		

Le taux de cisaillement d'un fluide newtonien dans un tube étant calculé de la manière suivante (Darby 2001) :

$$\dot{\gamma} = \frac{4 \times Q_{30}}{\pi \times r^3} \quad \text{Eq. 116}$$

Avec  $Q_{30}$  le débit du fluide de recirculation passant dans 1 fibre ( $m^3 \cdot s^{-1}$ ), c'est-à-dire le débit total divisé par le nombre de fibres, et  $r$  de rayon de la fibre.

### II.6.2.1. Rétention observée mesurée

La rétention observée d'une molécule  $x$  est directement calculée à partir des chromatogrammes de CLHP-ES du rétentat et du perméat de la manière suivante :

$$R_{obs,x} = 1 - \frac{C_{p,x}}{C_{r,x}} \quad \text{Eq. 117}$$

Avec  $C_{p,x}$  la concentration d'un soluté  $x$  dans le perméat ( $g \cdot L^{-1}$ ),  $C_{r,x}$  la concentration du même soluté  $x$  dans le rétentat ( $g \cdot L^{-1}$ ).

### II.6.2.2. Rétention réelle calculée

Dans le cas où la couche de polarisation serait importante, le calcul de la rétention réelle est effectué :

$$R_{réel,x} = 1 - \frac{C_{p,x}}{C_{m,x}} \quad \text{Eq. 118}$$

Avec  $C_{m,x}$  la concentration à la surface de la membrane ( $g \cdot L^{-1}$ ). La rétention réelle est calculée à partir de la rétention observée selon les équations suivantes :

$$R_{obs} = \frac{1}{1 + \frac{1 - R_{réel}}{R_{réel}} \times e^{Pe_{cl}}} \quad \text{Eq. 119}$$

$$\Leftrightarrow R_{réel} = \frac{R_{obs} \times e^{Pe_{cl}}}{R_{obs} \times e^{Pe_{cl}} - R_{obs} + 1} \quad \text{Eq. 120}$$

Le nombre de Peclet ( $Pe_{cl}$ ) est lié au transport dans la couche limite de diffusion (-). Il est utilisé en transfert thermique et en transfert massique. Il représente le rapport du transfert par convection forcée et du transport par diffusion (thermique ou massique). Il permet d'estimer l'importance relative des fluctuations aléatoires dans un phénomène de transport. De manière générale, le nombre de Péclet est proportionnel au flux de perméation. Pour l'UF, une diminution du taux de rejet est observée avec le flux augmentant : lorsque le flux croît, la polarisation de concentration (et donc la concentration à la membrane) augmente ( $Pe_{cl}$  augmente) favorisant un transfert de soluté (Aimar *et al.* 2010a). La limitation de transfert est

localisée plutôt dans la couche limite de diffusion. Cette approche ne prend pas en compte les possibles effets d'un encrassement/colmatage sur la sélectivité. En UF surtout, le taux de rejet a tendance à augmenter par obstruction partielle ou totale des pores au cours du temps avec le flux croissant. Il est égal à :

$$Pe_{cl} = \frac{J_{flux}}{k_{cl}} \quad Eq. 121$$

$k_{cl}$  étant le coefficient de transfert de matière ( $m \cdot s^{-1}$ ). Il traduit le flux de matière à une interface pour une espèce donnée. Il dépend des propriétés physico-chimiques de la solution et des conditions hydrodynamiques du système. Il est relié à l'épaisseur de la couche limite de diffusion  $\delta$  ( $m$ ) qui définit la zone dans laquelle est localisé le gradient de concentration à l'interface :

$$k_{cl} = \frac{D}{\delta} = \frac{Sh \times D}{d_h} \quad Eq. 122$$

Avec  $D$  le coefficient de diffusion de l'espèce ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ) calculé à partir de la loi de Stokes :

$$D = \frac{k_B \times T}{6 \times \pi \times \mu \times r_h} \quad Eq. 123$$

Avec  $k_B$  la constante de Boltzmann ( $m^2 \cdot kg \cdot s^{-2} \cdot K^{-1}$ ),  $T$  la température ( $K$ ),  $\mu$  la viscosité du solvant ( $Pa \cdot s$ ),  $r_h$  le rayon hydrodynamique de l'espèce à filtrer ( $m$ ). Le rayon hydrodynamique pour chaque molécule est approximé par le convertisseur de Fluidix Analytics ('Hydrodynamic Radius Converter', Cambridge, Royaume-Uni), qui donne la valeur du rayon théorique d'une particule décompactée à partir de sa masse molaire ( $MM$ ) :

$$r_h = 2,10^{-11} \times MM^{0,5679} \quad Eq. 124$$

Le coefficient de transfert de matière est estimé grâce à l'analogie entre le transfert de matière et le transfert de chaleur. Il a donc justement pu être relié empiriquement aux corrélations adimensionnelles du système au moyen du nombre de Sherwood ( $Sh$ ), avec des paramètres hydrodynamiques et physico-chimiques. Dans le cas d'un régime laminaire l'équation est de la forme suivante :

$$\frac{k_{cl} \times d_h}{D} = Sh = \alpha_1 \times (Re \times \frac{d_h}{L_d})^{\alpha_2} \times Sc^{\alpha_3} \quad Eq. 125$$

Avec  $d_h$  le diamètre hydraulique ( $m$ ),  $L_d$  le chemin parcouru par le liquide à l'intérieur du module ( $m$ ),  $Sh$  le nombre de Sherwood (-),  $Re$  le nombre de Reynolds (-),  $Sc$  le nombre de Schmidt (-) et  $\alpha_1 = 1,86$ ,  $\alpha_2 = 0,33$ ,  $\alpha_3 = 0,33$ , les coefficients de détermination expérimentale ont été pris dans la littérature (Aimar *et al.* 2010a). Le nombre de Sherwood est une mesure du transfert de matière convectif rapporté au transfert de masse diffusif ou moléculaire. Le diamètre hydraulique est égal au diamètre de la section du passage dans un tube. Le nombre de Reynolds est calculé comme suit :

$$Re = \frac{\rho \times U \times d_h}{\mu} \quad \text{Eq. 126}$$

Avec  $\rho$  la masse volumique du fluide ( $kg.m^{-3}$ ),  $U$  la vitesse du fluide ( $m.s^{-1}$ ) et  $\mu$  la viscosité dynamique du fluide ( $Pa.s$ ). Le nombre de Schmidt est calculé comme suit :

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \times D} \quad \text{Eq. 127}$$

### II.6.2.3. Mesure de la viscosité

La viscosité de la solution d'hydrolysats initial ( $\mu$  cité précédemment) a été mesurée avec un rhéomètre à déformation imposée (ARES, TA Instruments, New Castle, Etats-Unis) avec le module plat-plat séparé par un entrefer de  $0,8\text{ mm}$ . La contrainte imposée variait entre 100 et  $1000\text{ s}^{-1}$  à  $51^\circ\text{C}$  (température du fluide dans la cartouche de fibres creuses). La viscosité est donnée sur une moyenne de 10 points mesurés. Ainsi, la viscosité de l'hydrolysats est égale à  $\mu_{Hyd} = 8,7 \pm 0,12 \times 10^{-4}\text{ Pa.s}$ . Celle du perméat  $\mu_p = 9,5 \pm 0,72 \times 10^{-4}\text{ Pa.s}$ .

## II.6.3. Mise en œuvre de l'ultrafiltration

### II.6.3.1. Mode concentration discontinue

Dans un réacteur de  $2\text{ L}$  à double enveloppe, l'hydrolysats optimal lyophilisé est remis en suspension à  $10\text{ g.L}^{-1}$  dans  $750\text{ mL}$  d'eau ultra-pure (sur base de pureté protéique). Une fois la température arrivée à  $55^\circ\text{C}$ , l'ajustement à  $pH\ 3$  est réalisé et est maintenu par le Titrando. Ces conditions atteintes, le rétentat et le perméat sont mis en recirculation totale pendant 10 minutes sans *PTM*, puis  $20\text{ min}$  avec *PTM* jusqu'à atteindre une stabilisation de la température et du  $pH$ . L'UF en CD démarre quand le perméat est soutiré, puis l'expérience est stoppée à un facteur de réduction volumique (*FRV*) de 8, et 16 prélèvements de  $0,5\text{ mL}$  au total sont faits dans les deux compartiments (rétentat et perméat). Les échantillons du rétentat sont dilués au même facteur que le *FRV* correspondant avant de les analyser en CLHP. Pour rester dans les

mêmes conditions d'analyse, à tous les échantillons, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  8 M sont ajoutés. Des duplicatas d'expérience ont été faits pour les membranes de 30 et 100  $\text{kg.mol}^{-1}$ .

### II.6.3.2. Mode diafiltration à volume constant

Dans une cuve à double enveloppe, l'hydrolysats optimal lyophilisé est remis en suspension à 10  $\text{g.L}^{-1}$  dans 75 mL d'eau ultra-pure (sur base de pureté protéique). Une fois la température de 55°C atteinte, l'ajustement à  $\text{pH}$  3 est réalisé et est maintenu par le Titrando. Le rétentat et le perméat sont mis en recirculation totale pendant 10 minutes sans  $\text{PTM}$  puis 20 min avec  $\text{PTM}$ . De l'eau ultra-pure, préalablement chauffée à 55°C, est ajoutée au même débit que le débit du perméat. L'expérience est stoppée au 8<sup>ème</sup> diavolume et 16 prélèvements, au total, de 0,5 mL sont faits dans les deux compartiments. Pour rester dans les mêmes conditions d'analyse de CLHP, à tous les échantillons, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  8 M sont ajoutés. Des duplicatas d'expérience ont été faits pour les membranes de 30 et 100  $\text{kg.mol}^{-1}$ .

### II.6.4. Modélisation du flux de perméat en REM à $\text{PTM}$ constante

De l'Eq. 113 p.121 on peut déduire que :

$$Res_{tot} = \frac{PTM}{\mu \times J_{flux}} \quad \text{Eq. 128}$$

Cette équation suppose que la viscosité ( $\mu$ ) du perméat est constante, en général supposée à 20°C (Di Bella & Di Trapani 2019). Or, la résistance membranaire totale étant déterminée empiriquement, et en prévoyant que le système de filtration pourra être mis en place pour divers hydrolysats à différentes températures, l'application du modèle peut être plus générale en admettant que la résistance membranaire totale est dépendante de la viscosité de ce système donné, à la température donnée, et est donc incluse dans la grandeur. L'équation devient alors :

$$Res_{tot} \times \mu = Res_{tot}^* = \frac{PTM}{J_{flux}} \quad \text{Eq. 129}$$

Ainsi, la modélisation du flux de perméat a été adaptée d'après la méthodologie de Yeh *et al.* (2000). Brièvement, le modèle de résistances en série est repris avec la résistance membranaire intrinsèque ( $Res_m$ ), la résistance due aux phénomènes de polarisation ( $Res_{pl}$ ) et d'encrassement ( $Res_{encr}$ ), à la différence que les résistances dépendent de la viscosité ( $\text{Pa.s.m}^{-1}$ ). La résistance  $Res_{encr}$  est modélisée en supposant qu'elle sera proportionnelle à la quantité et à la résistance hydraulique spécifique de la couche de dépôt. La couche de dépôt

est considérée comme étant compressible, et donc proportionnelle à la  $PTM$ . Le modèle de résistances en série et les égalités s'écrivent alors (Yeh *et al.* 2000):

$$J_{flux} = \frac{PTM}{Res_m^* + Res_{pl}^* + Res_{encr}^*} \quad Eq. 130$$

$$Res_{encr}^* = \phi \times PTM \quad Eq. 131$$

$$\phi = \alpha_1 \times U^{\alpha_2} \times C^{\alpha_3} \quad Eq. 132$$

$$\Leftrightarrow J_{flux} = \frac{PTM}{Res_m^* + Res_{pl}^* + \alpha_1 \times U^{\alpha_2} \times C^{\alpha_3} \times PTM} \quad Eq. 133$$

Le débit du perméat est ajusté à la concentration totale dans le rétentat avec les paramètres  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$ , à déterminer lors d'une l'ultrafiltration en concentration discontinue. L'ajustement est fait par la méthode des moindres carrés.

## II.7. Prédiction des performances d'ultrafiltration

### II.7.1. Equations de bilan de matière

Les travaux réalisés par Bodin (2016) ont pu, avec succès, modéliser le process de séparation membranaire de l'hydrolysate de protéines de lait avec la résolution analytique des équations différentielles établies par Muller *et al.* (1999). Or, au cours des essais, il s'est avéré que l'hydrolysate des PTC avait une mauvaise prédiction en diafiltration, due notamment à la présence d'une forte couche de polarisation et d'encrassement, limitant fortement le transfert et ne correspondant plus aux hypothèses simples utilisées. Ce qui n'était pas le cas pour l'hydrolysate de lait, étant donné qu'un simple lavage à l'eau permettait de retrouver les débits en eau d'avant la mise en fonction du procédé. De ce fait, au lieu d'utiliser la valeur de la rétention observée ( $R_{obs}$ ), c'est la rétention réelle ( $R_{réel}$ ), donnée par la concentration à la membrane ( $C_m$ ), qui est utilisée. La concentration à la membrane ne pouvant pas être mesurée directement, la théorie du film est utilisée :

$$J_{flux} = k_{cl} \times \ln \frac{C_m - C_p}{C_r - C_p} \quad Eq. 134$$

$$\Leftrightarrow e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}} = \frac{C_m - C_p}{C_r - C_p}$$

$C_m$  pouvant être noté en fonction de  $C_r$  et  $C_p$  ou en fonction de  $C_r$  et

$R_{réel}$  :

$$C_p = (1 - R_{réel})C_m \quad \text{Eq. 135}$$

$$\Leftrightarrow C_m = (C_r - C_p) \cdot e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}} - C_p = \frac{C_r \times e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}}}{R_{réel} - e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}} \times (R_{réel} - 1)} \quad \text{Eq. 136}$$

La solution de l'équation différentielle en mode diafiltration à volume constant se résout donc de la manière suivante :

### Rétentat

$$d(C_r \cdot V_0) = C_0 \cdot d(V_f) - C_p \times d(V_p) \quad \text{Eq. 137}$$

Ajout d'eau :  $C_0 = 0$

$$\Leftrightarrow d(C_r \cdot V_0) = -C_p \times d(V_p) \quad \text{Eq. 138}$$

Avec l'Eq. 135 :

$$\Leftrightarrow d(C_r) \times V_0 = -(1 - R_{réel})C_m \times d(V_p) \quad \text{Eq. 139}$$

$$\Leftrightarrow \frac{d(C_r)}{d(V_p)} = \frac{-(1 - R_{réel})C_m}{V_0} \quad \text{Eq. 140}$$

Condition initiale :  $C_r(V_p = 0) = C_0$

$$DV = \frac{V_p}{V_r} \quad \text{Eq. 141}$$

$$\Leftrightarrow C_r(V_p) = C_0 \times e^{DV \times \frac{(R_{réel}-1) \times e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}}}{\frac{J_{flux}}{k_{cl}} - R_{réel} \times e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}}}} \quad \text{Eq. 142}$$

### Perméat

$$C_p \cdot V_p = C_0 \cdot V_0 - C_r \cdot V_0 \quad \text{Eq. 143}$$

$C_p$  est considérée comme la concentration des peptides du perméat sortant :

$$\Leftrightarrow C_p = \frac{(C_0 - C_r) \times V_0}{V_p} \quad \text{Eq. 144}$$

Avec l'Eq. 142 on a une équation résolue de la variation de la concentration dans le perméat :

$$\Leftrightarrow C_p(DV) = \frac{C_0 \times \left( 1 - e^{\left( \frac{DV \times \frac{J_{flux}}{k_{cl}} \times (R_{réel} - 1)}{R_{réel} + e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}} - R_{réel} \times e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}}} \right)} \right)}{DV} \quad \text{Eq. 145}$$

En concentration discontinue à volume variable, on a:

### Rétentat

$$\Leftrightarrow d(C_r \cdot V_r) = C_p \times d(V_p) \quad \text{Eq. 146}$$

$$\text{Avec } d(V_p) = d(V_r) \text{ et } C_p = (1 - R_{réel})C_m$$

$$\Leftrightarrow d(C_r) \times V_r + d(V_r) \times C_r = (1 - R_{réel})C_m \times d(V_r) \quad \text{Eq. 147}$$

$$\Leftrightarrow \frac{d(C_r)}{d(V_r)} = \frac{(1 - R_{réel})C_m - C_r}{V_r} \quad \text{Eq. 148}$$

Avec la condition initiale  $C_r(V_r = V_0) = C_0$

$$\Leftrightarrow C_r(FRV) = C_0 \frac{FRV^{R_{réel}}}{R_{réel} - e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}} \times (R_{réel} - 1)} \quad \text{Eq. 149}$$

### Perméat

$$C_p \cdot V_p = C_0 \cdot V_0 - C_r \cdot V_r \quad \text{Eq. 150}$$

$$\Leftrightarrow \text{Avec } V_p = V_0 - V_r$$

$$\Leftrightarrow C_p = \frac{C_0 \times FRV - C_r}{FRV - 1} \quad \text{Eq. 151}$$

En remplaçant  $C_r$  par son expression de l'Eq. 142 on a:

$$\Leftrightarrow C_p(FRV) = C_0 \times \frac{\left( FRV - \frac{FRV^{R_{réel}}}{R_{réel} - e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl}}} \times (R_{réel} - 1)} \right)}{FRV - 1} \quad \text{Eq. 152}$$

## II.7.2. Comparaisons des chromatogrammes

Pour prédire un chromatogramme des concentrations des molécules dans l'hydrolysate, la rétention réelle devait être déterminée pour toutes les molécules présentes, représentées par chaque point  $x$  à chaque point du temps de rétention enregistré. Malheureusement, l'*Eq. 117* appliquée directement entre les chromatogrammes de perméat et rétentat ne présentait pas de profil de courbe exploitable. La différenciation des molécules a alors été discrétisée, un pic correspondant à un groupe de molécules proches en masse molaire, avec un temps de rétention défini à son apex. De cette manière, deux pics de protéines et six pics de peptides sont identifiés et leurs concentrations dans chaque compartiment sont calculées sur l'aire des pics. La rétention observée est ainsi calculée sur 8 masses molaires et est tracée en fonction du logarithme de ces masses molaires. Puis un ajustement sigmoïde (celui qui donne le meilleur ajustement) est réalisé sur toute la plage (*Figure 30 A*) à l'aide d'un programme MATLAB© disponible sur File Exchange (R P 2023). La courbe de la rétention observée est ainsi approximée sur toutes les masses molaires présentes. Elle est utilisée pour calculer la courbe de la rétention réelle avec les formules présentées dans le paragraphe précédent (*Figure 30 B*).

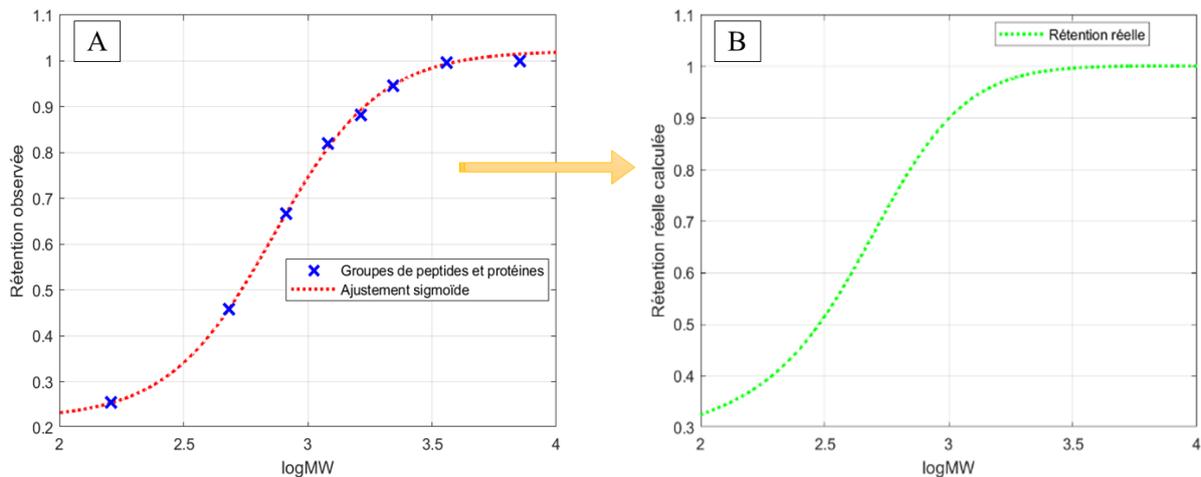


Figure 30 : Exemple de calcul de la rétention réelle sur la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ . (A) Ajustement du modèle sigmoïde sur les rétentions observées des différents groupes de peptides et protéines. (B) Rétention réelle calculée pour toutes les masses molaires présentes dans l'hydrolysate.

Les chromatogrammes peuvent ainsi être modélisés à l'aide des *Eq. 142* et *Eq. 145* pour une séparation en diafiltration et les *Eq. 149* et *Eq. 152* pour une séparation en concentration discontinue. Les *Figure 31* et *Figure 32* montrent les modélisations côté rétentat et perméat pour la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  en mode CD et DF. Les *Figure 33* et *Figure 34* montrent les chromatogrammes correspondant à la membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ , dans les mêmes conditions. Dans l'ensemble, la modélisation est validée dans les mêmes marges d'erreur d'acceptabilité que la modélisation de l'hydrolyse ( $\pm 25\%$ ).

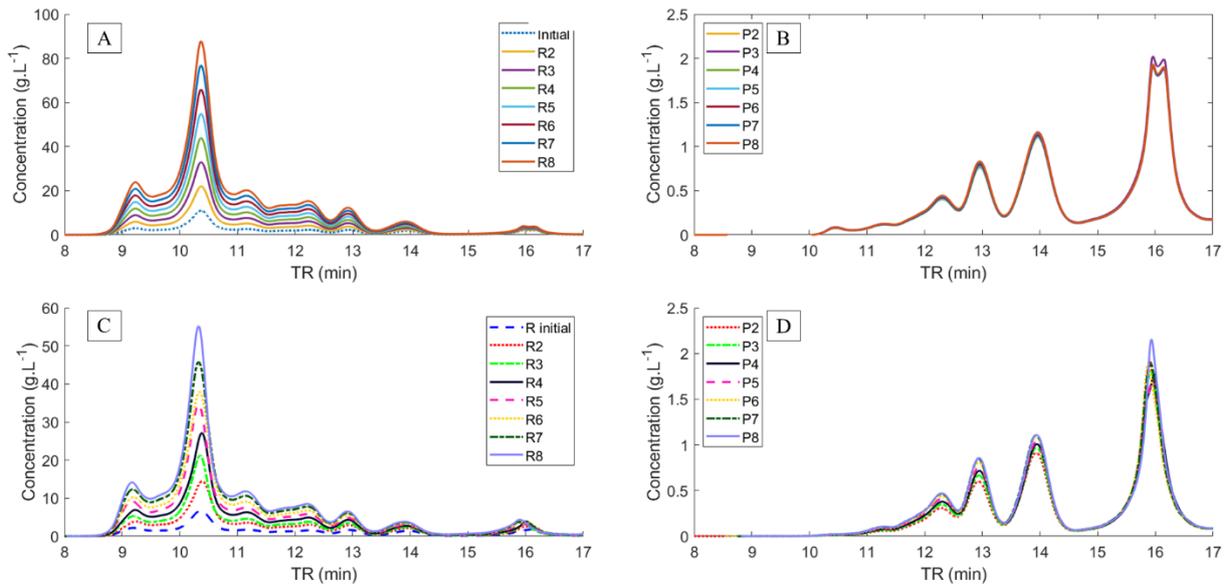


Figure 31 : Chromatogrammes de la membrane de  $30 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  en mode concentration discontinue (FRV 2 à 8), modélisés et expérimentaux ( $nr = 2$ ) pour l'hydrolysats optimal produit (PTM 2 bar –  $3000 \text{ s}^{-1}$  – pH3 –  $55^\circ\text{C}$ ). (A) Rétentat modélisé. (B) Perméat modélisé. (C) Rétentat expérimental. (D) Perméat expérimental.

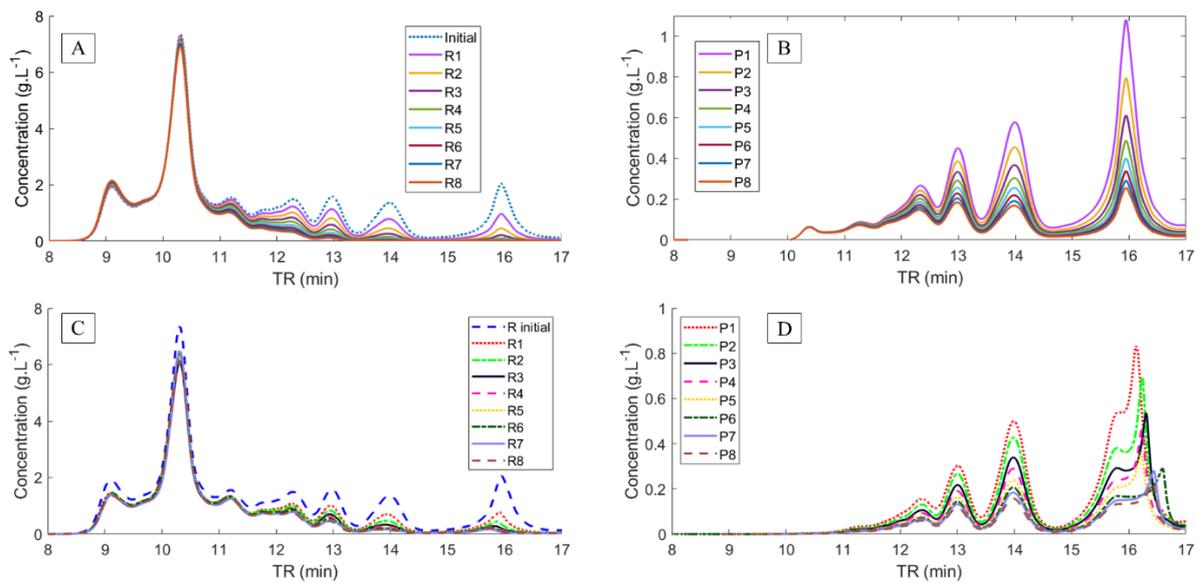


Figure 32 : Chromatogrammes de la membrane de  $30 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  en mode diafiltration (DV 1 à 8), modélisés et expérimentaux ( $nr = 2$ ) pour l'hydrolysats optimal produit (PTM 2 bar –  $3000 \text{ s}^{-1}$  – pH3 –  $55^\circ\text{C}$ ). (A) Rétentat modélisé. (B) Perméat modélisé. (C) Rétentat expérimental. (D) Perméat expérimental.

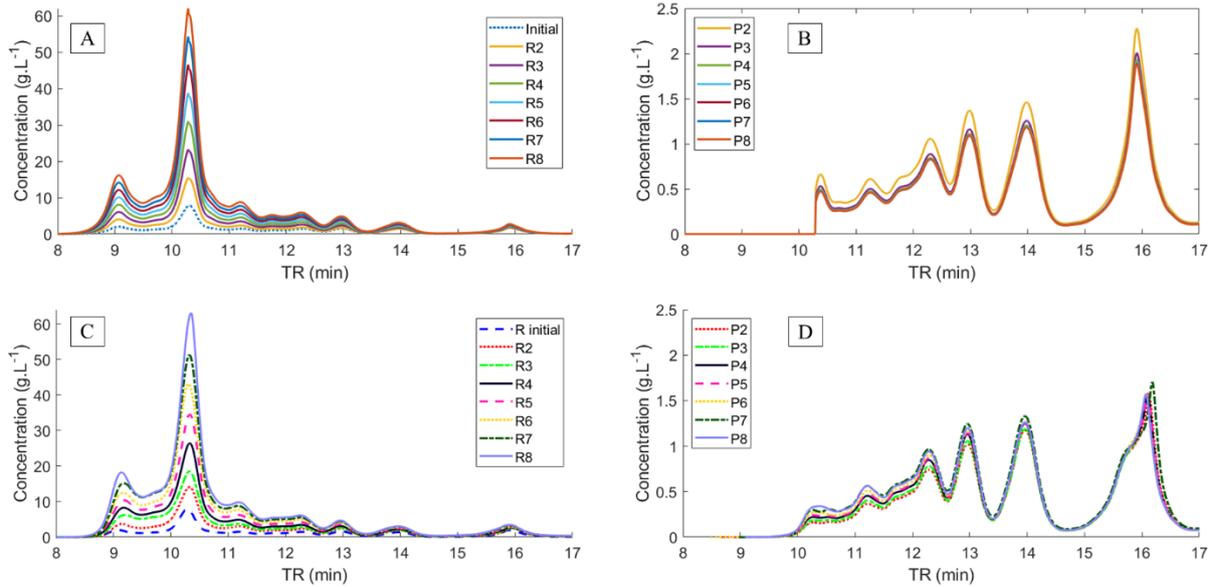


Figure 33 : Chromatogrammes de la membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  en mode ultrafiltration, modélisés et expérimentaux ( $nr = 2$ ) pour l'hydrolysats optimal produit (PTM 2 bar –  $3000 \text{ s}^{-1}$  – pH3 –  $55^\circ\text{C}$ ). (A) Rétenant modélisé. (B) Perméat modélisé. (C) Rétenant expérimental. (D) Perméat expérimental.

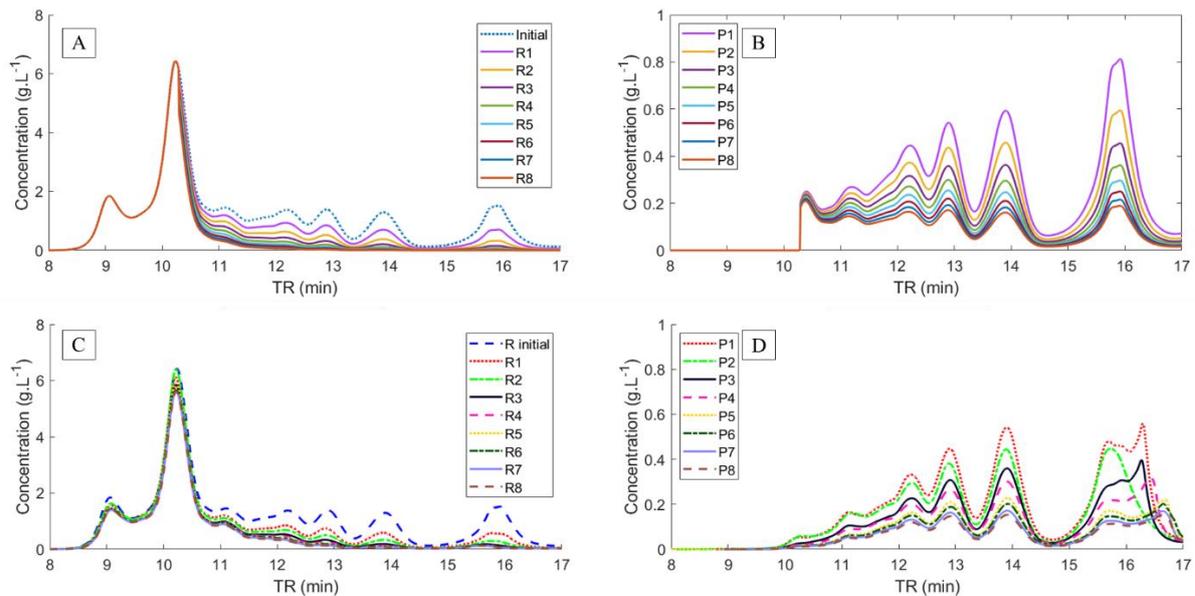


Figure 34 : Chromatogrammes de la membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  en mode diafiltration, modélisés et expérimentaux ( $nr = 2$ ) pour l'hydrolysats optimal produit (PTM 2 bar –  $3000 \text{ s}^{-1}$  – pH3 –  $55^\circ\text{C}$ ). (A) Rétenant modélisé. (B) Perméat modélisé. (C) Rétenant expérimental. (D) Perméat expérimental.

### II.7.3. Calcul des caractéristiques d'UF

A partir des concentrations ainsi prédites, les caractéristiques de l'UF sont calculées. Le rendement en napine dans le rétentat, qui est le ratio entre sa quantité au cours du procédé et sa quantité initiale, est calculé comme suit :

$$Rdm_{Nap} = \frac{[Nap]_r \times V_r}{[Nap]_{r,0} \times V_0} \quad \text{Eq. 153}$$

Le rendement en peptides dans le perméat, qui est le ratio entre la masse des peptides dans le perméat et la masse de peptides initiaux dans le rétentat, est calculé comme suit :

$$Rdm_{pep} = \frac{[Pep]_p \times V_p}{[Pep]_{r,0} \times V_0} \quad Eq. 154$$

La pureté des protéines dans le rétentat (%), qui compte les peptides comme des impuretés dans le rétentat, est calculée comme suit :

$$Pur_{prot} = \frac{[Nap]_r \times V_r + [Cruc]_r \times V_r}{[Pep]_r \times V_r + [Nap]_r \times V_r + [Cruc]_r \times V_r} \times 100 \quad Eq. 155$$

## II.8. Détermination de la taille des composants

### II.8.1. Diffusion dynamique de lumière

La taille des grandes particules et leur agrégation ont été déterminées par diffusion dynamique de lumière. Les suspensions de protéines ou hydrolysats ont été préparées à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  dans un tampon phosphate  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  à  $pH$  3. Les suspensions ont été centrifugées  $5 \text{ min}$  à  $9000 \times g$  et le surnageant a été analysé en cuve plastique de  $1 \text{ cm}$  de trajet optique avec l'appareil Zetasizer Nano-S, Malvern Instruments (Malvern, Grande-Bretagne).

### II.8.2. SDS-PAGE

La migration SDS-PAGE est réalisée sur une matrice composée d'un gel de concentration contenant 5% d'acrylamide et un gel de séparation avec 17% d'acrylamide monté sur l'équipement de Bio-Rad (Hercules, Californie, Etats-Unis). Le marqueur de poids moléculaire est composé de protéines entre 10 et  $250 \text{ kg.mol}^{-1}$  (Bio-Rad, Precision Plus Protein Standard). Les échantillons sont préparés selon la méthode Laemmli en conditions réductrices (2,5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol). La coloration a été effectuée par le bleu de Coomassie G 250 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis). Ensuite, le gel a été plongé dans une solution de décoloration forte, composée à 40% d'éthanol et à 10% d'acide acétique, pour une durée de 30 minutes. Cette étape est renouvelée une fois. Ensuite, une solution de décoloration faible, avec 5% d'acide acétique est utilisée au cours de la nuit.

## II.9. Mise en œuvre du REM

### II.9.1. Détermination de l'activité enzymatique dans le perméat

La recherche de l'activité dans le perméat sur les PTC a été réalisée selon le schéma de la *Figure 35* : premièrement, une hydrolyse a lieu en condition optimisée d'un *batch* dans 150

$mL$  du volume réactionnel ( $55^{\circ}C - pH 3 - E/S 1/448 - 2 h$ ), c'est l'hydrolyse I. Ensuite, une ultrafiltration est réalisée jusqu'à  $FRV = 3$ , pour récupérer  $100 mL$  de perméat. A ce perméat sont ajoutées les nouvelles protéines pour une concentration finale de  $10 g.L^{-1}$  pour relancer une hydrolyse en mode *batch* ( $55^{\circ}C - pH 3 - 2 h$ ), c'est l'hydrolyse II. Des prélèvements sont réalisés pour un suivi en CLHP.

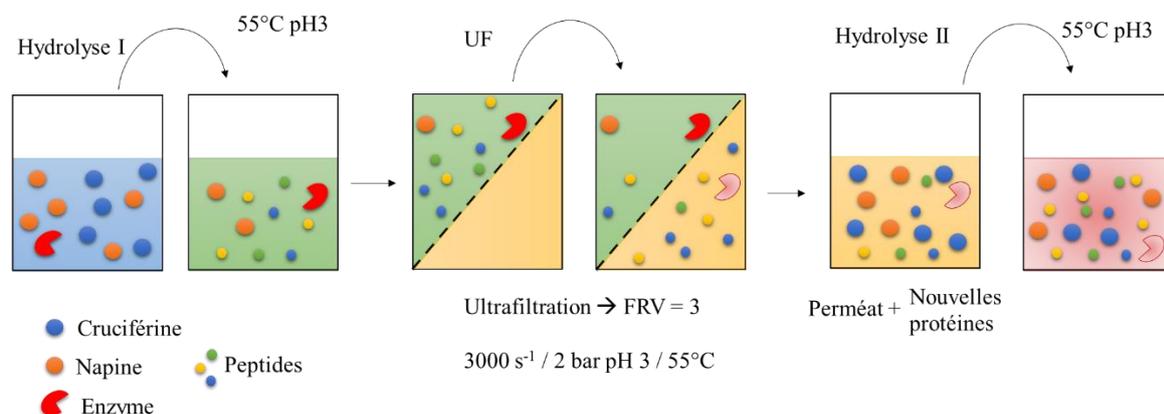


Figure 35 : Schéma de vérification d'activité enzymatique dans le perméat avec un nouveau substrat de PTC.

L'activité enzymatique initiale est évaluée par la disparition de la cruciférine en ajustant l'Eq. 156, qui est le taux de réaction généralisé (Seoud *et al.* 2016) aux termes  $k$  (constante de vitesse) et  $n$  (ordre de réaction), puis en calculant la tangente à la courbe à  $t_0 = 0$  (Eq. 157), dont le terme d'accélération est la vitesse initiale de réaction (Eq. 158) :

$$r_{Cruc} = \frac{[Cruc]_0}{(1 + k \times (n - 1) \times [Cruc]_0^{(n-1)} \times t)^{\frac{1}{(n-1)}}} \quad Eq. 156$$

$$y = \frac{d[Cruc]}{dt}(t_0) \times (t - t_0) + [Cruc]_0 \quad Eq. 157$$

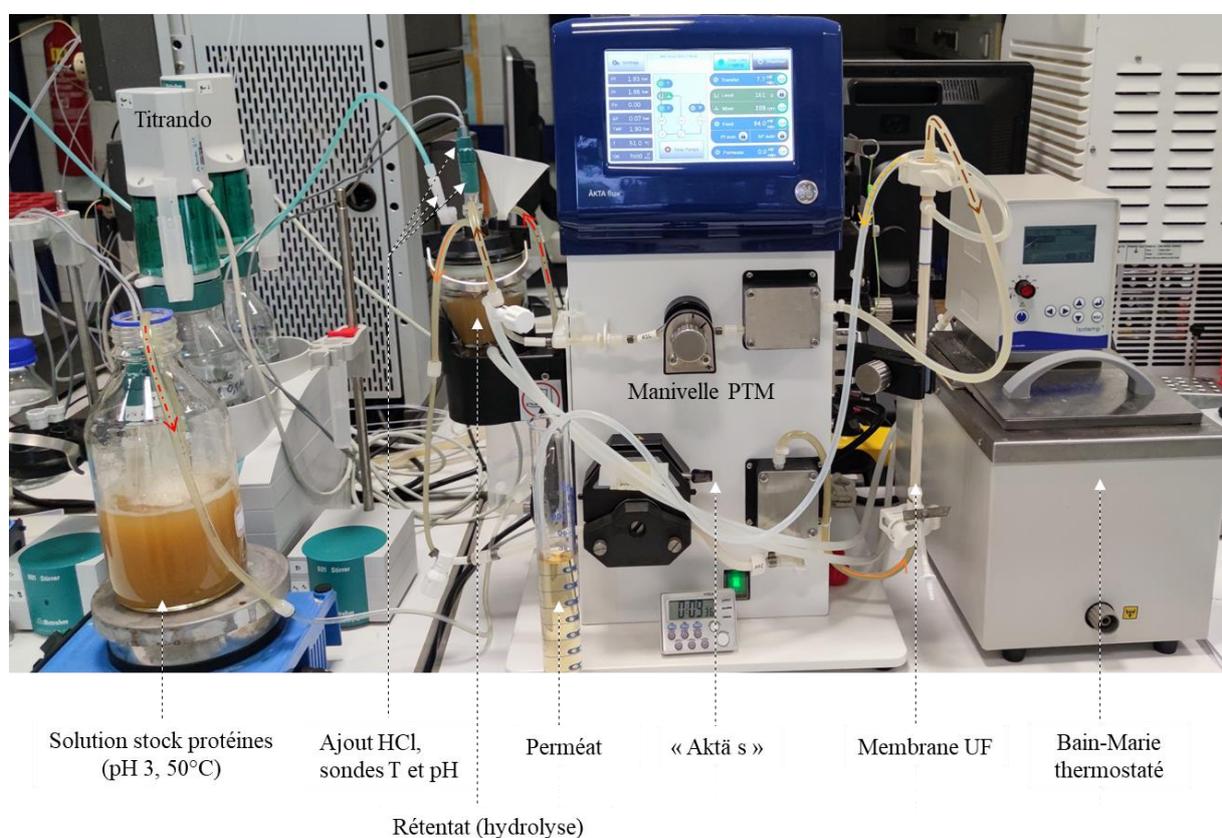
$$Vitesse_{initiale} = \frac{d[Cruc]}{dt}(t_0) \quad Eq. 158$$

L'activité ainsi déterminée dans le perméat est comparée à l'hydrolyse dans les conditions standards du *batch* et termes d'activité résiduelle.

## II.9.2. Montage du réacteur enzymatique à membrane

Le montage REM est présenté en photo par la Figure 36. Le système du Titrande a été couplé à l'unité d'ultrafiltration « Aktä s ». La température du rétentat est maintenue à  $55^{\circ}C$  dans une cuve à double enveloppe reliée au bain-marie. Le  $pH$  du rétentat est régulé automatiquement à  $pH 3$  par ajout de  $HCl 0,5 mol.L^{-1}$ . Le stock de protéines est mis à  $pH 3$  et est maintenu à une température entre  $50$  et  $55^{\circ}C$  pour minimiser l'impact sur le rétentat

équilibré dans la cuve en température et en  $pH$ . En fonctionnement à débit de perméat variable, le débit d'alimentation en protéines ( $Q_a$ ) est calqué sur le débit du perméat ( $Q_p$ ), vérifié à la fin de chaque volume de remplacement ( $VR$ ). C'est le volume de la solution d'alimentation en protéines ajouté égal au volume du rétentat initial. En fonctionnement à débit de perméat constant, la  $PTM$  est ajustée pour avoir un débit de perméat de  $2 \text{ ml. min}^{-1}$  et par conséquent, le débit d'alimentation est fixé à  $2 \text{ ml. min}^{-1}$ . Avant la réaction, la suspension de PTC dans la cuve est amenée à  $55^\circ\text{C}$ , puis à  $pH$  3. Dans un deuxième temps, la pompe de recirculation est actionnée à  $3000 \text{ s}^{-1}$  et le fluide est laissé  $15 \text{ min}$  sans  $PTM$  pour le stabiliser dans ces conditions ( $pH, T$ ).



- > Alimentation à partir réservoir      - - - -> Alimentation à partir de la solution stock
- - -> Retour dans le réservoir            - - - -> Flux perméat

Figure 36 : Photo du montage du réacteur enzymatique à membrane en laboratoire.

Ensuite, une  $PTM$  de  $2 \text{ bar}$  est appliquée pendant  $30 \text{ min}$ , le temps encore une fois de stabiliser le système en termes de  $pH$  et de température. Suite à cela, la  $PTM$  est enlevée et l'enzyme est ajoutée pour l'étape de pré-hydrolyse de  $50 \text{ min}$ . A l'issue de cette étape, la collecte de perméat est démarrée en appliquant une  $PTM$  de  $2 \text{ bar}$  pour le mode à flux variable ou une  $PTM$  de  $0,4 \text{ bar}$  environ, pour un fonctionnement à flux fixe. Un prélèvement de  $0,5$

$mL$  était réalisé à chaque volume de remplacement dans le rétentat et le perméat pour les analyses en CLHP. Également,  $1 mL$  supplémentaire par compartiment a été prélevé pour la vérification de conservation d'activité enzymatique dans le rétentat et la vérification d'absence de perte notable d'enzyme dans le perméat.

Le suivi du REM est réalisé en fonction des volumes de remplacement ( $VR$ ) (Cheryan & Deeslie 1983), c'est-à-dire en fonction du nombre de volumes de la solution stock des protéines ajoutées équivalents au  $V_r$  initial. Etant donné que le débit de la solution stock est calqué sur le débit du perméat, le  $VR$  est calculé comme suit :

$$VR = \frac{Q_p \times t}{V_r} = \frac{V_p}{V_r} \quad \text{Eq. 159}$$

### II.9.3. Valeurs de caractérisation du REM

La conversion protéique membranaire, qui représente la masse de peptides dans le perméat sur la masse des protéines entrées dans le rétentat (initial et solution d'ajout) ( $g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$ ), est calculée comme suit :

$$X_m = \frac{[Pep]_p \times V_p}{[Cruc]_r \times V_r + [Nap]_r} \quad \text{Eq. 160}$$

La consommation d'eau, qui représente les litres d'eau utilisés (équivalent au perméat) par masse de peptides dans le perméat ( $L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$ ), est calculée comme suit :

$$Conso_{eau} = \frac{V_p}{[Pep]_p \times V_p} = \frac{1}{[Pep]_p} \quad \text{Eq. 161}$$

L'index enzymatique, qui représente la masse des peptides dans le perméat sur la masse de l'enzyme utilisée ( $g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$ ), est calculé comme suit :

$$Y_{N/E} = \frac{[Pep]_p \times V_p}{[E]_r \times V_r} \quad \text{Eq. 162}$$

La production, qui représente la masse de peptides dans le perméat sur la durée du soutirage du perméat (modes CD ou DF) ou sur le temps total à partir de l'hydrolyse (mode REM) ( $g_{Pep} \cdot h^{-1}$ ), est calculée comme suit :

$$Pr = \frac{[Pep]_p \times V_p}{t} \quad \text{Eq. 163}$$

Pour les procédés combinés hydrolyse-*batch* avec ultrafiltration en CD ou en DF, la durée d'hydrolyse seule n'est pas comptée. Dans le cas d'une comparaison de ces modes avec les fonctionnements en REM, la durée de la pré-hydrolyse du REM n'est pas comptée non plus. Ensuite, pour les comparaisons des REM expérimentaux et simulés uniquement, le temps total du procédé comprend la pré-hydrolyse et le soutirage du perméat.

L'erreur relative (%) du bilan de matière entre la masse entrée de la cruciférine et les peptides produits (rétentat et perméat) est calculée comme suit :

$$Erreur\ relative_{\substack{entrée \\ sortie}} = \frac{([Cruc]_0 - [Cruc]_t) \times V_r - (([Pep]_{t,r} - [Pep]_{0,r}) \times V_r + [Pep]_{t,p} \times V_p)}{([Cruc]_0 - [Cruc]_t) \times V_r} \quad Eq. 164$$

#### II.9.4. Analyse de sensibilité du modèle protéolytique

Une analyse de sensibilité des paramètres estimés du modèle de l'hydrolyse des PTC a été réalisée afin de valider la significativité du modèle et d'enlever les paramètres (les constantes cinétiques en l'occurrence) non-influents. Le principe est d'étudier la variabilité induite par une petite variation des paramètres autour d'une valeur de référence (Faivre *et al.* 2013). Les paramètres dont les variations induisent une grande amplitude sur la réponse seront donc des paramètres significatifs. Le programme développé par García Mollá (2017) calcule les sensibilités – pour chaque paramètre ajusté au modèle (les constantes  $k_x$ ), avec la dérivation de la réponse initiale ( $C$ , concentration de la protéine et des peptides) par rapport aux réponses modifiées ( $C_x$  de la protéine et des peptides) – approximées par la formule suivante :

$$s_x = \frac{dC}{dk_x} \approx \frac{C_x - C}{\Delta k} \quad Eq. 165$$

Les sensibilités pour chaque molécule (7, une protéine et 6 groupes de peptides), points cinétiques (nombre de prélèvements au cours de la cinétique) et paramètres à ajuster (17 au départ) forment une matrice de sensibilité  $Z$ . S'en suit l'application de l'algorithme suivant (Yao *et al.* 2003) :

- 1) Pour chaque colonne dans la matrice  $Z$ , une amplitude euclidienne est calculée.
- 2) La colonne à la plus grande amplitude désigne le paramètre le plus influent, et est notée  $X_L$  ( $L = 1$  pour la première itération).
- 3) La prédiction de la matrice de sensibilité  $\hat{Z}_L$  est calculée avec la colonne  $X_L$  :

$$\hat{Z}_L = X_L \cdot (X_L^T \cdot X_L)^{-1} \cdot X_L^T \cdot Z \quad \text{Eq. 166}$$

4) Puis la matrice résiduelle  $R_L$  est calculée :

$$R_L = Z - \hat{Z}_L \quad \text{Eq. 167}$$

- 5) La somme des carrés des résidus de chaque colonne de  $R_L$  est calculée. Celle avec la plus grande magnitude correspond au paramètre influent suivant.
- 6) La colonne du paramètre correspondant dans la matrice  $Z$  est utilisée en incrémentation avec la colonne  $X_L$  précédemment décrite. Cette nouvelle matrice est notée  $X_{L+1}$ .
- 7) L'itération est avancée de 1 et les étapes 3) à 6) sont répétées jusqu'à ce que la colonne de la plus grande amplitude dans  $R_L$  soit inférieure à une valeur seuil fixée à 0,04.

Les paramètres (constantes à ajuster) ne montrant pas d'influence, ont été enlevés du modèle cinétique (cf. Eq. 168 - Eq. 169 - Eq. 170 - Eq. 171 - Eq. 172 - Eq. 173 - Eq. 174 p.211 R&D).

## II.10. Tests statistiques

Les échantillons ont été injectés au moins deux fois en CLHP. Les expériences ont été réalisées en double. Les essais de chélation ont été réalisés en triple exemplaire. L'analyse de variance et le test de comparaison multiple (test de Tukey-Kramer) ont été réalisés avec MATLAB® (R2020a, MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, Etats-Unis). L'analyse statistique du test-t à deux échantillons a été réalisée à l'aide de Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, États-Unis). Une différence significative a été considérée à la valeur de  $p < 0,05$ .



# RÉSULTATS & DISCUSSION

### III. Résultats & Discussion

La protéolyse enzymatique est largement utilisée dans l'industrie alimentaire, pour produire des hydrolysats aux propriétés technico-fonctionnelles améliorées des protéines (Fujimaki *et al.* 1970; Yamanishi *et al.* 1996; Neklyudov *et al.* 1999) ou contenant des peptides bioactifs (Kitts & Weiler 2003b). Cela nécessite l'emploi de protéases, enzymes qui hydrolysent spécifiquement les protéines. Les propriétés des hydrolysats dépendent de la nature de l'enzyme, du substrat, de leurs concentrations et des conditions opératoires ( $T$ ,  $pH$ ,  $E/S$ ). Un criblage de propriétés et / ou de bioactivité des hydrolysats permet ainsi de sélectionner les conditions d'obtention d'hydrolysats d'intérêt (Kong *et al.* 2007; Adje *et al.* 2013; Alashi *et al.* 2018; Zhao & Hou).

Dans la plupart des cas, le procédé de protéolyse enzymatique est mis en œuvre en réacteur *batch*. La limitation essentielle du procédé de protéolyse enzymatique reste le coût de l'enzyme et sa productivité relativement faible. En effet, à côté du coût intrinsèque de l'enzyme, la mise en œuvre discontinue entraîne une perte du catalyseur à la fin de la réaction, ainsi que des procédures d'arrêt de réaction, de nettoyage et de redémarrage entre chaque lot (Archer *et al.* 1973; Bhumiratana *et al.* 1977; Rios *et al.* 2004).

Une première approche pour réduire l'impact du coût enzymatique sur les productions en *batch* est de mettre en œuvre des démarches d'optimisation de réaction en recherchant le meilleur compromis coût enzymatique / durée de réaction. Une seconde approche, technologique, consiste à envisager un couplage protéolyse / séparation qui permet de compartimenter l'enzyme et le substrat et de récupérer le produit, l'hydrolysat. Les « Réacteurs Enzymatiques à Membrane » (REM) permettent de réaliser ces productions continues d'hydrolyse de biomolécules (protéines et polysaccharides) (Rios 2012; Rodrigues *et al.* 2013).

Cependant, le développement des REM se confronte à des verrous liés à la complexité du système protéolytique qui dépend des :

- Conditions opératoires permettant le contrôle de la réaction ( $pH$ ,  $T$ ,  $E/S$ ,  $t$ ) et de la séparation membranaire ( $pH$ ,  $T$ ,  $PTM$ , vitesse de circulation, NMWCO, concentration).
- Critères de performances de production (pureté, productivité, consommation d'eau, composition en peptides, *etc.*)

Ainsi, la plupart des études sur la protéolyse en REM reposent sur des démarches exclusivement expérimentales et ne permettent pas d'identifier une méthodologie de

détermination des conditions optimales pour avoir une production stable et optimale d'un hydrolysat d'intérêt. Ce qui limite leur développement pour les coûts et le temps que cela peut engendrer (*cf.* §I.4.1.1 p.80 *EB*).

Deux méthodologies de simulation des procédés de protéolyse et de séparation membranaire en *batch* ont été développées au laboratoire. Celles-ci permettent plus précisément de modéliser :

- Les cinétiques de degré d'hydrolyse (*DH*) et de taux de conversion (*Xp*) des protéines en fonction des conditions opératoires de protéolyse (Beaubier *et al.* 2021a).
- La composition peptidique dans les compartiments d'ultrafiltration au cours de séparation d'hydrolysat en concentration discontinue et diafiltration (Bodin 2016; Beaubier *et al.* 2021b).

Dans le cadre de cette thèse, la première méthode sera adaptée pour l'optimisation de l'obtention d'un hydrolysat d'intérêt de protéines végétales (protéines de colza) au travers de la recherche du meilleur compromis coût enzymatique – durée de réaction en réacteur *batch*. Puis, les deux méthodologies seront couplées de manière à proposer une méthodologie de simulation innovante de prédiction des performances d'un REM pour la production de cet hydrolysat.

► **Chapitre 1 – Modélisation et optimisation de la protéolyse enzymatique *batch***

Identification d'un hydrolysats d'intérêt à produire en REM :

- a. Recherche des conditions opératoires conduisant à l'hydrolysats d'intérêt
- b. Recherche des conditions optimales en *batch* (compromis durée / coût enzymatique)

► **Chapitre 2 – Modélisation de la séparation des hydrolysats en CD et DF**

Identification des membranes et conditions de séparation membranaire :

- a. Couplage le plus adapté avec la protéolyse
- b. Valider l'outil de modélisation de la composition en peptides dans les compartiments en CD et DF

► **Chapitre 3 – Développement de l'outil de simulation d'un REM**

Couplage des outils de simulation cinétique de libération de peptides et séparation :

- a. Développement d'un outil de simulation de la composition en peptides au cours de la protéolyse
- b. Valider expérimentalement la méthodologie
- c. Recherche *in silico* l'*optimum* de fonctionnement du REM

### III.1. Modélisation et optimisation de la protéolyse enzymatique *batch*

Dans le cadre de l'importance du développement de l'utilisation des protéines végétales, l'étude est réalisée sur l'isolat des protéines totales du colza, plante oléagineuse dont la région Grand-Est est la principale productrice en France. Le laboratoire LRGP a de plus, étroitement collaboré avec le groupe Avril (acteur principal du secteur des huiles et des protéines) afin de développer et mettre en œuvre la valorisation de co-produits de leur filière de production d'huile de colza, les tourteaux de colza. Ces travaux ont abouti à des brevets de procédés de production d'isolats protéiques (Defaix *et al.* 2019b). Ainsi la suite des travaux concerne l'exploitation de la fonctionnalité de ces isolats protéiques. Les travaux de Beaubier (2019) ont été axés sur la valorisation des albumines (napines) de colza, en développant leurs propriétés émulsifiantes et moussantes. Pour la suite des travaux, en l'occurrence dont fait l'objet cette thèse, l'accent est mis sur l'exploitation des protéines totales du colza.

Le colza (*Brassica napus* L.) appartient à la grande famille des *Brassicaceae*, anciennement Crucifères, nom dû à l'arrangement des pétales de leurs fleurs en croix, et aussi connue comme la famille des moutardes. Le genre des *Brassica* comprend 41 espèces, dont le colza, la moutarde, le chou et le navet, et leurs sous-espèces et variétés, relèvent d'une importance économique et sont utilisées en cultures oléagineuses, maraichères et fourragère (Velasco *et al.* 1998). Le colza (*Brassica napus* L.) est un croisement naturel entre le chou (*Brassica oleracea*) et la navette (*Brassica rapa*), survenu il y a ~7 500 ans en Europe (Chalhoub *et al.* 2014). Cette hybridation a donné des graines plus riches et matières grasses, pouvant en être composées de 40 à 45%. Aujourd'hui, l'huile de colza représente plus de 50% des huiles produites et utilisées en Europe, devançant le tournesol et le soja (consommation et biodiesel), l'Allemagne et la France étant les plus gros producteurs de colza en Europe (Tayyib 2016; Krautgartner *et al.* 2018). De ce fait, le déshuilage mondial de graines de colza s'est fortement développé, faisant du tourteau de colza le deuxième tourteau oléagineux produit dans le monde (après le tourteau de soja) avec quelque 33,6 millions de tonnes en 2012 (Carré & Pouzet 2014). Un co-produit de telle importance (et riche en protéines) a été rapidement employé pour l'alimentation animale, sollicitant des protéines, en remplacement des tourteaux de soja, qui sont deux fois plus chers (Angelovičová & Angelovič 2013; Ivanova *et al.* 2016).

Les graines de colza ne sont pas assez riches en protéines, 20% (Terre Univia 2020) contre 37% pour les graines de soja (Debruyne 2001). En revanche, les tourteaux de colza, une fois l'huile extraite, voient leur teneur en protéines augmenter jusqu'à 38% (Paciorek-Sadowska *et al.* 2019). Cela devient ainsi intéressant pour une exploitation plus recherchée des protéines

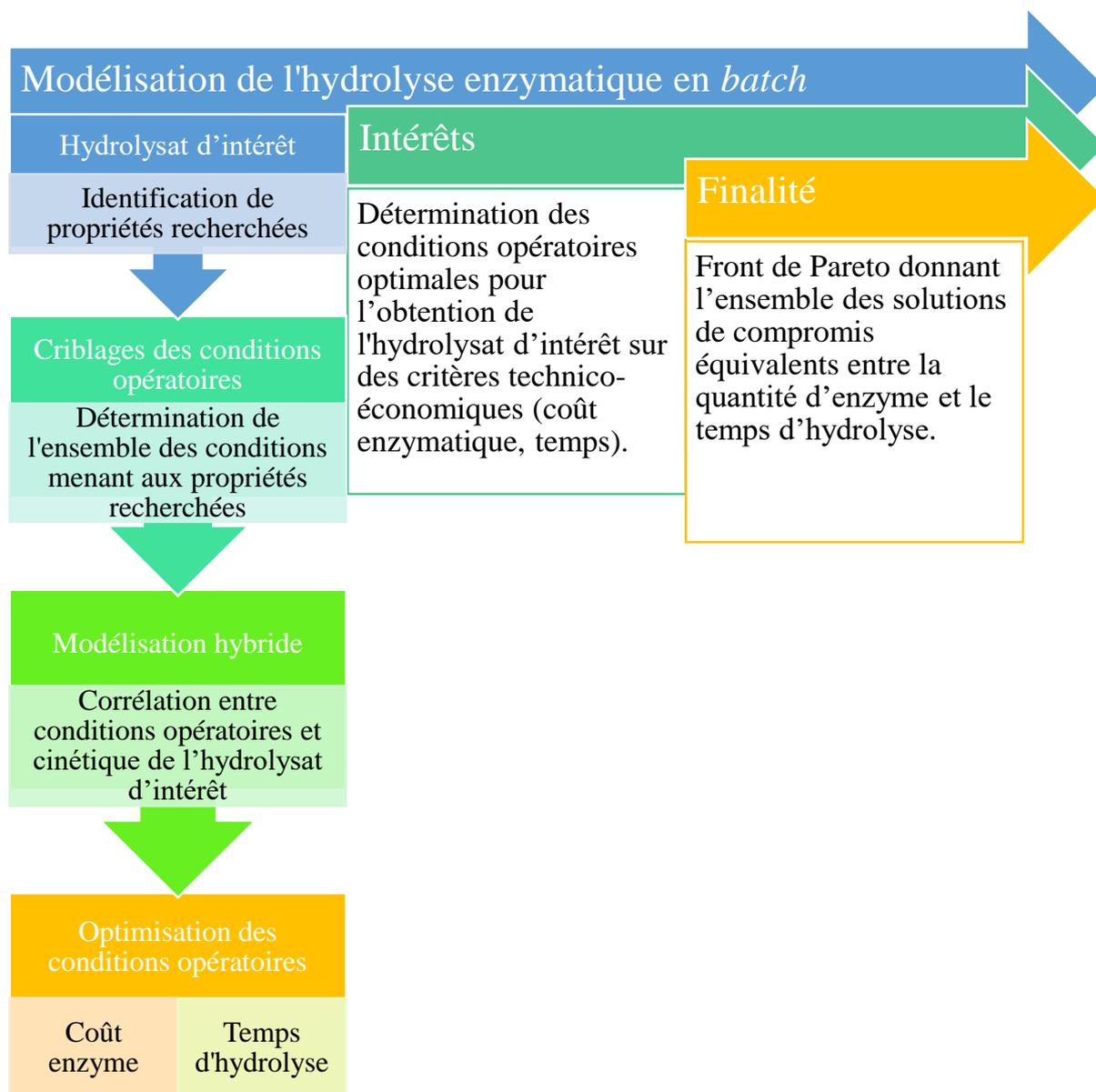
(Carré *et al.* 2015), notamment pour des activités biologiques. En effet, des biopeptides ont été mis en évidence avec des activités d'inhibition d'ACE (Marczak *et al.* 2003; He *et al.* 2013), d'hypocholestérolémie (Yoshie-Stark *et al.* 2008) ou encore anti-radicalaire (Zhang *et al.* 2010; Yu *et al.* 2013).

Les protéines totales de colza (PTC) se distinguent en deux fractions majeures : les globulines 12S, également appelées cruciférines, et les albumines 2S ; aussi appelés napines (Wanasundara 2011). Les napines représentent de 13% à 46% de la teneur totale et sont des protéines de faible poids moléculaire ( $12,7-15 \text{ kg.mol}^{-1}$  ('www.uniprot.org - UniProtKB/Swiss-Prot')) constituées de deux chaînes peptidiques liées par des ponts disulfures (Ericson *et al.* 1986; Josefsson *et al.* 1987; Raab *et al.* 1992; Shewry *et al.* 1995). Les cruciférines représentent de 26% à 65% de la teneur totale, et ont un poids moléculaire élevé ( $300-340 \text{ kg.mol}^{-1}$  ('www.uniprot.org - UniProtKB/Swiss-Prot')) avec une structure en hexamères liés par des liaisons covalentes et non covalentes (Dalgalarondo *et al.* 1986; Raab *et al.* 1992).

L'intérêt accru de ces protéines vient des bioactivités qu'elles peuvent présenter en fonction des conditions et des enzymes employées. Ainsi, une étude antérieure du laboratoire a mis en évidence une activité chélatrice de métaux des peptides ( $61,4 \pm 5,90 \mu\text{M}$  de chélateur du fer(II) / *mg* de peptide) issue d'une hydrolyse sélective de la cruciférine par la protéase ProlyvePAC® (Durand *et al.* 2021a). La chélation des métaux est une préoccupation importante, car ces derniers sont responsables de l'oxydation des lipides dans les aliments, provoquant un goût rance, et à terme, une dégradation organoleptique des aliments (Skibsted 2010). Ceci est d'autant plus intéressant qu'avec une hydrolyse sélective, la fraction de napines est restée intacte, les napines ayant déjà l'activité antimicrobienne intéressante (Malabat *et al.* 2001; Nioi *et al.* 2012; Wanasundara *et al.* 2016). Ainsi, cette hydrolyse sélective pourrait conduire à une double valorisation de produits à haute valeur ajoutée pour des applications de sécurité alimentaire, avec des peptides bioactifs issus des cruciférines d'une part, et des napines purifiées d'autre part, à action antimicrobienne.

L'étude de ce chapitre se consacre donc au développement et à la mise en œuvre d'une méthodologie pour modéliser et optimiser l'hydrolyse sélective des protéines totales de colza avec l'enzyme ProlyvePAC®. Pour ce faire, trois grandes étapes ont été suivies. La première étant l'identification des conditions opératoires permettant l'obtention systématique de cet hydrolysats aux propriétés chélatrices (*pH*, la température et ratio *E/S*). La deuxième étape a été la modélisation des réactions cinétiques dans la plage des conditions identifiées du

mécanisme cible, basée sur la méthodologie de Beaubier *et al.* (2021a). Les cinétiques de dégradation des cruciférines et la pureté des napines ont été modélisées. Ensuite, l'optimisation de l'hydrolyse sélective est effectuée sur des critères technico-économiques, à savoir le temps de réaction et le coût enzymatique. Le maintien de l'activité chélatrice des métaux des peptides obtenus dans les conditions optimales d'hydrolyse sélective identifiées a été contrôlé.



### III.1.1. Optimisation des conditions d'obtention de l'hydrolysat d'intérêt en *batch*

#### III.1.1.1. Description de l'hydrolysat d'intérêt

Un hydrolysats des PTC avec une double valorisation a été identifié : d'une part, il conservait les napines, et d'autre part, l'hydrolyse des cruciférines découlait sur des peptides chélateurs. Le chromatogramme d'exclusion stérique (CES) est présenté par la *Figure 37* qui montre cette hydrolyse sélective.

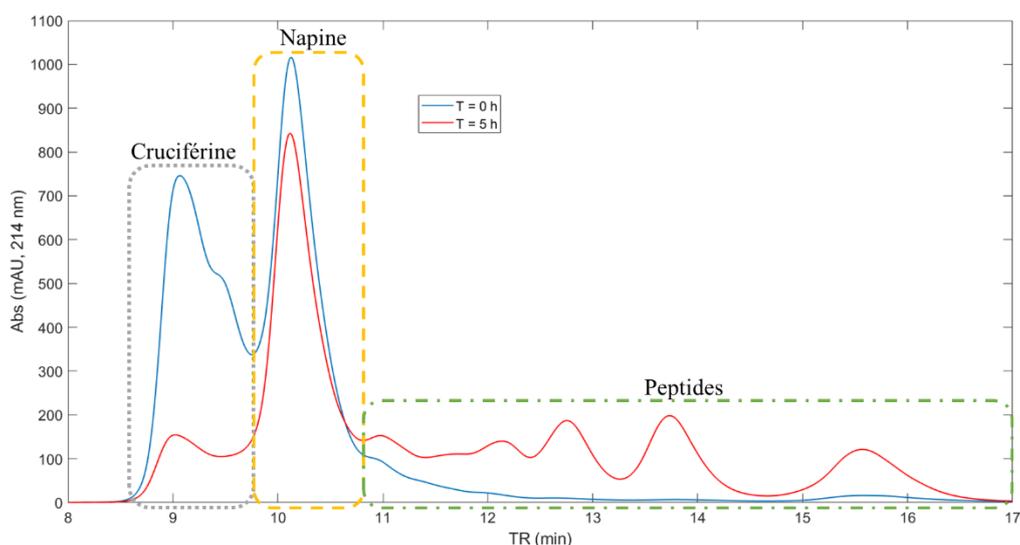


Figure 37 : Chromatogramme de l'isolat des PTC (ligne bleue) et de l'hydrolysats (50°C - pH3 - E/S 1/500 - 7h) de la ProlyvePAC® des PTC (ligne rouge).

Les premiers pics du chromatogramme correspondent aux cruciférines, suivis du pic des napines. Le signal des cruciférines s'étend de 8,5 à 9,7 *min* et le signal des napines de 9,7 à 10,8 *min* de temps de rétention. L'étalonnage de la colonne Biosep2000 avec les protéines standards a donné deux pentes ( $R^2 > 98$ ), indiquant une masse molaire de 96,3  $kg.mol^{-1}$  pour la cruciférine et 12,3  $kg.mol^{-1}$  pour la napine. La taille dans ces conditions correspondrait à un dimère de la cruciférine. Une confirmation de la présence de protéines a été faite à ces emplacements par SDS-PAGE et a bien montré des bandes à 53,8  $kg.mol^{-1}$  pour les monomères visibles de la cruciférine et 14,8  $kg.mol^{-1}$  pour la napine. L'étalonnage de la colonne avec 38 peptides standards montre que les peptides de l'hydrolysats commencent à 10,7 *min* et se terminent à 17 *min*, comprenant les masses entre 2500 et 200  $g.mol^{-1}$ . Les acides aminés libres sont compris dans le dernier pic des peptides, à partir de 15 *min*. Diverses enzymes et conditions opératoires ont été criblées, mais cet hydrolysats particulier avec cette propriété chélatrice a été obtenu uniquement avec la ProlyvePAC® et les PTC à 50°C, pH 3, un ratio E/S de 1/500 au bout de

7 h de réaction. Cependant, ces conditions opératoires ne sont pas optimales du point de vue du coût enzymatique et du temps de la réaction. C'est ainsi l'objectif visé de ce chapitre : la recherche des conditions opératoires permettant d'optimiser économiquement la production de cet hydrolysats d'intérêt tout en gardant ses propriétés.

### III.1.1.2. Hypothèses et méthodologie

Pour les études mécanistiques, deux hypothèses de clivages sont employées : le *one-by-one* et le *zipper*. Le *one-by-one* est décrit comme une hydrolyse où l'enzyme coupe une molécule à la fois, car le site de coupure est disponible progressivement alors que l'action enzymatique est très rapide. Cela se traduit par l'observation de l'ensemble des fractions de peptides présents depuis le début de la réaction et dont les concentrations augmentent au cours du temps. Dans le cas du mécanisme *zipper* en revanche, la disponibilité des sites de clivages est telle que l'enzyme ne peut pas tout couper en même temps, ainsi des peptides intermédiaires sont observables, qui seront à leur tour clivés et dont les fragments vont s'ajouter aux fractions des peptides finaux. La concentration de ces peptides intermédiaires sera donc élevée au début de l'hydrolyse, mais ils seront épuisés à la fin, en théorie (Linderstrom-Lang 1953). Une autre hypothèse est alors avancée : si la composition des différentes fractions de peptides issus d'un certain mécanisme (aussi définie par un degré d'hydrolyse ( $DH$ ) et le taux de conversion ( $Xp$ )) possède des propriétés spécifiques, et si différents jeux de conditions opératoires conduisent à un même mécanisme (donc aux mêmes fractions peptidiques), alors les propriétés seront les mêmes quelles que soient ces conditions opératoires pour obtenir ces fractions. Cela permet ainsi d'associer une propriété de l'hydrolysats à un mécanisme et aux  $DH$  et  $Xp$  particuliers.

Cette hypothèse est importante, car les conditions opératoires ( $E/S$ ,  $T$ ,  $pH$ ) ont énormément d'influence sur la cinétique et les critères de la protéolyse. Par exemple, plus le ratio  $E/S$  est grand (quantité en enzyme élevée par rapport au substrat), plus les coupures enzymatiques seront rapides, la conversion protéique maximale ( $Xp$ ) est rapidement atteinte et le mécanisme peut être changé du *zipper* en *one-by-one* (Vorob'ev et al. 1986). La température et le  $pH$  jouent également sur la vitesse de réaction, l'enzyme ayant une plage d'activité optimale et un  $pH$  de fonctionnement précis d'une part, et d'autre part, la température et le  $pH$  module les protéines-substrat, changent leur conformation, ce qui rend les sites de clivages plus ou moins faciles d'accès.

Ainsi, de ce postulat, découle une méthodologie d'optimisation des conditions opératoires pour l'obtention de l'hydrolysats d'intérêt :

- 1) Identification du mécanisme réactionnel conduisant à l'hydrolysate d'intérêt et criblage des conditions permettant d'avoir le même mécanisme que celui recherché.
- 2) Régression des constantes cinétiques de l'hydrolyse des cruciférines et implémentation dans un plan d'expérience.
- 3) Modélisation cinétique dans la gamme de conditions opératoires conduisant au mécanisme souhaité.
- 4) Utilisation des modèles par des algorithmes permettant d'identifier les meilleurs compromis entre la quantité d'enzyme utilisée (coût) et la durée de réaction.

### III.1.1.3. Criblage des conditions opératoires

L'évolution des concentrations peptidiques avec le mécanisme *one-by-one* est strictement croissante sur la durée de l'hydrolyse, donc visuellement sur le chromatogramme d'ES cela se traduit par une augmentation uniforme de tout le signal peptidique. Le mécanisme *zipper* étant caractérisé par une augmentation, puis une diminution de la concentration en peptides intermédiaires, l'évolution de son chromatogramme d'ES sera alors divisée en deux parties : une fraction du signal peptidique, les plus gros peptides, augmentera puis diminuera, et la deuxième fraction, composée de plus petits peptides, augmentera progressivement. Une méthode de détermination rapide de ces mécanismes a ainsi été publiée par le laboratoire (Beaubier *et al.* 2019b, 2021a) : grâce à la cinétique évaluée par des chromatogrammes, qui donnent la répartition des masses de l'hydrolysate, une quantification simultanée du  $X_p$  et du  $DH$  a pu être réalisée sur les systèmes d'hydrolyse de l'enzyme Alcalase® 2,4L avec l'albumine du sérum bovin et la napine du colza. Ensuite, en traçant un graphique de l'évolution du  $X_p$  (déplétion des protéines) en fonction du  $DH$  (nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre des liaisons totales) des courbes particulières, caractérisant le mécanisme opérant, ont pu être distinguées : le *one-by-one* (Alcalase/napine) se caractérise par une évolution droite avec une pente douce, alors que pour le *zipper* (Alcalase/albumine du sérum bovin) la pente est plus raide au départ, puis très progressive par la suite. Ainsi, en évaluant de cette manière le mécanisme, les gammes des conditions opératoires de son obtention sont rapidement identifiées. La même méthodologie est donc appliquée pour le système étudié de l'hydrolyse des PTC par la ProlyvePAC®.

La sélection des conditions intéressantes pour la production de l'hydrolysate d'intérêt a été faite en ciblant le rendement en napines supérieur à 0,8 et la pureté en napines supérieure à 80%.

Les conditions opératoires appliquées ont été choisies selon les recommandations du fournisseur : le *pH* allant de 2,5 à 5, la température allant de 40°C à 60°C, et le rapport *E/S* allant de 1/100 à 1/1000 ( $g_E \cdot g_S^{-1}$ ) (cf. §II.2.2 p.106 *M&M*).

La *Figure 38* présente les analyses cinétiques en chromatogrammes bruts des quelques expériences marquées par leurs différents hydrolysats obtenus. La *Figure 38 A* montre un hydrolysats obtenu à *pH* 2,5, 50°C et *E/S* de 1/500. La napine est intacte et la cruciférine est hydrolysée à 75%. La *Figure 38 B* montre un hydrolysats obtenu à *pH* 3, 50°C et *E/S* de 1/500. La napine est légèrement hydrolysée et la cruciférine est hydrolysée à 80%. L'hydrolyse totale de la cruciférine n'est jamais observée même après 24 h de réaction. Cela peut s'expliquer par un effet de désactivation de l'enzyme (d'inhibition par les produits, désactivation thermique) (Zapata-Montoya *et al.* 2018), et/ou par une agrégation ou gélification de la cruciférine, propriété pour laquelle elle est connue (Wanasundara *et al.* 2016). La *Figure 38 C* montre un hydrolysats obtenu à *pH* 4, 50°C et *E/S* de 1/500. La napine est hydrolysée à 64% et la cruciférine est hydrolysée à 83%. Enfin, la *Figure 38 D* montre un hydrolysats obtenu à *pH* 5, 50°C et *E/S* de 1/500. La napine est hydrolysée à 58% et la cruciférine est hydrolysée à 36%.

La *Figure 39* présente l'évolution de la conversion protéique (*Xp*) en fonction du degré d'hydrolyse (*DH*) de toutes les expériences du criblage et ainsi donne un rapide et simple coup d'œil sur les mécanismes mis en jeu. En effet, Beaubier *et al.* (2021a) ont montré qu'une même tendance de ces courbes renseigne si le même mécanisme général a lieu, et discrimine les différences entre les hydrolyses suivies. Par conséquent, un même mécanisme d'hydrolyse a lieu de *DH* 0 à 3%, correspondant à un taux de conversion des protéines de 30%. Au-delà du *DH* 3%, deux mécanismes distincts ont été clairement observés dans le domaine des conditions appliquées. Les deux mécanismes seraient alors influencés par la valeur du *pH* (*pH* 3 vs 4 et 5). En effet, à une valeur *DH* donnée, deux valeurs de *Xp* différentes peuvent être obtenues en fonction du *pH* appliqué (comme exemple, à *DH* 6%, le *Xp* était d'environ 44% à *pH* 3 et environ 52% à *pH* 4).

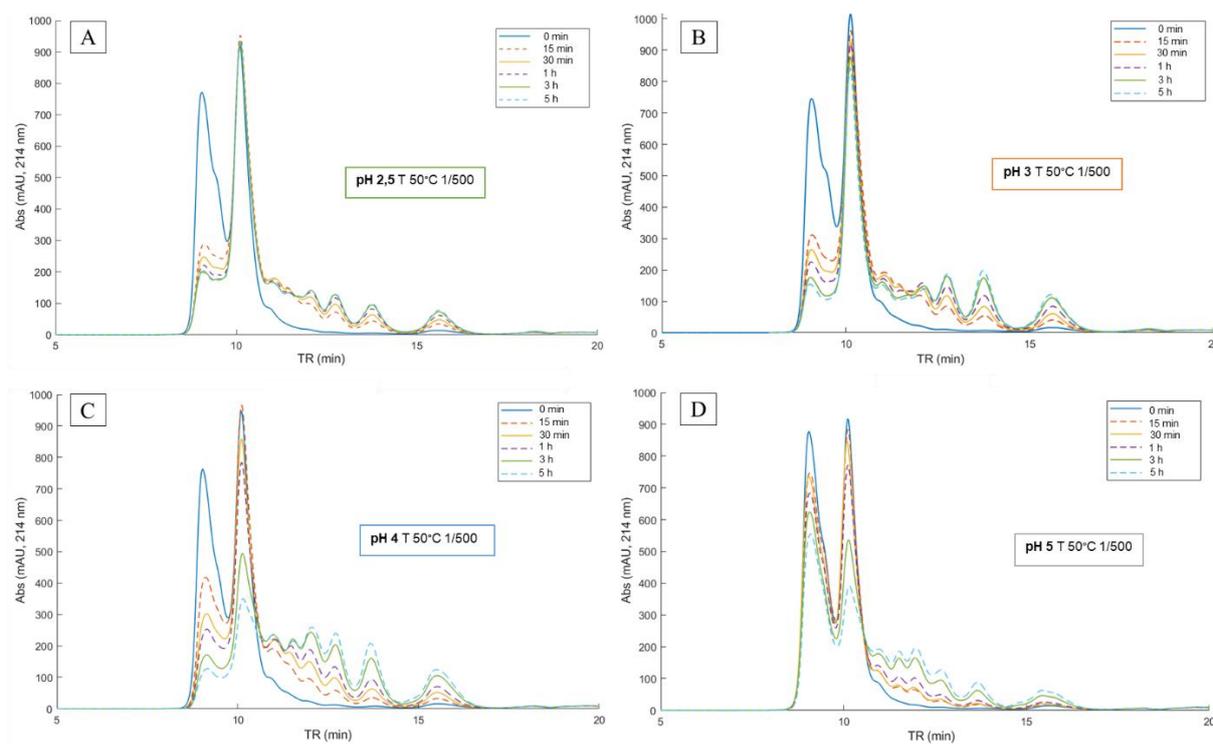


Figure 38 : Chromatogrammes des quelques essais préliminaires montrant l'hydrolyse sélective de la ProllyvePAC® en fonction du pH.

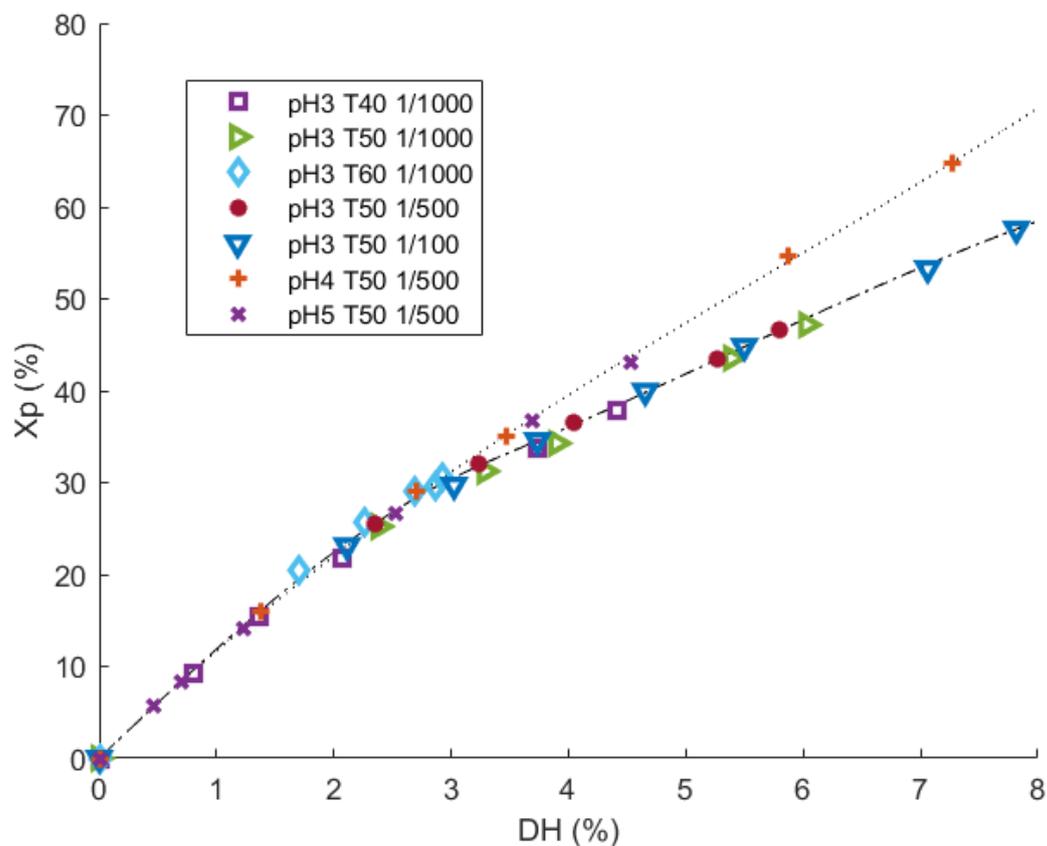


Figure 39 : Mécanismes des expériences préliminaires lorsque seules les cruciférines sont hydrolysées (trait de tendance mixte) et lorsque les deux protéines sont hydrolysées (trait de tendance pointillé). Le Xp et le DH sont calculés sur les deux protéines.

En conclusion, les deux mécanismes enzymatiques distincts sont contrôlés par le *pH* : en dessous de *pH* 3, la cruciférine est hydrolysée et la napine est globalement préservée. Au *pH* 4 les deux protéines sont hydrolysées. Et à *pH* 5 les deux le sont également, mais la napine est hydrolysée préférentiellement. De plus, pour une valeur de *pH* (3) et une température (50°C) réglées à la même durée d'hydrolyse (5 h), l'hydrolyse avec un *E/S* plus élevé (1/100) a atteint un *DH* plus élevé (*DH* 8% contre 6%). Pour la valeur de *pH* définie (3) et le rapport *E/S* (1/1000) à la même durée d'hydrolyse (5 h), les valeurs de *DH* étaient plus élevées à 50°C (6%) qu'à 40°C (4,5%) et à 60°C (3%). Par conséquent, la température appliquée et le rapport *E/S* ont influencé la cinétique d'hydrolyse, mais pas le mécanisme d'hydrolyse.

Cette sélectivité par le *pH* dans un mélange de protéines a également été rapportée avec les protéines de lactosérum. En effet, aux *pH* de 1,5 à 3, des enzymes acides (pepsine, protéase A (*Aspergillus niger*) et protéase M (*Aspergillus sp.*)) ont hydrolysé sélectivement l' $\alpha$ -lactalbumine ( $\alpha$ -La) tout en laissant la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -Lg) intacte (Lisak Jakopović *et al.* 2019). La  $\beta$ -Lg est une protéine bien connue, résistante à la digestion gastrique, en raison de ses quatre ponts disulfures, de son hydrophobicité et de sa stabilité, supérieure au *pH* acide (Kella & Kinsella 1985; Das & Kinsella 1989). Cela a été expliqué par l'augmentation de l'ionisation avec la diminution du *pH* et donc les liaisons hydrogène internes qui seraient augmentées entre les chaînes latérales des acides aminés (Laskowski & Scheraga 1954; Kella & Kinsella 1985). Les napines ont montré des propriétés de résistance similaires à la pepsine, et même à l'hydrolyse de la trypsine (Jyothi *et al.* 2007a; Joehnke *et al.* 2019). Elles ont également quatre ponts disulfure, ont des changements minimes de structure secondaire et une thermostabilité à *pH* 3 (Schmidt *et al.* 2004; Perera *et al.* 2016). Or, il a été démontré que les napines sont aussi partiellement dépliées à *pH* 3, exposant une surface 12 fois plus hydrophobe qu'à *pH* 7 (Folawiyo & Apenten 1996; Perera *et al.* 2016). Une autre hypothèse avancerait que les résidus hydrophobes exposés à la surface de la protéine peuvent au contraire contribuer à une stabilisation enthalpique, au lieu de la déstabiliser (Islam *et al.* 2019). Enfin, on peut aussi supposer que la napine est censé se rapprocher de son état natif, et l'activité de la ProlyvePAC® diminuer avec l'augmentation du *pH*, la dénaturation de la napine vers le *pH* 3 a pour effet de rendre inaccessible les sites de clivages, aboutissant aux résultats obtenus. Cela a été observé pour l'hydrolyse de la  $\beta$ -Lg par la trypsine avec au préalable différentes étapes de dénaturation. L'étude a conclu que la dénaturation aux *pH* non-natif conduit à la formation des structures tertiaires non-natives ou à des agrégats qui diminuent l'accessibilité des sites de clivages à l'enzyme (Leeb *et al.* 2015).

Les résultats précédents reflétaient l'impact des conditions opératoires sur la cinétique et le mécanisme de l'hydrolyse totale des PTC, mais pas sur la pureté et le rendement de la napine. La *Figure 40* expose ainsi ces critères quantifiés par CES pour l'hydrolysats obtenu après 5 heures dans les conditions appliquées précédentes. La pureté initiale de la napine dans l'isolat des PTC était de 47,3% et un rendement en napine de 80% (c'est-à-dire 20% maximum d'épuisement de la napine) était ciblé. En corrélation avec les analyses de mécanisme et les valeurs de  $X_p$ , une déplétion en napine a eu lieu à  $pH$  4 avec un rendement en napine inférieur à 80%. La pureté de la napine était très faible à  $pH$  5 (35,6%), mais élevée à  $pH$  4 (82,2%) et équivalente à celle au  $pH$  3. Ceci s'explique par une hydrolyse simultanée des deux fractions des PTC à  $pH$  4, mais une hydrolyse préférentielle des napines à  $pH$  5. La même observation a été faite avec les protéines du lactosérum, où une valeur de  $pH$  supérieure à 4 était nécessaire pour commencer à digérer la  $\beta$ -Lg par la protéase A (Lisak Jakopović *et al.* 2019). Les résultats ont également montré une influence de la température et du rapport  $E/S$  sur la déplétion en napine. Au  $pH$  3, 50°C semblait être la température optimale pour l'hydrolyse des napines avec ProlzymePAC® dans les conditions appliquées. De plus, un faible rapport  $E/S$  ( $> 1/100$  ;  $g_E \cdot g_S^{-1}$ ) était nécessaire pour maintenir un rendement élevé en napine ( $> 80\%$ ).

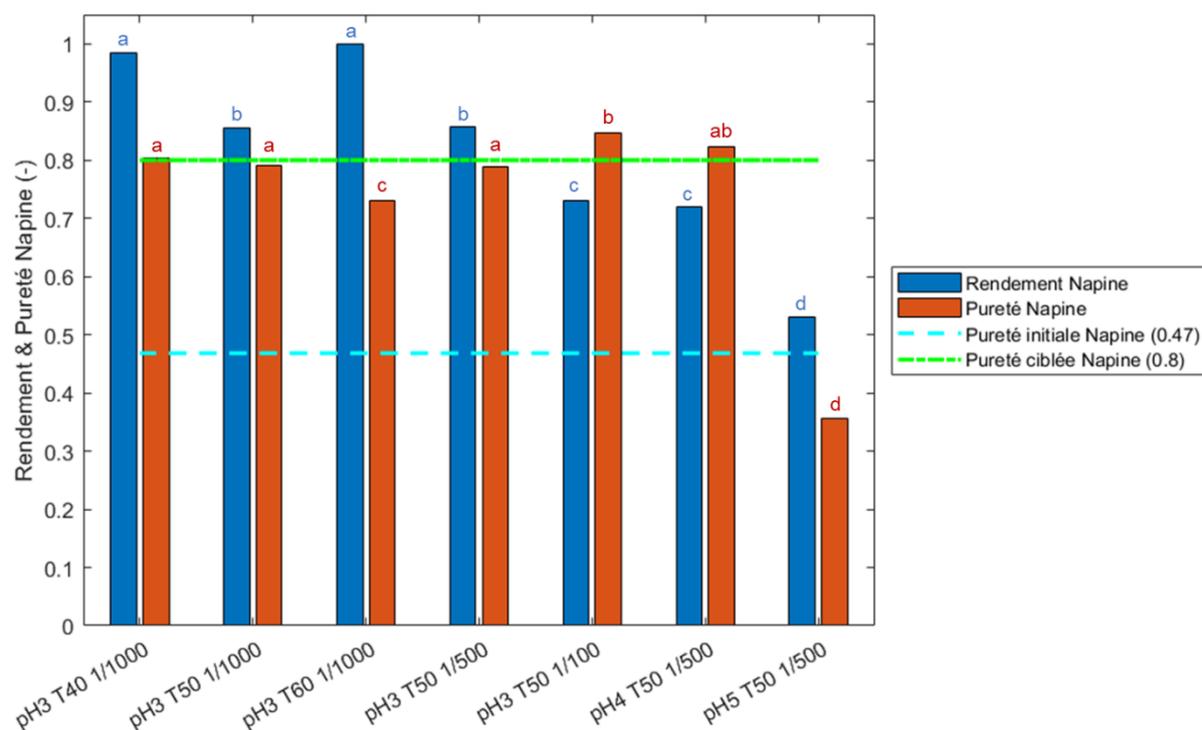


Figure 40 : Valeurs de rendement et pureté en napines pour les expériences préliminaires étudiées à  $t = 5$  h.

En conclusion des essais préliminaires, le plan d'expériences devait se borner uniquement au  $pH$  3 pour le mécanisme recherché (garantie de l'hydrolyse des cruciférines, aboutissant aux

peptides chélateurs, et conservation des napines). La température serait limitée à 55°C pour rester dans la gamme de stabilité de longue durée de la ProlyvePAC®.

### III.1.2. Modélisation de la cinétique d'hydrolyse

Les conditions opératoires d'obtention de l'hydrolysats d'intérêt ayant été identifiées, il reste donc l'optimisation de la production de cet hydrolysats. Pour ce faire, d'abord une modélisation du phénomène est réalisée au moyen de la méthodologie hybride entre un modèle cinétique et un plan d'expériences. Enfin, en second lieu, une optimisation sur critère économique pourra être réalisée sur base du modèle identifié (Beaubier *et al.* 2021a).

La modélisation hybride consiste d'abord à sélectionner un modèle cinétique qui donne le meilleur ajustement sur les valeurs expérimentales (une concentration protéique en fonction du temps). En général, il s'agit d'un modèle de Michaelis-Menten ou un modèle de premier ordre. Or, les travaux de Beaubier *et al.* (2021a) ont montré que c'est le modèle cinétique du second ordre qui donne un meilleur ajustement aux données, ce modèle est donc repris dans le cas présent (*Eq. 80* p.109 *M&M*). Ensuite, c'est sur ce modèle cinétique que sera implémentée la modélisation (*Eq. 83* p.110 *M&M*). Plus précisément, c'est la régression du paramètre  $k_c$ , une constante cinétique, dans différents jeux de conditions opératoires, qui est visée. Ces ensembles de conditions opératoires étant définies par une matrice de plan d'expériences (*Figure 25* et *Tableau 13* p.108 *M&M*). De cette manière, la constante  $k_c$  sera corrélée aux conditions opératoires et pourra être prédite dans n'importe quelles conditions du domaine étudié.

Dans l'ordre, comme présenté par la *Figure 41* ci-dessous, (i) les hydrolyses de PTC sont réalisées selon la matrice expérimentale établie, et la cinétique de la concentration des protéines est suivie. (ii) La régression des cinétiques est réalisée avec le modèle du second ordre modifié afin de déterminer le paramètre cinétique pour chaque condition. (iii) Enfin, des corrélations sont établies entre les conditions opératoires (CO) et le paramètre cinétique par la méthodologie de plan d'expériences.

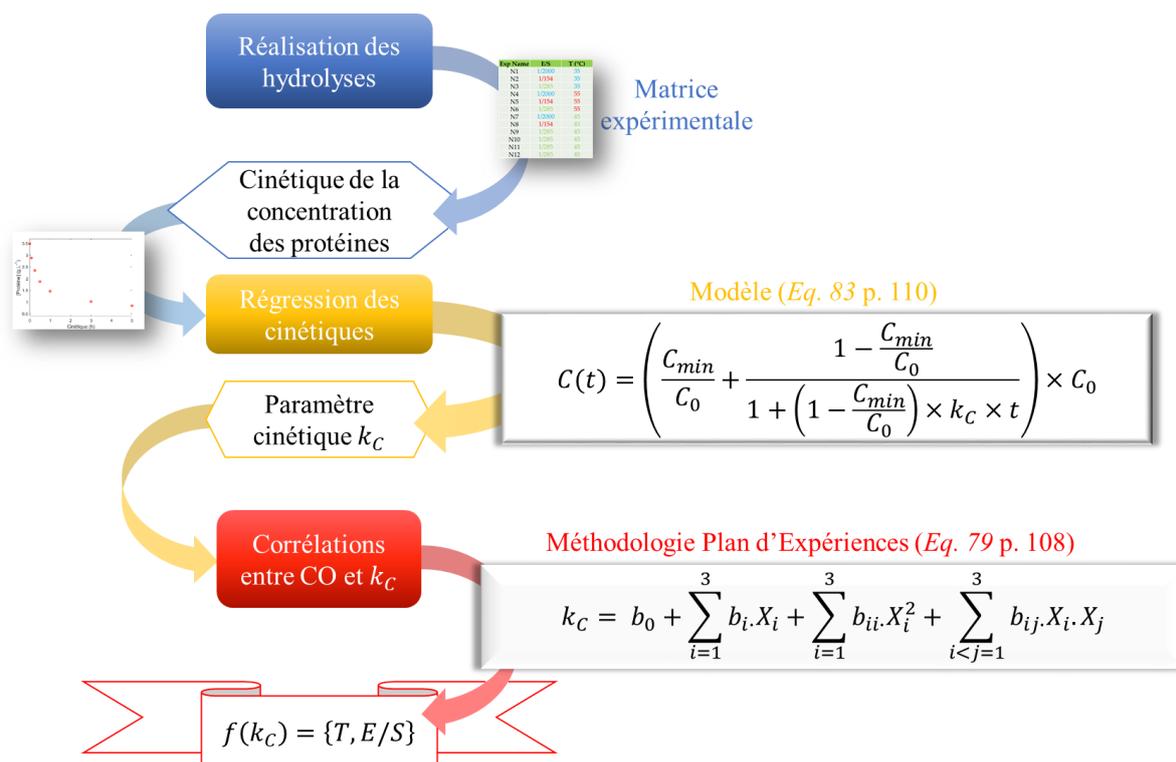


Figure 41 : Schéma explicatif de la méthodologie de modélisation de la cinétique d'hydrolyse des PTC.

### III.1.2.1. Analyse du plan d'expériences

En fonction des bornes du domaine expérimental précédemment identifiées, le plan a donc été défini à un  $pH$  constant de 3, une plage de température entre 35°C et 55°C (pour éviter la dénaturation thermique de l'enzyme) et un rapport  $E/S$  variant de 1/154 à 1/2000 ( $g_E \cdot g_S^{-1}$ ), afin d'avoir un écart de concentration en enzyme significatif, mais sans excès néfaste vis-à-vis des napines. Le DoE a été exécuté pour établir des corrélations entre les constantes cinétiques  $k_C$  de la concentration de cruciférine et de la concentration de napine, avec deux conditions de fonctionnement ( $T$  et  $E/S$ ) à  $pH$  constant de 3, selon la même méthodologie que Beaubier *et al.* (2021a). L'application de cette méthodologie permettrait ainsi de modéliser les concentrations des cruciférines et des napines à tout moment de la réaction d'hydrolyse dans le domaine des conditions opératoires, ainsi que la pureté des napines correspondantes.

Le plan d'expérience final est un plan composite à face centrée ( $\alpha = 1$ ) avec 3 niveaux pour chaque facteur : la température et le ratio  $E/S$ . Des points de cinétique ont été prélevés sur 5 heures pour être analysés en CLHP-ES. Les cinétiques obtenues sont ajustées à un modèle de réaction du second ordre (cf. §II.3.2 p.109 et II.4.3 p.113 *M&M*).

### III.1.2.2. Régression du modèle cinétique modifié du second ordre

Le modèle cinétique (Eq. 83 p.110 *M&M*) a été ajusté aux données expérimentales, ce qui a donné une valeur de la constante  $k_C$  des protéines dans différents ensembles de conditions opératoires. La Figure 42 suivante montre des exemples de régression. Les coefficients de corrélation sont satisfaisants, validant le modèle cinétique du second ordre choisi.

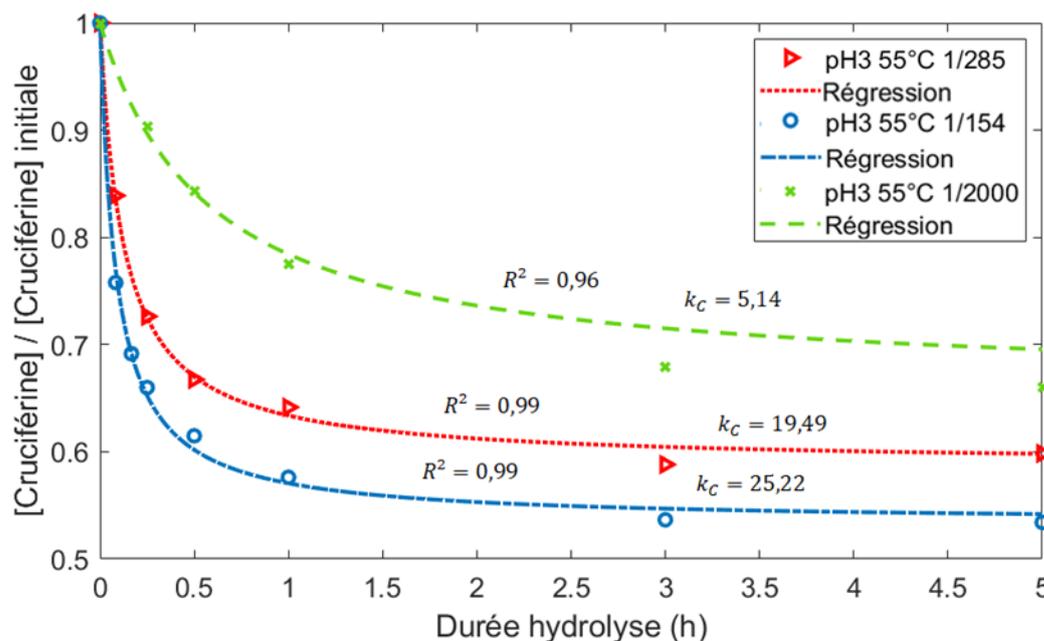


Figure 42 : Exemple de régressions du paramètre  $k_C$  du ratio de concentration massique de la cruciférine à l'instant  $t$  sur la cruciférine initiale, dans 3 ensembles de conditions à pH 3, 55°C et E/S de 1/285 (triangles rouges et ligne pointillée rouge), 1/154 (cercles bleus et ligne en points-tirets bleue) et 1/2000 (croix vertes et ligne en tirets verte).

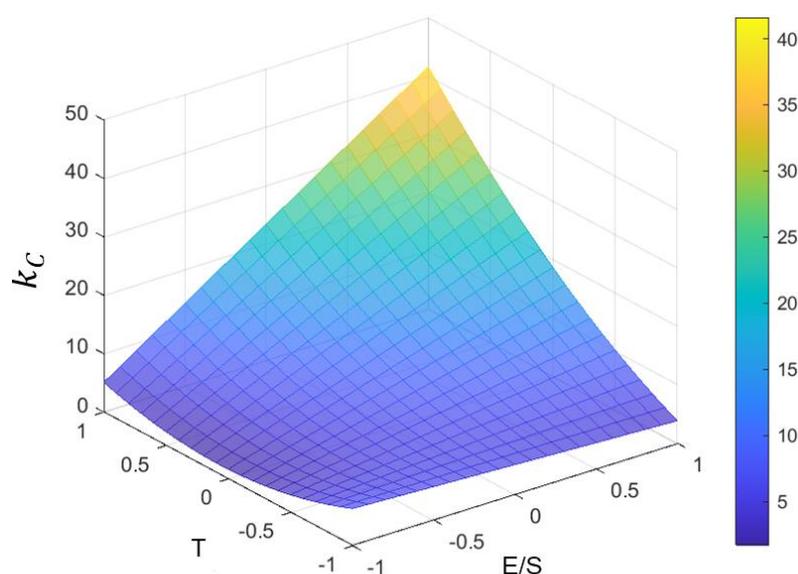
Les valeurs de  $k_C$  ainsi obtenues, un ajustement de modèle de régression linéaire robuste de MATLAB® a été utilisé pour analyser le modèle et la corrélation entre la constante  $k_C$  et les conditions opératoires (cf. *Tableau 13* p.108 *M&M*). Pour la cruciférine, il s'est révélé que les termes linéaires ( $E/S$  et  $T$ ), l'interaction ( $E/S \times T$ ) et le terme quadratique  $T^2$  influent significativement sur la réponse  $k_C$ . Le terme quadratique du  $E/S$  n'est pas significatif. Les corrélations entre les données expérimentales et les modèles ont des coefficients de déterminations élevés :  $R^2 = 0,99$  et  $Q^2 = 0,96$  (*Tableau 17*). Cela indique que le modèle est significatif. Finalement, ce modèle peut être utilisé pour prédire les cinétiques d'hydrolyse de manière fiable, quelles que soient les conditions opératoires du domaine. En revanche, comme il n'y a pas eu de variation significative de la concentration en napine, le modèle sur la prédiction de la concentration en napine par une constante cinétique n'est pas valide. La concentration en napine est donc considérée constante au cours de l'hydrolyse.

Tableau 17 : Coefficients significatifs du modèle protéique des cruciférines et des napine (valeurs codées).

		$k_C$ cruciferines	$k_C$ napines
²Coefficients significatifs	<b>Constante (<math>b_0</math>)</b>	10,16	3,67
	<b><math>E/S</math> (<math>b_1</math>)</b>	8,49	-
	<b><math>T</math> (<math>b_2</math>)</b>	9,11	-
	<b><math>E/S \times T</math> (<math>b_{1-2}</math>)</b>	9,76	-
	<b><math>E/S^2</math> (<math>b_{11}</math>)</b>	-	-
	<b><math>T^2</math> (<math>b_{22}</math>)</b>	4,078	-
Analyse du modèle	<b><math>RSD</math></b>	1,306	3,076
	<b><math>R^2</math></b>	0,99	0,76
	<b><math>Q^2</math></b>	0,96	-0,15
	<b><math>p</math>-value</b>	$2,58 \times 10^{-6}$	0,066

### III.1.2.3. Modélisation du paramètre $k_C$ en fonction des conditions opératoires

La surface de réponse de la constante  $k_C$  montre sans surprise que pour une hydrolyse rapide, il faut une température élevée et un ratio  $E/S$  élevé (grande quantité d'enzyme) (*Figure 43*). Cependant, au vu des limitations déterminées plus tôt, il ne serait pas judicieux de s'arrêter à cette modélisation, le critère de pureté ni de coût n'étant pas représenté ici, où l'analyse en serait complexe, considérant les recouvrements des différentes réponses. La recherche de l'optimalité est alors réalisée au sens de Pareto, permettant une optimisation abordable multicritère à partir des modélisations du phénomène recherché.


 Figure 43 : Surface de réponse de la constante de vitesse de réaction  $k_C$  de la cruciférine dans le domaine étudié. Les paramètres  $T$  et  $E/S$  sont en valeurs codées.

Pour vérifier le modèle établi, quatre expériences de validation ont été réalisées près des quatre coins du domaine étudié, selon le *Tableau 14* (p.109 *M&M*). La *Figure 44* (A, B, C et D) montre la cinétique de la concentration calculée (continue) à partir de l'équation polynomiale aux termes significatifs entre 0 et 5 h et les points expérimentaux (discrétisés) des expériences de validation (aussi appelées A, B, C et D). La *Figure 46 A* présente les régressions entre les points expérimentaux et calculés discrétisés. Ainsi, une bonne corrélation est présente pour toutes les expériences :  $R^2(A) = 0,98$  ;  $R^2(B) = 0,99$  ;  $R^2(C) = 0,99$  ;  $R^2(D) = 0,88$ . L'expérience D est un peu moins bonne par rapport aux autres à cause de la surestimation de la constante  $k_C$  et donc de la surestimation de l'hydrolyse entre 15 min et 1 h. Néanmoins, toutes ses concentrations restent dans les 25% d'erreur relative d'une part, et d'autre part, le test-t ne montre pas de différence significative entre les deux populations ( $H_0$  avec  $p > 0,05$ ). Le modèle reste donc fiable, et c'est confirmé avec la prédiction du critère de la pureté en napine.

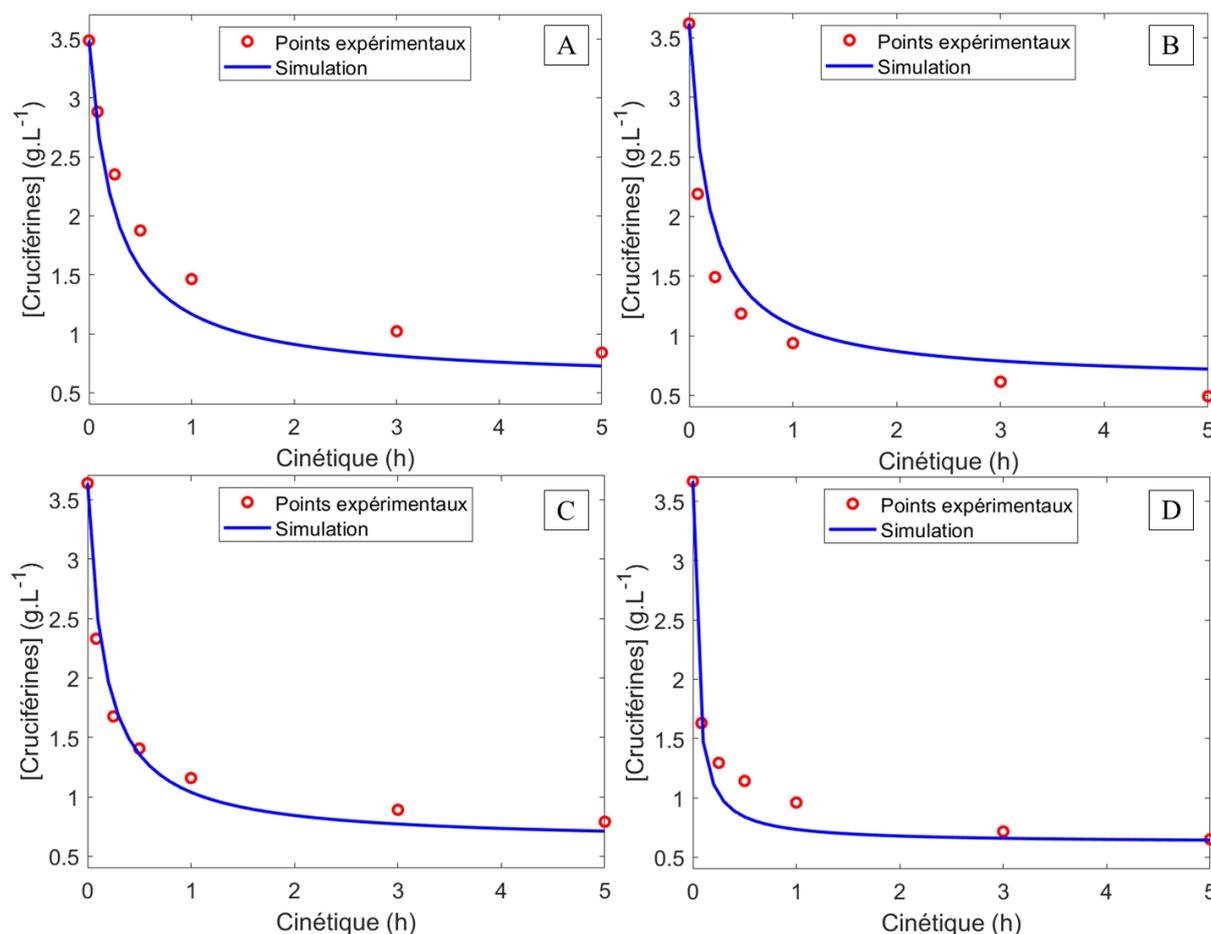


Figure 44 : Comparaisons de la cinétique simulée des expériences de validation (ligne bleue) et la cinétique expérimentale des conditions correspondantes (ronds rouges). (A) 37,5°C – 1/801 E/S. (B) 37,5°C – 1/174 E/S. (C) 52,5°C – 1/801 E/S. (D) 52,5°C – 1/174 E/S.

La *Figure 45* (A, B, C et D) représente les mêmes expériences de validation, mais cette fois-ci, c'est la pureté en napine qui est calculée selon l'*Eq. 92* (p.114 *M&M*) soit avec les

données expérimentales (discrétisées), soit avec les valeurs calculées (continues). La **Figure 46 B** présente les correspondances entre les points expérimentaux et ceux calculés, discrétisés. Etant donné que le modèle d'hydrolyse de la napine n'est pas significatif, la concentration en napine a été gardée égale à sa concentration initiale tout le long de la cinétique. Les écarts d'erreurs relatives autour de 10% et les corrélations calculé-expérimental montrent que cette approximation est ainsi valide :  $R^2(A) = 0,99$  ;  $R^2(B) = 0,96$  ;  $R^2(C) = 0,93$  ;  $R^2(D) = 0,96$ . Même l'expérience D a cette fois-ci un coefficient de corrélation plus que satisfaisant. L'optimisation multicritère peut donc être réalisée sur cette base de modélisation.

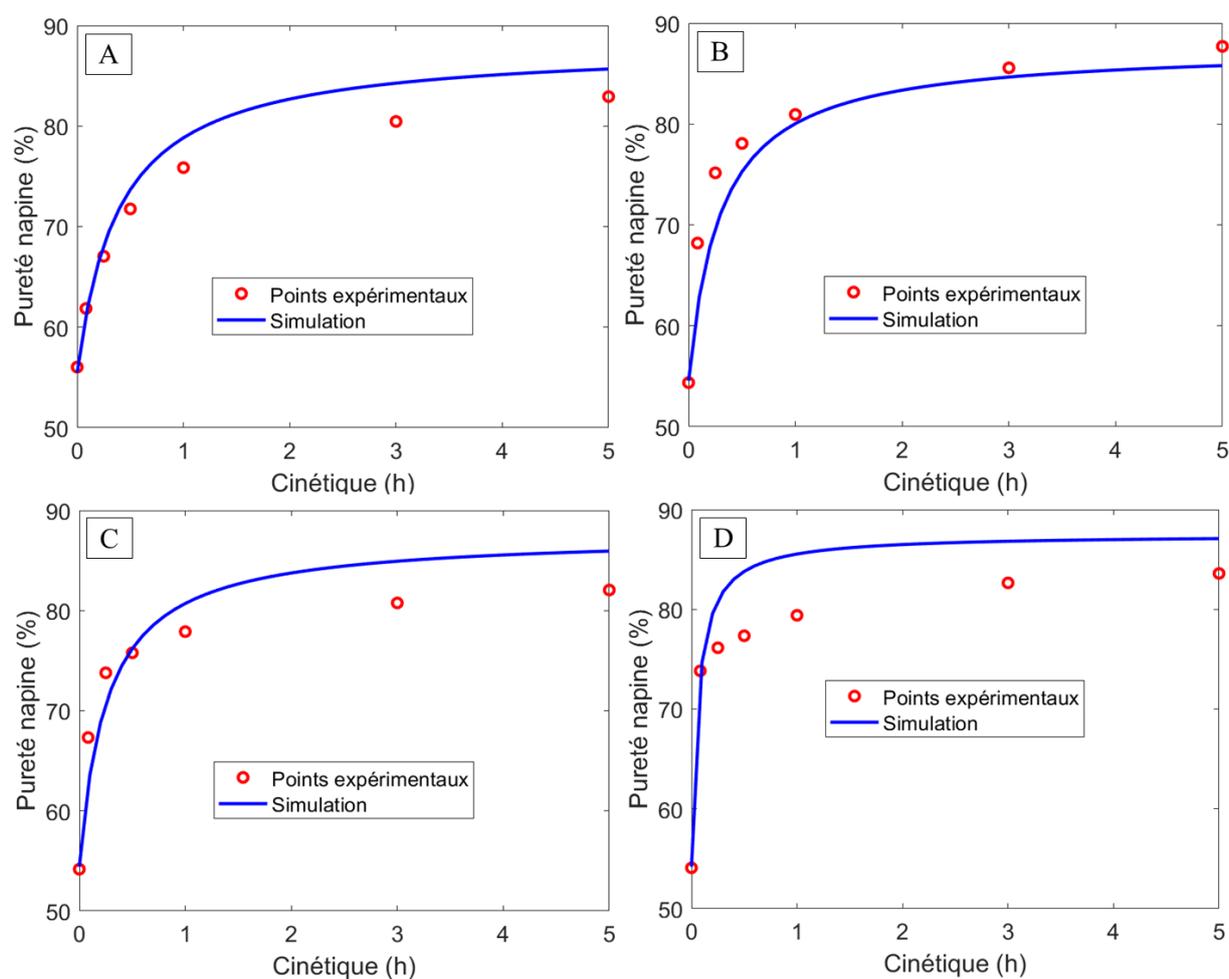


Figure 45 : Comparaisons de la cinétique simulée (ligne bleue) et la cinétique expérimentale de la pureté en napine des conditions correspondantes (ronds rouges) pour les quatre expériences de validation. (A) 37,5°C – 1/801 E/S. (B) 37,5°C – 1/174 E/S. (C) 52,5°C – 1/801 E/S. (D) 52,5°C – 1/174 E/S

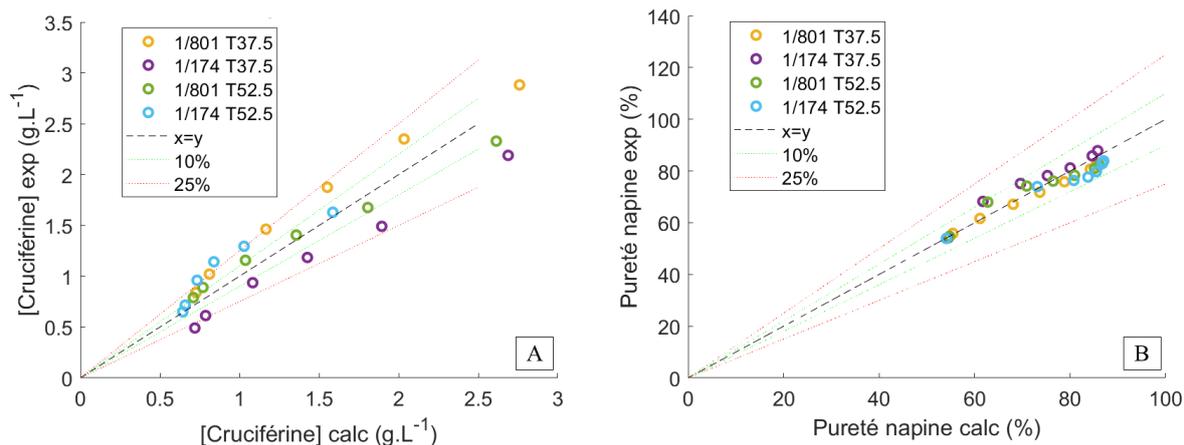


Figure 46 : Valeurs cinétiques expérimentales des expériences de validation (A, B, C et D) en fonction des valeurs cinétiques calculées pour (A) la concentration en cruciférine et (B) la pureté en napine. La ligne pointillée verte représente  $\pm 10\%$  de la bissectrice, la ligne pointillée rouge  $\pm 25\%$ .

### III.1.3. Identification de la condition optimale (compromis coût / durée)

Industriellement, le critère le plus important est le coût. Il est lié à l'enzyme, qui peut être chère, et au temps de la réaction (coût énergétique et productivité). Pour réduire le temps de réaction, il faut ajouter plus d'enzymes. Et si l'on préfère utiliser peu d'enzymes, il faut allonger le temps de réaction. Il faudrait trouver alors un juste compromis entre ces deux critères. Ce genre de problème antagoniste est communément analysé par une optimisation multicritères, avec plusieurs fonctions objectives à minimiser, définies notamment par l'étude d'un plan d'expérience. Pour cela, un programme développé sur MATLAB® par Frantz Fournier (Biopromo - LRGP), qui utilise un algorithme génétique diploïde, est appliqué (cf. §II.3.3 p.110 *M&M*). Cet outil parcourt le domaine des conditions opératoires et identifie le front de Pareto et le domaine de Pareto. Le front de Pareto représente un jeu de solutions équivalentes, qui respectent le compromis, et les conditions opératoires correspondantes sont représentées dans le domaine de Pareto.

Les fonctions objectives ont donc été axées sur :

- le temps, pris à partir de la prédiction en pureté de la napine pour une pureté de 84%
- la quantité en enzyme
- le rendement en napine supérieur à 0,94

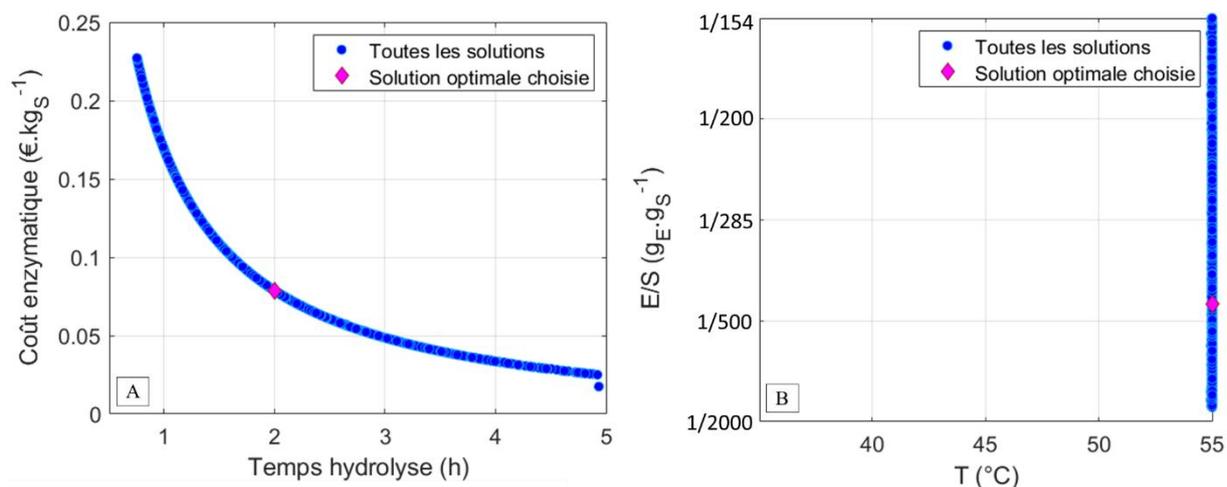


Figure 47 : (A) Front de Pareto des solutions (ronds bleus) économiquement équivalentes et (B) domaine de Pareto correspondant. Le point économique choisi se distingue par un losange rose.

La Figure 47 A montre ainsi le front de Pareto obtenu et la Figure 47 B le domaine de Pareto correspondant. On peut ainsi voir qu'un compromis acceptable entre les deux paramètres implique une détérioration de l'un au profit de l'autre : une diminution de la durée d'hydrolyse nécessite une augmentation du coût enzymatique et *vice-versa*. Tous les compromis acceptables couvrent la gamme du ratio  $E/S$  du domaine appliqué, ce qui s'expliquait par le fait que ce paramètre intervenait dans le calcul du critère de performance du coût enzymatique. Fait intéressant, toutes les solutions ont été trouvées à la même température (55°C), qui est la température maximale appliquée dans l'optimisation et est également présente dans la plage d'activité optimale. Ceci était en accord avec des travaux antérieurs (Beaubier *et al.* 2021a), qui mettaient également en évidence le fait que le meilleur compromis « durée de réaction/coût enzymatique » se trouve déjà quand même dans les conditions optimales de l'hydrolyse.

Pour le choix d'une solution unique du compromis « durée de réaction/coût enzymatique », n'importe quel point peut être choisi parmi toutes les solutions disponibles. Cela peut être fait de manière intuitive, après délibération en réunion, ou plus pragmatique, en appliquant une méthode d'aide à la décision par une pondération et/ou des contraintes aux variables de décision. L'une des plus simples méthodes qui est utilisée ici est la solution « min-max ». Le but est de trouver la localisation des solutions des fonctions objectives dont l'écart maximal est minimisé, c'est-à-dire qui donne une solution qui représente le « centre » du front de Pareto (Zio *et al.* 2009; Belegundu & Chandrupatla 2019). Dans ce cas présent, la meilleure solution a donc été trouvée pour un temps d'hydrolyse de 2 heures, ce qui est compatible avec des mises en œuvre industrielles. Ce compromis peut être atteint à 55°C avec un rapport  $E/S$  de 1/448 et implique un coût enzymatique de 0,078 €.kg<sub>S</sub><sup>-1</sup>. Ces conditions identifiées ont permis une

optimisation de la protéolyse sélective des PTC avec la ProlyvePAC®. En effet, les conditions initiales mises en place arbitraire avaient un ratio  $E/S$  de 1/500, une température de 50°C et une durée de réaction de 7 heures. Ainsi, le coût enzymatique était quasiment équivalent (environ 10% d'écart), mais la durée de la réaction était réduite d'un facteur 3,5, permettant de produire très rapidement l'hydrolysat cible.

Cette condition optimale a été validée expérimentalement ( $nr = 4$ ) et a abouti à une pureté de napines de  $80,1 \pm 2,1\%$  et un rendement en napine de  $0,95 \pm 0,025\%$ . Cela représente donc respectivement 4,6% et 1,1% d'écart par rapport aux valeurs visées (84% de pureté en napine et 0,94 de rendement en napine), validant l'optimisation effectuée.

La préservation de l'activité de chélation des métaux (cf. §II.5 p.119 *M&M*) a été vérifiée dans ces conditions optimisées après ultrafiltration (cf. §II.2.2 p.106 *M&M*). Le citrate de sodium et l'EDTA ont également été analysés à des fins de comparaison. Ce sont des chélateurs de métaux les plus connus utilisés dans l'industrie alimentaire pour éviter l'oxydation des lipides (Durand *et al.* 2021a). Finalement, les fractions peptidiques obtenues dans des conditions initiales et optimisées ont statistiquement ( $p < 0,05$ ) la même efficacité de chélation avec un  $EC_{50}$  de  $276,5 \pm 6,2 \mu g$  d'échantillon pour le non-optimisé, contre  $247,8 \pm 27,8 \mu g$  d'échantillon pour le perméat optimisé (exprimée comme la quantité nécessaire pour chélater 50% ( $\sim 7,9 \mu g$ ) de fer (II) à partir du  $FeCl_2$ ). Cette valeur se situe entre les deux références commerciales, l'EDTA démontrant une efficacité de chélation plus élevée ( $EC_{50}$  autour de  $20 \mu g$ ) et le citrate de sodium présentant une efficacité plus faible ( $EC_{50}$  autour de  $390 \mu g$ ) et confirme son intérêt pour une éventuelle utilisation en tant que conservateur non-toxique.

**Conclusion de la partie « Modélisation de la protéolyse »**

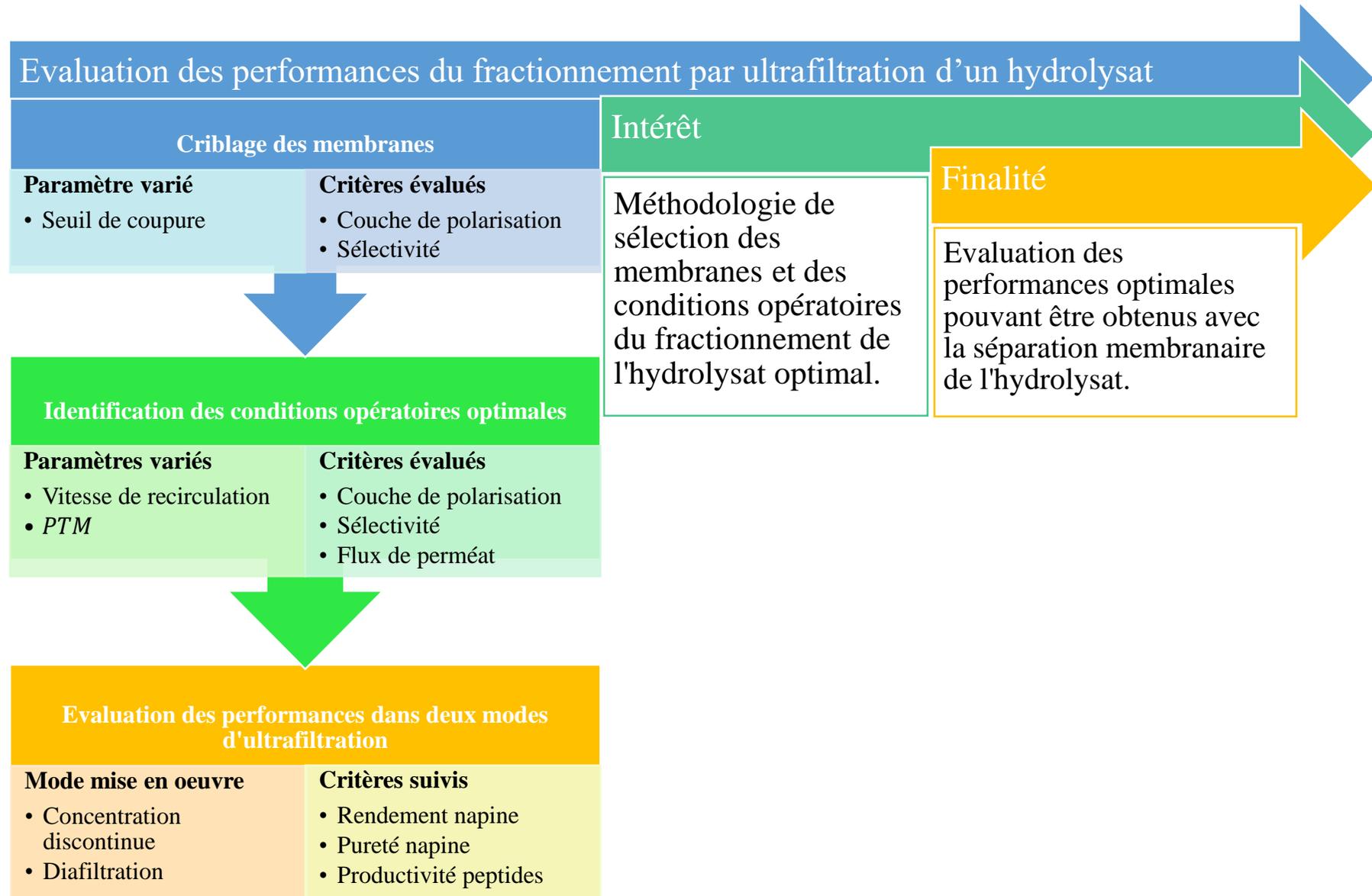
- L'hydrolyse sélective de la cruciférine de l'isolat des protéines totales de colza par la ProlyvePAC® est conditionnée par le  $pH$  inférieur à 3.
- Les paramètres  $E/S$  et température influent uniquement sur la cinétique.
- Le modèle polynomial de la constante de déplétion de la cruciférine  $k_C$ , déterminée par le plan d'expérience est significatif et permet de prédire correctement la concentration de la protéine en fonction de la température et du ratio  $E/S$ .
- L'optimisation multicritères a permis d'identifier la condition optimale au sens économique pour une production en *batch* tout en conservant la propriété chélatrice des métaux et une pureté en napines satisfaisantes.

### III.2. Modélisation de la séparation des hydrolysats par fractionnement membranaire en ultrafiltration

Dans la partie précédente, un hydrolysats a été mis en évidence avec deux propriétés intéressantes, portées par les napines (propriétés fonctionnelles) d'une part, et les peptides des cruciférines d'autre part (propriétés de chélation de métaux). Il apparaît donc nécessaire de séparer les protéines des peptides. Les napines et les peptides présentant des poids moléculaires très différents (supérieur à  $14 \text{ kg.mol}^{-1}$  pour la napine et inférieur à  $3 \text{ kg.mol}^{-1}$  pour les peptides) une séparation membranaire serait alors une méthode adéquate pour un fractionnement, qui permettrait d'obtenir un rétentat enrichi en napines, et un perméat enrichi en peptides. En effet, parmi les méthodes séparatives, elle apparaît comme la plus productive et responsable écologiquement vis-à-vis des méthodes chromatographiques ou de précipitations sélectives (utilisation de solvants organiques ou ajout de sels) (Agyei *et al.* 2016). Les techniques de séparation membranaires en milieu aqueux sont ainsi les plus utilisées industriellement, du fait de leur relative facilité de mise en œuvre (Gésan-Guiziou 2007). De plus, la séparation a souvent lieu sans changement d'état, idéal pour des molécules sensibles qu'il faut extraire à partir des mélanges complexes, et cela avec une faible consommation d'énergie, une haute spécificité et une montée en échelle facile (Aimar & Daufin 2004; Muro *et al.* 2013; Doyen *et al.* 2013). De plus, dans l'optique de la mise en place d'une production continue, qui diminuerait le coût enzymatique, la séparation membranaire permettrait un couplage aisé à la réaction protéolytique (*cf. Tableau 10 p.87 EB*).

Les performances de la membrane dépendent des propriétés de l'hydrolysats protéique et du milieu (poids moléculaire, concentration des molécules, hydrophobicité, charges, *pH*, force ionique, température) ainsi que du matériau de la membrane (seuil de coupure, charge et hydrophobicité), et enfin des conditions hydrodynamiques de séparation (pression transmembranaire et vitesse tangentielle) (Gourley *et al.* 1994; Chabeaud *et al.* 2009a; Fernández *et al.* 2013). La suite du développement se consacrera donc à l'étude du fractionnement de l'hydrolysats « optimal » par ultrafiltration. Pour ce faire, une sélection du seuil de coupure des membranes est réalisée en comparant leur sélectivité afin de déterminer la meilleure séparation des napines et des peptides. Ensuite, un criblage des conditions opératoires (vitesse de recirculation, *PTM*) est réalisé pour déterminer le jeu de conditions le plus performant. La séparation napines-peptides est toujours visée, mais avec un flux de perméat le plus élevé, garant d'une productivité peptidique élevée. Enfin, les performances des seuils de

coupures et du jeu de conditions opératoires seront évaluées expérimentalement dans deux modes de mise en œuvre d'ultrafiltration (concentration discontinue et diafiltration). Ces performances seront évaluées en suivant le rendement et la pureté en napine en fonction de l'avancement du procédé (en nombre de facteur de réduction volumique (*FRV*) pour le mode en concentration discontinue et nombre de diavolumes (*DV*) pour la diafiltration).



### III.2.1. Sélection du seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration

Pour cette étude, des membranes commerciales de type fibre creuses en PS ont été choisies pour leur robustesse à une haute température, un *pH* extrême et une sélectivité essentiellement impactée par la taille des molécules et peu par les conditions du milieu (Gourley *et al.* 1998). La masse molaire des napines reportée dans la littérature est entre 12,5 et 14  $kg.mol^{-1}$  (Perera *et al.* 2016), alors que celles des peptides sont inférieures à 3  $kg.mol^{-1}$ . Néanmoins, les napines et les peptides peuvent s'agréger, résultant en une masse molaire apparente plus élevée. Dans le but de permettre un fractionnement efficace (haute purification des napines dans le rétentat et enrichissement élevé des peptides dans le perméat) un balayage large des seuils de coupure des membranes d'ultrafiltration a été effectué.

Ainsi, les seuils de poids moléculaire nominaux varient de 3 à 100  $kg.mol^{-1}$ . La sélection du seuil de coupure le plus approprié a été choisie sur la base des valeurs de :

- Rétention en napines (proche de 1).
- Rétention globale des peptides (le plus faible possible) et la sélectivité de passage des peptides (illustrée par la courbe de calibration de la rétention en fonction de la masse molaire des peptides de l'hydrolysat (*cf. Figure 51 B p.170 R&D*)).
- Flux de perméat et les valeurs déduites de résistance membranaires (en eau et couche de polarisation).

Ces expériences ont été réalisées dans le cadre d'une filtration en recirculation totale (perméat reconduit dans le rétentat), dans les conditions de *pH* et température de l'hydrolyse enzymatique (55°C à *pH* 3) et à la *PTM* et vitesse de recirculation recommandées par le fournisseur (1 ou 2 *bar* et 3000  $s^{-1}$  ou 6000  $s^{-1}$ ).

#### III.2.1.1. Effet du seuil de coupure

##### III.2.1.1.1. Les rétentions de la napine et des peptides totaux

La *Figure 48* présente les valeurs de rétention des napines et des peptides totaux aux différents seuils de coupure. Les membranes de 5 à 50  $kg.mol^{-1}$  de seuil de coupure ont des rétentions pour la napine de 1 et de  $0,722 \pm 0,001$  ;  $0,738 \pm 0,003$  ;  $0,727 \pm 0,009$  et  $0,742 \pm 0,011$  respectivement pour les peptides totaux (pas de différences statistiques). La membrane de 3  $kg.mol^{-1}$  présente une rétention de 1 pour la napine et une valeur de rétention des peptides totaux la plus élevée ( $0,772 \pm 0,005$ ). Celle de 100  $kg.mol^{-1}$  se distingue avec des rétentions plus faibles en napine ( $0,967 \pm 0,004$ ) et en peptides totaux ( $0,637 \pm 0,007$ ). Ces résultats sont surprenants, car d'une part la présence de la napine dans le perméat a déjà été observée pour

des membranes planes de cellulose de 10 voire 3  $kg.mol^{-1}$ . Au-delà d'une certaine  $PTM$ , cela est due à une déformation élastique de la membrane d'une part (Maurel 1993), et d'autre part la rétention des peptides totaux reste extrêmement élevée dans une large gamme de seuils de coupure. En effet, un criblage de membranes aux seuils de coupure très proches entre 4 et 9  $kg.mol^{-1}$  avait montré la même variation (entre 5 et 20% de différences) pour un fractionnement d'hydrolysats du lieu noir *Pollachius virens* (Chabeaud *et al.* 2009c). Cependant, cela tend à indiquer que la couche de polarisation et l'encrassement sont limitants dans le transfert de perméat, et par conséquent, cela limite le transport de solutés (Cheryan 1977; Ahmad *et al.* 2006). Pour une bonne prédiction du bilan de matière, il serait alors important d'inclure l'estimation de la concentration à la membrane pour pouvoir se baser sur la rétention réelle au lieu de celle observée (Ahmad *et al.* 2006; Premnath & Agarwal 2017).

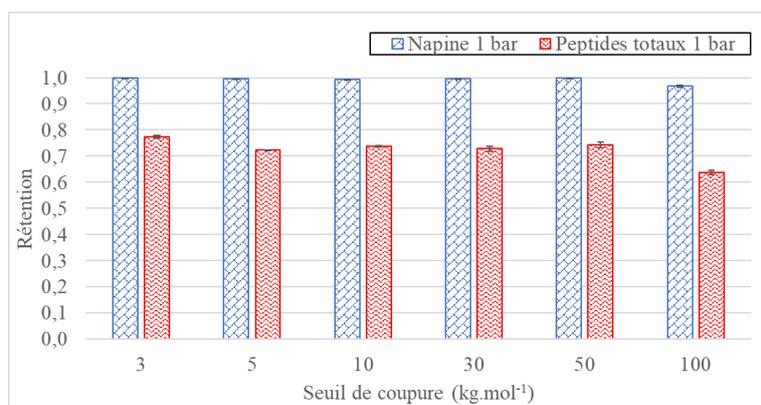


Figure 48 : Rétentions réelles de la napine et des peptides totaux aux différents seuils de coupure à  $PTM$  1 bar et à  $3000 s^{-1}$  de taux de cisaillement. Suspension de l'hydrolysats à  $10 g.L^{-1}$ ,  $pH$  3 et  $\sim 51^{\circ}C$  ( $nr = 3$ ).

Pour expliquer la haute rétention des napines même à  $100 kg.mol^{-1}$ , deux hypothèses sont avancées :

- Premièrement sur la conformation de la napine. Des études de conformation à différents  $pH$  ont montré qu'elle est partiellement dépliée au  $pH$  3 (Perera *et al.* 2016). Ainsi, le recrutement de plus de molécules d'eau augmenterait le rayon hydrodynamique de la napine.

- En deuxième lieu, une agrégation peut avoir lieu entre les napines et les peptides, contribuant à augmenter le rayon hydrodynamique de toutes les particules. Les napines ne sont pas transférées et les peptides les plus gros ont également des difficultés au passage. Dans le but de vérifier cette hypothèse, la taille des particules de l'hydrolysats a été analysée en DLS (*cf.* §III.2.1.1.2 p.167 R&D).

- Puis, la taille apparente des molécules peut être changée étant donné que le *pH* acide de la solution charge positivement les molécules et modifie leur blindage électrostatique (Pujar & Zydney 1998).

- Enfin, le fonctionnement à l'état stationnaire (20 *min* de recirculation totale avant prélèvement du perméat) permettrait de modifier le seuil de coupure apparent des membranes. Cela a été le cas, pour les membranes en PS aux seuils de coupure de 40 et 100  $kg.mol^{-1}$  en état stationnaire (après 1 heure de fonctionnement), qui a découlé sur des rétentions proches de 1 pour l'albumine de sérum bovin (67  $kg.mol^{-1}$ ) au lieu de 0,45 et 0,2 à l'état initial (après 1 *min* de fonctionnement) (Meireles *et al.* 1991b).

### III.2.1.1.2. La rétention de la napine, analyse de la taille des agrégats

Pour comprendre la haute rétention de la napine à des seuils de coupures supérieurs à sa masse molaire, l'état des solutés présents dans l'hydrolysats à *pH* 3 (non ultrafiltré) ont été analysés en DLS (« Dynamic Light Scattering » pour « diffusion dynamique de la lumière » en français). Cette technique renseigne sur la taille au-delà d'un nanomètre des particules en solution, par contre les peptides isolés ne sont pas détectés. Une centrifugation rapide (1 *min* à 5000*xg*) a également été faite pour enlever les très gros agglomérats de protéines-peptides visibles à l'œil nu qui masqueraient le signal lumineux des solutés.

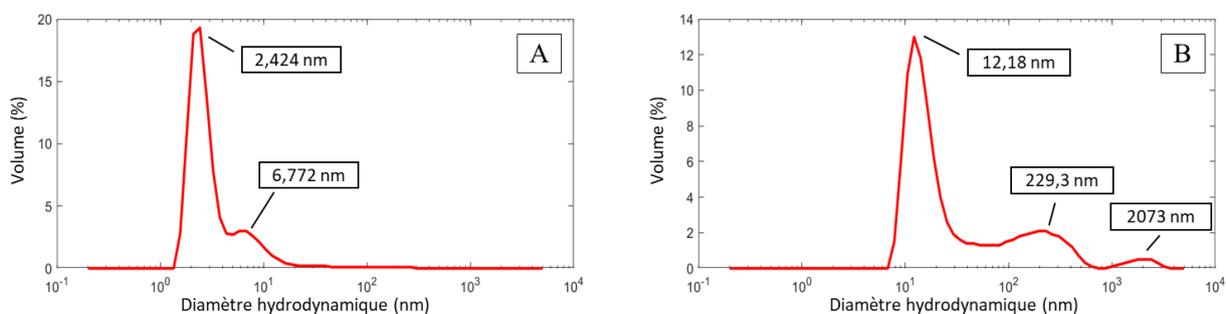


Figure 49 : Répartition volumique des particules par la diffusion dynamique de lumière. (A) Protéines totales non hydrolysées dans un tampon *pH* 3. (B) Hydrolysats des PTC dans un tampon *pH* 3.

La *Figure 49 A* montre la distribution des protéines totales du colza (PTC) à *pH* 3. La présence de deux pics indique qu'en effet, deux espèces attendues se distinguent. Celle à 2,424 *nm* peut être référée à la napine. La masse molaire correspondante est estimée à 21,9  $kg.mol^{-1}$  par l'outil de conversion du rayon hydrodynamique au poids moléculaire (Fluidics Analytics). Le deuxième pic de 6,772 *nm* correspondrait à la cruciférine avec masse molaire correspondante est estimée à 510  $kg.mol^{-1}$ . Ces valeurs sont plus grandes que ce qui est attendu pour la napine (12,5-14,5  $kg.mol^{-1}$  (Perera *et al.* 2016)) et pour la cruciférine (300-340  $kg.mol^{-1}$

(Wanasundara 2011)), mais le diamètre hydrodynamique prend en compte la fine couche dipolaire électrique qui adhère à la surface de la particule, dépendant de la surface chargée, de la densité, des ligands exposés, et de la nature du solvant. Donc le diamètre de particule hydrodynamique mesuré avec la DLS est systématiquement supérieur (au moins de 20%) au diamètre de celui mesuré par exemple avec un microscope électronique à transmission (Souza *et al.* 2016; Wyatt Technology). La taille est alors valide, expliquant par la même occasion la rétention élevée des napines, car la transmission membranaire se fait justement en fonction du rayon hydrodynamique, ce qui prend en compte les effets électrostatiques (Aimar 2006; Aimar *et al.* 2010b).

La **Figure 49 B** montre la distribution de l'hydrolysats total (centrifugé) à *pH* 3. Cette fois-ci les particules sont plus grandes, de 12,18 ; 229,3 et 2073 *nm*, correspondants à des poids moléculaires entre 36 et  $3 \times 10^6$  *kg.mol<sup>-1</sup>*. Les protéines et les peptides s'agrègent donc, amenant à des tailles d'agrégats gigantesques ce qui augmente la rétention de toutes les molécules à travers la membrane (Meireles *et al.* 1991a).

### III.2.1.1.3. Les flux de perméat et l'effet de polarisation de concentration

En plus de l'agrégation des molécules, pour expliquer les valeurs de rétention observées, des mesures de flux, de résistance membranaire et de couche de polarisation ont été effectuées.

La **Figure 50 A** montre les différents flux de perméat obtenus pour chaque seuil de coupure avec l'hydrolysats en mode de recirculation totale. La membrane de 100 *kg.mol<sup>-1</sup>* de seuil de coupure a le flux le plus élevé ( $8,22 \pm 0,78$   $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Il est suivi de près par celui de la membrane de 10 *kg.mol<sup>-1</sup>* ( $7,25 \pm 0,22$   $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Viennent ensuite les flux des seuils à 30 et 50 *kg.mol<sup>-1</sup>* ( $6,81 \pm 0,32$  et  $6,81 \pm 0,68$   $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement), puis 3 *kg.mol<sup>-1</sup>* ( $5,47 \pm 0,01$   $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et enfin la membrane de 5 *kg.mol<sup>-1</sup>* a le flux le plus faible ( $4,32 \pm 0,07$   $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ). La différence est ainsi très faible entre les différentes membranes, même si elle est statistiquement significative. Ces valeurs de flux ont servi pour déterminer la valeur de la résistance de la couche de polarisation.

La **Figure 50 B** présente la résistance des membranes intrinsèque (mesurée avec l'eau) et celle due à l'effet de polarisation de concentration de l'hydrolysats. Les résultats montrent en toute logique que la membrane de 100 *kg.mol<sup>-1</sup>* a le moins de résistante hydraulique ( $(1,49 \pm 0,005) \times 10^{12}$   $\text{m}^{-1}$ ), en revanche elle n'est pas statistiquement différente de celle des membranes de 50, 30 et 10 *kg.mol<sup>-1</sup>* ( $(2,39 \pm 0,07) \times 10^{12}$   $\text{m}^{-1}$ ,  $(5,03 \pm 0,4) \times 10^{12}$   $\text{m}^{-1}$  et

( $3,99 \pm 0,04$ )  $\times 10^{12} m^{-1}$  respectivement). Cela peut être dû à la température élevée qui joue sur la dilatation-compaction des pores (Stade *et al.* 2015). Une résistance hydraulique plus élevée et avec une distinction significative est présente pour le seuil de coupure de  $3 kg.mol^{-1}$  ( $(8,51 \pm 1,97) \times 10^{12} m^{-1}$ ) contre  $100 kg.mol^{-1}$ , mais pas de différences avec les 10, 30 et 50  $kg.mol^{-1}$ . Cependant, c'est le seuil de coupure à  $5 kg.mol^{-1}$  qui présente le plus de résistance hydraulique ( $(2,07 \pm 0,48) \times 10^{13} m^{-1}$ ), mais ce n'est pas statistiquement différent du seuil à  $3 kg.mol^{-1}$ . En ce qui concerne la résistance due à couche de polarisation (résistance totale moins la résistance hydraulique), la membrane au seuil de  $100 kg.mol^{-1}$  présente également le moins de résistance ( $(1,73 \pm 0,01) \times 10^{13} m^{-1}$ ), suivi par les membranes aux seuils de 30, 10 et 5  $kg.mol^{-1}$  ( $(2,16 \pm 0,01) \times 10^{13} m^{-1}$ ,  $(2,10 \pm 0,07) \times 10^{13} m^{-1}$  et  $(2,12 \pm 0,05) \times 10^{13} m^{-1}$  respectivement). Enfin, le dernier groupe statistique comprend les seuils de coupure de 50 et 3  $kg.mol^{-1}$  ( $2,42 \pm 0,10$ )  $\times 10^{13} m^{-1}$  et  $2,46 \times 10^{13} \pm 0,004 m^{-1}$  respectivement).

La membrane de  $5 kg.mol^{-1}$  semble avoir un comportement particulier (pores très compacts) avec une résistance hydraulique aussi élevée que la résistance due à la polarisation de concentration. Pour les autres, la logique est plus ou moins maintenue avec une résistance qui diminue au fur et à mesure de l'augmentation du seuil de coupure. Par contre la diminution reste marginale, indiquant la prépondérance de l'effet de polarisation de concentration et de l'encrassement, qui au final découle sur quasiment les mêmes valeurs de résistance, ce qui explique les faibles différences observées des rétentions des napines et peptides totaux pour les six membranes alors que la variation du seuil de coupure est élevée (facteur 2 à 30).

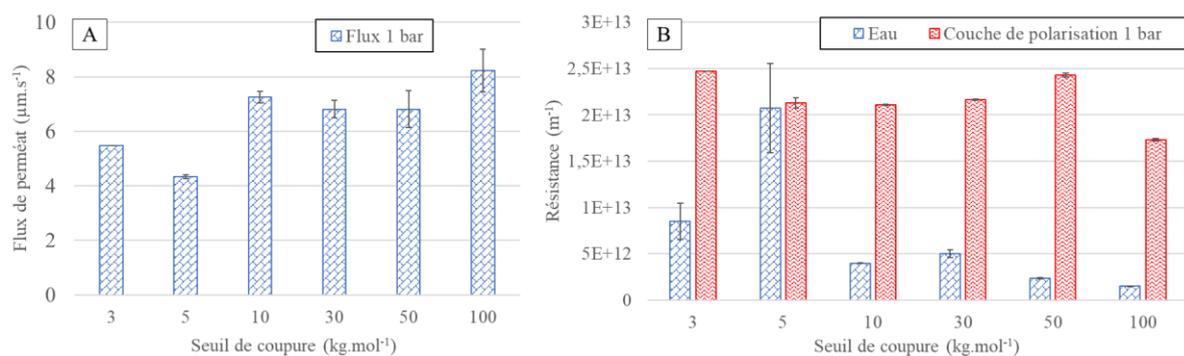


Figure 50 : Valeurs des (A) flux de perméat et des (B) résistances en fonction des seuils de poids moléculaire nominaux des membranes. Résistance membranaire intrinsèque mesurée en eau à 51°C aux PTM entre 0,4 et 2,4 bar à des vitesses de recirculation entre 1500 et 8000 s<sup>-1</sup>. Flux perméat et résistance due au phénomène de polarisation de concentration mesurées à 51°C à PTM de 1 bar et vitesse de recirculation de 3000 s<sup>-1</sup>. Suspension de l'hydrolysats à 10 g.L<sup>-1</sup>, pH 3 et ~51°C (nr = 3).

### III.2.1.1.4. La sélectivité de séparation des peptides

L'évaluation de la sélectivité des membranes a été basée sur la méthode de Kapel *et al.* (2011). Brièvement, pour évaluer la sélectivité de la membrane pour toutes les molécules de l'hydrolysats, une analyse en CLHP-ES est réalisée des compartiments rétentat et perméat. Ces chromatogrammes donnent la répartition de la taille et les quantités de chaque molécule ( $x$ ) dans les compartiments. Puis, un calcul de rétention est réalisé pour chaque point du chromatogramme, qui donne ensuite une corrélation entre la rétention et la masse molaire ( $R_{obs,x} = f(MM_x)$ ) grâce à un étalonnage préalable de la colonne d'ES ( $MM_x = f(TR_x)$ ).

La *Figure 51 A* montre ainsi les chromatogrammes des perméats et la *Figure 51 B* la courbe de calibration de la rétention pour chaque seuil de coupure en fonctions des molécules présentes dans l'hydrolysats.

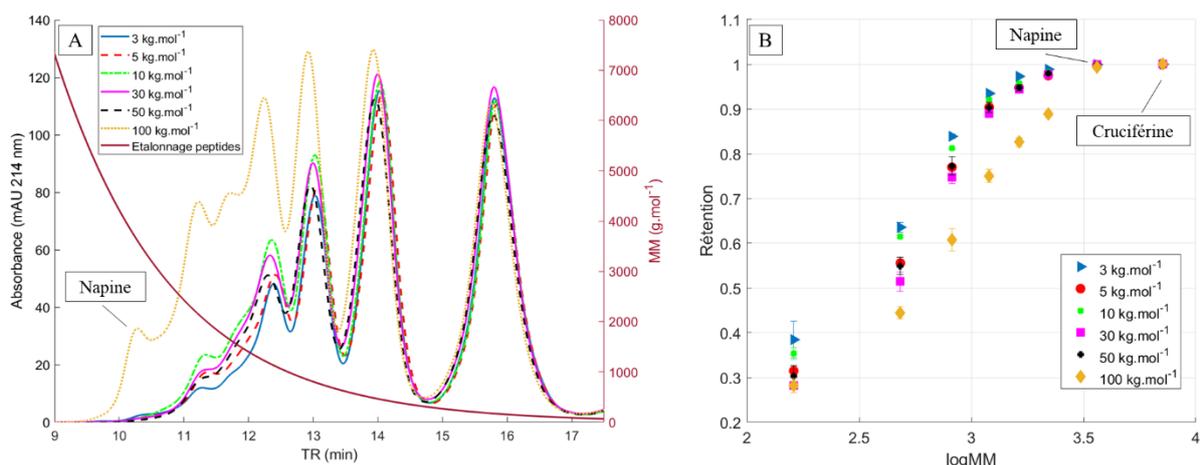


Figure 51 : (A) Chromatogrammes des perméats ( $nr = 3$ ) issus des membranes aux différents seuils de coupure (Biosep s2000 H<sub>2</sub>O/ACN/TFA 54,9/45/0,1 (v/v/v) 0,6 mL.min<sup>-1</sup>). Etalonnage peptidique de la colonne CLHP-ES :  $MM = 10^{-0,2394*TR+6,0189}$ . (B) Courbes de rétentions réelles correspondantes en fonction de la transformation logarithmique de leur masse molaire ( $nr = 3$ ). Mesures réalisées à PTM de 1 bar et au taux de cisaillement de 3000 s<sup>-1</sup>. Suspension de l'hydrolysats à 10 g.L<sup>-1</sup>, pH 3 et ~51°C ( $nr = 3$ ).

Selon l'étalonnage de la colonne CLHP-ES, les peptides sont séparés en six groupes correspondants aux six pics peptidiques identifiés dont la répartition des masses molaires est présentée dans le *Tableau 18* ci-dessous :

Tableau 18 : Groupements des masses molaires en fonction du chromatogramme du perméat et de l'étalonnage peptidique de la colonne de CLHP-ES.

Masse molaire à l'apex ( $g.mol^{-1}$ )	Etendue des masses molaires dans le signal ( $g.mol^{-1}$ )	
	[TR (min)]	
2150	3170 – 1835	[10,52 – 11,51]
1670	1835 – 1500	[11,51–11,87]
1150	1500 – 995	[11,87– 12,62]
800	995 – 625	[12,62 – 13,46]
460	625 – 300	[13,46 – 14,79]
160	300 – 80	[14,79 – 17,19]

Pour le groupe de peptides de  $160 g.mol^{-1}$ , un signal chromatographique quasi-identique est observé, indiquant un transfert de ces peptides similaire quelle que soit la membrane. Les valeurs de rétention en revanche permettent de noter qu'elles varient légèrement entre 0,38 (seuil de  $3 kg.mol^{-1}$ ) et 0,28 (seuils de 30 et  $100 kg.mol^{-1}$ ). Le groupe peptidique de  $460 g.mol^{-1}$  a plus de différences au niveau du transfert et forme des groupes de rétention similaires pour les seuils de 3 et  $10 kg.mol^{-1}$  ( $0,635 \pm 0,011$  et  $0,615 \pm 0,003$  respectivement), puis 5, 50 et  $30 kg.mol^{-1}$  ( $0,555 \pm 0,004$  ;  $0,549 \pm 0,019$  et  $0,514 \pm 0,021$  respectivement), et enfin le seuil de  $100 kg.mol^{-1}$  ( $0,444 \pm 0,013$ ). Pour les groupes de peptides de 800 à  $2150 g.mol^{-1}$ , plus les masses molaires sont élevées et plus elles sont retenues par la membrane. Cela est attendu, cependant les valeurs de rétention montrent que les membranes de 3 à  $50 kg.mol^{-1}$  ont tendance à avoir la même sélectivité ( $\sim 0,78$  pour le groupe de  $800 g.mol^{-1}$ ,  $\sim 0,91$  pour le groupe de  $1150 g.mol^{-1}$ ,  $\sim 0,94$  pour le groupe de  $1670 g.mol^{-1}$  et  $\sim 0,97$  pour le groupe de  $2150 g.mol^{-1}$ ), alors que la membrane au seuil de  $100 g.mol^{-1}$  démontre une distinction franche avec une rétention systématiquement inférieure ( $0,607 \pm 0,024$  ;  $0,750 \pm 0,014$  ;  $0,826 \pm 0,009$  et  $0,888 \pm 0,006$  pour les groupes de peptides de 800, 1150, 1670 et  $2150 g.mol^{-1}$  respectivement).

Ainsi, de manière générale la sélectivité des seuils de coupure entre 3 et  $50 kg.mol^{-1}$  est quasiment identique, alors que celle du seuil de coupure de  $100 kg.mol^{-1}$  est différente avec des valeurs de rétention en moyenne de 16% inférieures pour les peptides. Ceci reste en accord avec les observations du paragraphe précédent, qui expose les valeurs similaires de la résistance membranaire due à l'effet de polarisation de concentration, déterminant le flux de matière des peptides beaucoup plus que l'effet tamis de la membrane (Aimar 2006; Aimar *et al.* 2010a). Ce phénomène de rétention concorde avec ce qui a pu être observé pour un réacteur continu de protéines de soja avec les fibres creuses en PS de 3 et  $30 kg.mol^{-1}$ , qui montraient peu de différences de profil, sauf pour les fractions peptidiques de 500-2200 et 3000-4000  $g.mol^{-1}$

(Chiang *et al.* 1999). Le même phénomène est observé pour l'hydrolysats de caséines ultrafiltrées sur PS et polyethersulfone (PES) de géométrie plane de 5 et 10  $kg.mol^{-1}$  (Gourley *et al.* 1995). Concernant les protéines, la napine a une rétention proche de 1 pour les seuils de coupure de 3 à 50  $kg.mol^{-1}$  et de 0,97 pour le seuil de 100  $kg.mol^{-1}$ . La rétention pour la cruciférine est égale à 1 pour toutes les membranes. Ainsi, la rétention pour les protéines est satisfaisante pour tous les seuils de coupure étudiés.

Finalement, afin d'obtenir des performances de fractionnement satisfaisantes et compte tenu des rétentions des peptides totaux, de leur sélectivité, et de la rétention de la napine, les membranes aux seuils de coupure les plus petites ont été retirées de l'étude. Seuls trois seuils, aux valeurs de rétentions les plus faibles, ont été conservés (30, 50 et 100  $kg.mol^{-1}$ ) pour la suite des études de performances de fractionnement (pureté et rendement en napine et productivité en peptides).

### III.2.1.2. Influence de la *PTM* et de la vitesse de recirculation

Une étude plus poussée a été faite dans d'autres conditions de *PTM* et de vitesse d'écoulement tangentielle pour déterminer l'influence de ces paramètres sur la rétention des molécules, le flux de perméat et la résistance de la couche de polarisation. La pression maximale possible sur les fibres creuses utilisées étant de 2,4 *bar*, deux pressions ont alors été testées : 1 et 2 *bar*. Le constructeur préconise également, pour la vitesse du fluide d'alimentation, de se situer dans des gammes de taux de cisaillement entre 2000 et 4000  $s^{-1}$  pour des fluides clairs et aux particules sensibles au cisaillement, entre 4000 et 8000  $s^{-1}$  pour des fluides moyennement chargés et entre 8000 et 16000  $s^{-1}$  pour des fluides très chargés, afin d'avoir un transfert de matière satisfaisant (GE Healthcare). Comme l'hydrolysats avait relativement une faible concentration et que l'intégrité des protéines et enzyme devrait être préservée, il a été décidé d'observer l'effet des deux plus basses préconisations en fixant les taux de cisaillement à 3000  $s^{-1}$  et 6000  $s^{-1}$ .

#### III.2.1.2.1. La rétention de la napine et des peptides totaux

La *Figure 52 A* présente l'influence des conditions opératoires sur la rétention des peptides totaux et de la napine à 1 et 2 *bar* de *PTM* avec le taux de cisaillement à 3000  $s^{-1}$ , et la *Figure 52 B* avec le taux de cisaillement de 6000  $s^{-1}$ .

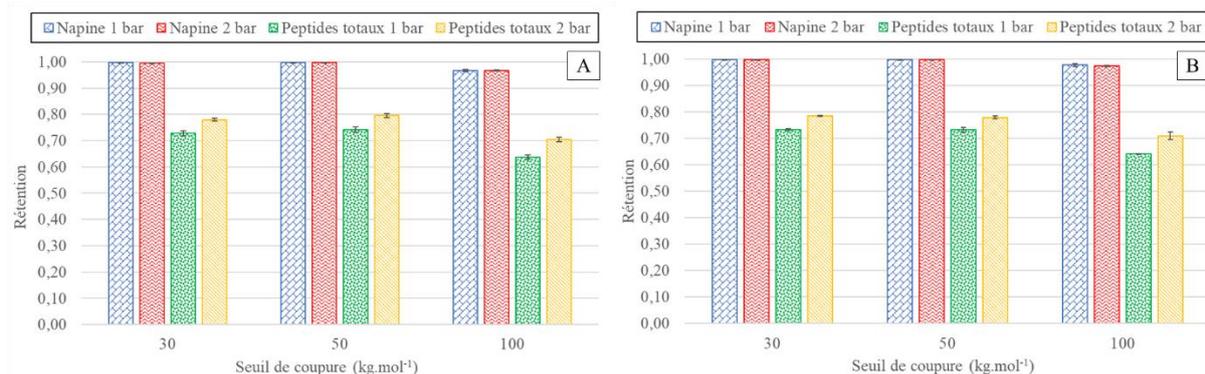


Figure 52 : Répartition de la rétention de la napine et des peptides totaux aux PTM de 1 et 2 bar par les membranes aux différents seuils de coupure à (A) 3000 s<sup>-1</sup> de taux de cisaillement et à (B) 6000 s<sup>-1</sup> de taux de cisaillement. Suspension de l'hydrolysats à 10 g.L<sup>-1</sup>, pH 3 et ~51°C (nr = 3).

Pour la rétention de la napine, toutes les valeurs sont proches de 1 pour les seuils de 30 et 50 kg.mol<sup>-1</sup> à toutes les PTM et taux de cisaillement (~0,996). Pour le seuil de 100 kg.mol<sup>-1</sup> la rétention est légèrement plus basse : 0,967 ± 0,004 ; 0,966 ± 0,002 ; 0,977 ± 0,005 et 0,974 ± 0,002 pour la PTM de 1 et de 2 bar à 3000 s<sup>-1</sup> et pour la PTM de 1 et 2 bar à 6000 s<sup>-1</sup>, respectivement. Cependant, cela reste en accord avec une valeur de rétention acceptable pour une purification de la napine avec un rendement élevé.

Ces observations montrent qu'il n'y a pas d'influence des conditions opératoires (PTM et vitesse d'écoulement tangentielle) sur la rétention de la napine. Elle est proche de 1 dans tous les cas.

Pour les rétentions des peptides, les valeurs de rétention à 3000 s<sup>-1</sup> et PTM de 1 bar sont de 0,727 ± 0,009 ; 0,742 ± 0,010 et 0,637 ± 0,007 pour les seuils de 30, 50 et 100 kg.mol<sup>-1</sup> respectivement. Avec la PTM de 2 bar les rétentions sont un peu plus élevées, de l'ordre de 6% à 9% avec les valeurs de 0,779 ± 0,005 ; 0,795 ± 0,006 et 0,704 ± 0,007 respectivement. Pour le taux de cisaillement de 6000 s<sup>-1</sup> à PTM de 1 bar les valeurs sont similaires, avec des rétentions de 0,733 ± 0,003 ; 0,732 ± 0,009 et 0,641 ± 0,001 pour les seuils de coupure de 30, 50 et 100 kg.mol<sup>-1</sup> respectivement. Et à la PTM de 2 bar, une légère augmentation de même ordre (6% à 9%) a également lieu pour les valeurs de rétention de 0,785 ± 0,002 ; 0,779 ± 0,006 et 0,709 ± 0,013 respectivement.

Ainsi, la rétention des peptides totaux est entre 9% et 14% plus basse pour le seuil de coupure de 100 kg.mol<sup>-1</sup> par rapport à 30 et 50 kg.mol<sup>-1</sup> pour toutes les conditions. Il n'y a pas de différence significative en fonction de la vitesse d'écoulement appliquée pour une même PTM et un même seuil de coupure. Or, une augmentation du taux de cisaillement est censée

augmenter le transfert de matière, car il augmente le flux (Premnath & Agarwal 2017). On peut alors en conclure que les suspensions sont peu chargées en solutés est donc que le transfert est déjà à son maximum et indépendant de la vitesse d'écoulement tangentielle (Jönsson & Trägårdh 1990; Sablani *et al.* 2006). Par contre, les rétentions sont significativement supérieures à 2 *bar* qu'à 1 *bar*, quelle que soit la membrane. Le même phénomène a été observé par Chabeaud *et al.* (2009), qui l'a expliqué par la présence de la couche de polarisation plus importante à une *PTM* plus élevée, qui agit comme une seconde membrane et augmente la rétention des peptides (Marshall *et al.* 1993). En fait, la *PTM* augmente le flux de perméat jusqu'à une limite de flux critique (*cf.* **Figure 22** p.74 *EB*), mais la couche de polarisation augmente également et la rétro-diffusion dans la membrane (*cf.* §I.3.4.1 p.60 *EB*), réduisant le passage des solutés (Zheng *et al.* 2018). C'est l'effet de compaction membranaire (Jönsson & Trägårdh 1990). Pour cette raison, au lieu de fonctionner à *PTM* haute et constante, un fonctionnement à flux constant est recommandé, avec une *PTM* faible qui augmente progressivement, ou bien une *PTM* constante mais modérée, afin de limiter les pertes de flux dues à l'encrassement au cours du temps (Sablani *et al.* 2006). Entre les membranes de 50 et 30  $kg.mol^{-1}$ , la rétention des peptides totaux n'est pas statistiquement différente, que ce soit à 1 ou à 2 *bar*. La sélectivité serait donc similaire pour les deux membranes qui seront susceptibles d'avoir les mêmes performances de fractionnement. C'est ce qui est considéré plus en détail dans le paragraphe suivant en étudiant les flux de perméat et l'effet de polarisation de concentration de chaque membrane.

### III.2.1.2.2. Le flux de perméat et l'effet de polarisation de concentration

Les flux de perméat ont été mesurés pour les trois membranes (30, 50 et 100  $kg.mol^{-1}$ ) aux deux *PTM* (1 et 2 *bar*) et sont présentés dans la **Figure 53 A** pour le taux de cisaillement de 3000  $s^{-1}$  et **Figure 53 B** pour le taux de cisaillement de 6000  $s^{-1}$ .

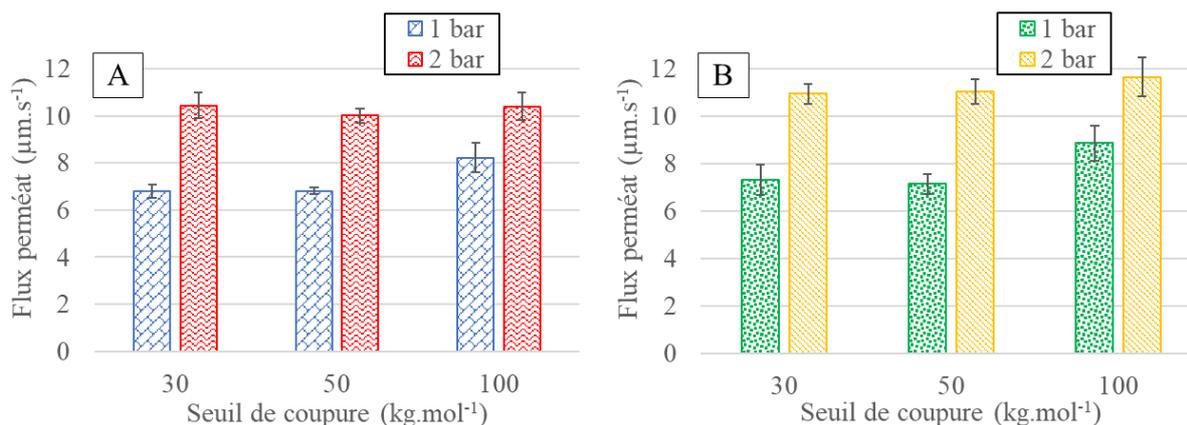


Figure 53 : Flux de perméat des conditions opératoires à PTM de 1 et 2 bar au (A) taux de cisaillement à 3000 s<sup>-1</sup> et au (B) taux de cisaillement de 6000 s<sup>-1</sup>. Suspension de l'hydrolysate à 10 g.L<sup>-1</sup>, pH 3 et ~51°C (nr = 3).

Pour le taux de cisaillement à 3000 s<sup>-1</sup> et PTM de 1 bar les membranes aux seuils de coupure de 30 et 50 kg.mol<sup>-1</sup> présentent les mêmes flux (6,81 ± 0,27 µm.s<sup>-1</sup> et 6,81 ± 0,55 µm.s<sup>-1</sup> respectivement) et le seuil de 100 kg.mol<sup>-1</sup> a un flux un peu plus élevé de 17% (8,23 ± 0,64 µm.s<sup>-1</sup>). Pour la PTM à 2 bar, ce sont les seuils de 30 et 100 kg.mol<sup>-1</sup> qui ont des flux quasi-identiques (10,44 ± 0,13 µm.s<sup>-1</sup> et 10,40 ± 0,42 µm.s<sup>-1</sup> respectivement) et celui du seuil de 50 kg.mol<sup>-1</sup> est légèrement inférieur, de 10,01 ± 0,31 µm.s<sup>-1</sup>.

A à 6000 s<sup>-1</sup> et PTM de 1 bar, une tendance similaire est observée. Les seuils de 30 et 50 kg.mol<sup>-1</sup> ont des valeurs de flux qui ne sont pas statistiquement différents (7,13 ± 0,63 µm.s<sup>-1</sup> et 7,13 ± 0,59 µm.s<sup>-1</sup> respectivement) et le seuil de 100 kg.mol<sup>-1</sup> présente un flux de 19% plus élevé (8,23 ± 0,74 µm.s<sup>-1</sup>). Les flux à PTM de 2 bar ne sont pas statistiquement différents avec les valeurs de 10,93 ± 0,43 µm.s<sup>-1</sup>, 11,03 ± 0,53 µm.s<sup>-1</sup> et 11,64 ± 0,83 µm.s<sup>-1</sup> pour les seuils de coupure de 30, 50 et 100 kg.mol<sup>-1</sup> respectivement.

Ces flux sont environ de 60% à 90% plus faibles que le flux en eau au début du procédé, témoignant de la couche de polarisation importante, voire en plus de l'encrassement, qui résulte en valeurs très proches finalement quel que soit le seuil de coupure, à des conditions opératoires identiques. Il a été démontré, en effet, avec un hydrolysate de caséines, que les membranes de PS sont sujettes à une adsorption particulière de peptides hydrophobes (terminaison-N-terminale hydrophobe) et les peptides avec une charge positive au C-terminal (Meireles *et al.* 1991b; Gourley *et al.* 1994, 1998).

Un doublement du taux de cisaillement augmente légèrement les flux (10% tout au plus), par contre un doublement de la PTM permet une augmentation entre 20 et 35% des flux. Une

*PTM* de 2 bar permettrait alors d'avoir la meilleure productivité possible même si la rétention des peptides totaux est 9% à 14% plus élevée (cf. *Figure 53* p.175).

Ces valeurs de flux ont permis par la suite de calculer les valeurs de résistance de la filtration, notamment due à la couche de polarisation. La *Figure 54 A* présente les différentes résistances de polarisation à *PTM* de 1 et 2 bar à  $3000\text{ s}^{-1}$  de taux de cisaillement, alors que la *Figure 54 B* présente celles au taux de cisaillement de  $6000\text{ s}^{-1}$ .

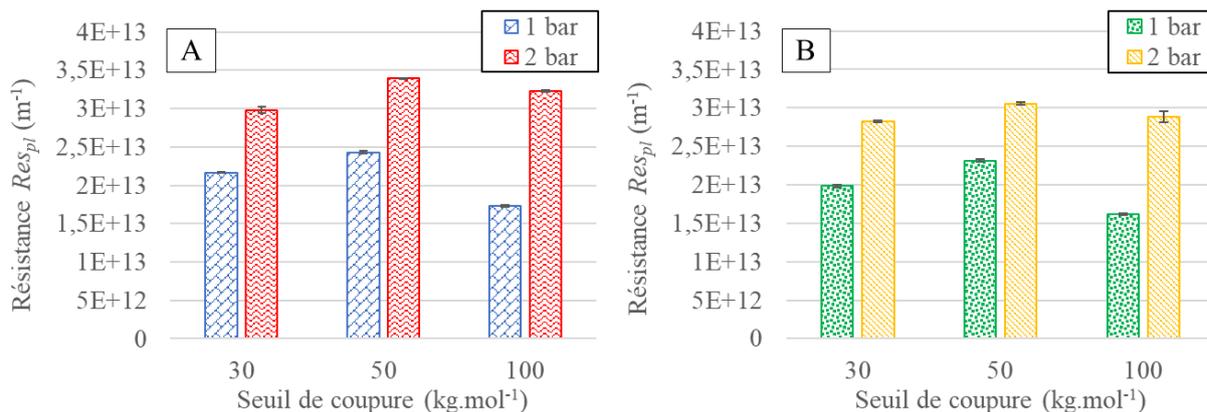


Figure 54 : Résistance de la couche de polarisation des membranes aux seuils de coupure 30, 50 et  $100\text{ kg.mol}^{-1}$  au (A) taux de cisaillement de  $3000\text{ s}^{-1}$  et au (B) taux de cisaillement de  $6000\text{ s}^{-1}$ . Suspension de l'hydrolysats à  $10\text{ g.L}^{-1}$ , pH 3 et  $\sim 51^\circ\text{C}$  ( $nr = 3$ ).

Les résistances de polarisation à  $3000\text{ s}^{-1}$  montrent que celle du seuil à  $50\text{ kg.mol}^{-1}$  a les plus grandes valeurs à 1 ou 2 bar ( $2,42 \pm 0,02 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  et  $3,39 \pm 0,007 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  respectivement) avec une différence de 28% entre les deux. Viennent ensuite celles de  $30\text{ kg.mol}^{-1}$  puis de  $100\text{ kg.mol}^{-1}$  dont les valeurs sont à hauteur de  $2,16 \pm 0,007 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  et  $1,73 \pm 0,01 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  respectivement, pour une *PTM* de 1 bar. A la *PTM* de 2 bar en revanche, le seuil de  $30\text{ kg.mol}^{-1}$  présente moins d'accroissement de résistance (27%) que le seuil de  $100\text{ kg.mol}^{-1}$  (46%) avec les valeurs respectives de  $2,98 \pm 0,04 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  et  $3,22 \pm 0,01 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$ .

Les résistances de polarisation à  $6000\text{ s}^{-1}$  ont les mêmes tendances, avec la membrane au seuil de  $50\text{ kg.mol}^{-1}$  aux valeurs les plus élevées à 1 et 2 bar ( $2,31 \pm 0,02 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  et  $3,05 \pm 0,02 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  respectivement) avec une différence de 24% entre les deux. S'en suivent les seuils de  $30\text{ kg.mol}^{-1}$  puis de  $100\text{ kg.mol}^{-1}$  avec les valeurs de  $1,98 \pm 0,02 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  et  $1,61 \pm 0,01 \times 10^{13}\text{ m}^{-1}$  respectivement, pour une *PTM* de 1 bar. Enfin, pour la *PTM* à 2 bar, le seuil de  $30\text{ kg.mol}^{-1}$  présente un accroissement de résistance de 29% avec une valeur de

résistance de  $(2,82 \pm 0,009) \times 10^{13} m^{-1}$ . Le seuil de  $100 kg.mol^{-1}$  présente un accroissement de 44% avec une valeur de résistance de  $(2,88 \pm 0,07) \times 10^{13} m^{-1}$ .

Suivant ces observations, on constate que la vitesse de l'écoulement tangentiel contribue légèrement à la diminution de la résistance, ce qui est attendu étant donné que les forces de cisaillement sont plus grandes et donc déstabilisent la couche de polarisation en surface de la membrane (Bacchin 1994). Cependant, cela représente moins de 15% (tout au plus) de différences entre ces valeurs de résistances (pour une même *PTM* et une même membrane). Cet écart reste marginal par rapport à la vitesse d'écoulement qui a été doublée. Par contre, quel que soit le taux de cisaillement et la membrane, une *PTM* à 2 bar induit systématiquement une résistance plus élevée. C'est le même phénomène de compression de membrane décrite dans le paragraphe précédemment. La *PTM* augmente le flux de perméat, mais aussi l'accumulation de particules (protéines, peptides, agrégats) à la surface de la membrane, et découle sur l'augmentation de l'encrassement et de la couche de polarisation (Jönsson & Trägårdh 1990; Zheng *et al.* 2018). Similairement, les protéines d'albumine du sérum bovin (chargés positivement) ont été capables de former des agrégats avec une forte affinité avec la surface d'une membrane de PS de  $77-83 kg.mol^{-1}$  de seuil de coupure (chargé négativement) (Esfahani *et al.* 2015). Quant à l'effet des seuils de coupure, à  $3000 s^{-1}$  ou à  $6000 s^{-1}$  et 1 bar la membrane au seuil de coupure de  $100 kg.mol^{-1}$  présente de manière cohérente, statistiquement la plus faible résistance, précédée par la  $30 kg.mol^{-1}$  puis la  $50 kg.mol^{-1}$ . En revanche, à 2 bar la résistance augmente considérablement à  $100 kg.mol^{-1}$  et ainsi la différence n'est plus significative entre le seuil de 100 et la  $30 kg.mol^{-1}$ . Cela est encore l'effet de la *PTM* qui augmente la couche de polarisation, découlant sur un encrassement plus important. Effectivement, il a été observé que plus les pores des membranes sont larges, plus elles sont sujettes à un encrassement par des particules de faible poids moléculaire (Carić *et al.* 2000). Les travaux de Meireles *et al.* (1991) sur des membranes en PS à des seuils de coupure de 10, 40 et  $100 kg.mol^{-1}$  et des suspensions de protéines ont également montré des résistances hydrauliques similaires et ont conclu à une indépendance de l'encrassement des conditions opératoires.

Les membranes aux seuils de coupure de 30 et  $50 kg.mol^{-1}$  présentent des valeurs statistiquement similaires (aux mêmes conditions). Cet écart ne présenterait donc pas de différences à la formation de la couche de polarisation et leur sélectivité serait similaire. C'est ce qui est étudié dans le paragraphe suivant.

### III.2.1.2.3. La sélectivité de séparation des peptides

La *Figure 55* présente les courbes de sélectivité de tous les groupes de molécules pour les seuils de coupure de 30, 50 et 100  $kg.mol^{-1}$  ainsi pour que pour les différentes conditions opératoires.

La *Figure 55 A* montre que pour le seuil de 30  $kg.mol^{-1}$  les rétentions pour les peptides de 2150 à 1150  $g.mol^{-1}$  sont similaires ( $\sim 0,98$  ;  $\sim 0,95$  et  $\sim 0,91$ ) quelle que soit la *PTM* et la vitesse tangentielle. Puis, la *PTM* entraîne des légères différences des rétentions pour les groupes de peptides de 800, 460 et 160  $g.mol^{-1}$  : à *PTM* de 1 *bar* les valeurs sont des  $\sim 0,75$  ;  $\sim 0,52$  et  $\sim 0,28$  respectivement et à *PTM* de 2 *bar* les valeurs sont de  $\sim 0,82$  ;  $\sim 0,63$  et  $\sim 0,35$ . Les différents taux de cisaillement ne présentant pas de différences significatives.

Même chose pour le seuil de 50  $kg.mol^{-1}$ , présenté par la *Figure 55 B*. Les groupes de peptides de 2150, 1670 et 1150  $g.mol^{-1}$  ont des valeurs de rétention très proches quelles que soient les conditions opératoires :  $\sim 0,98$  ;  $\sim 0,94$  et  $\sim 0,91$  respectivement. Les peptides des groupes suivants (800 à 160  $g.mol^{-1}$ ) ont des rétentions légèrement différentes entre la *PTM* de 1 et 2 *bar* (pas d'influence du taux de cisaillement). A la *PTM* de 2 *bar* les valeurs de rétention sont de  $\sim 0,83$  ;  $\sim 0,65$  et  $\sim 0,37$ , et à *PTM* de 1 *bar* les valeurs sont de  $\sim 0,76$  ;  $\sim 0,54$  et  $\sim 0,29$ .

La *Figure 55 C* présente la sélectivité du seuil à 100  $kg.mol^{-1}$ , qui a nettement des rétentions plus faibles et des différences plus marquées aux niveaux des groupes peptidiques. Le taux de cisaillement ne montre toujours pas de différences significatives. A la *PTM* de 2 *bar* les valeurs de rétention sont de  $\sim 0,92$  ;  $\sim 0,88$  ;  $\sim 0,82$  ;  $\sim 0,71$  ;  $\sim 0,54$  et  $\sim 0,33$  pour les groupes de peptides de 2150, 1670, 1150, 800, 460 et 160  $g.mol^{-1}$  respectivement. Pour la *PTM* de 1 *bar* ces valeurs sont plus faibles :  $\sim 0,89$  ;  $\sim 0,83$  ;  $\sim 0,75$  ;  $\sim 0,61$  ;  $\sim 0,44$  et  $\sim 0,27$  respectivement pour les mêmes groupes de peptides.

Systématiquement donc, une légère distinction est observée par la *PTM*, soit pour les trois groupes de peptides aux masses molaires les plus faibles, soit pour tous les groupes. Ce phénomène observé pour la rétention totales des peptides (*cf.* §III.2.1.1.1 p.165 *R&D*) est ainsi la conséquence de la rétention des groupes des peptides individualisés, dont le transfert est régi par la couche de polarisation où plus la *PTM* est élevée, plus les peptides seront retenus (Marshall *et al.* 1993; Ghosh & Cui 2000; Chabeaud *et al.* 2009b). Ceci est donc en accord avec l'analyse précédente de la couche de polarisation où à 2 *bar* elle est plus importante qu'à 1 *bar*.

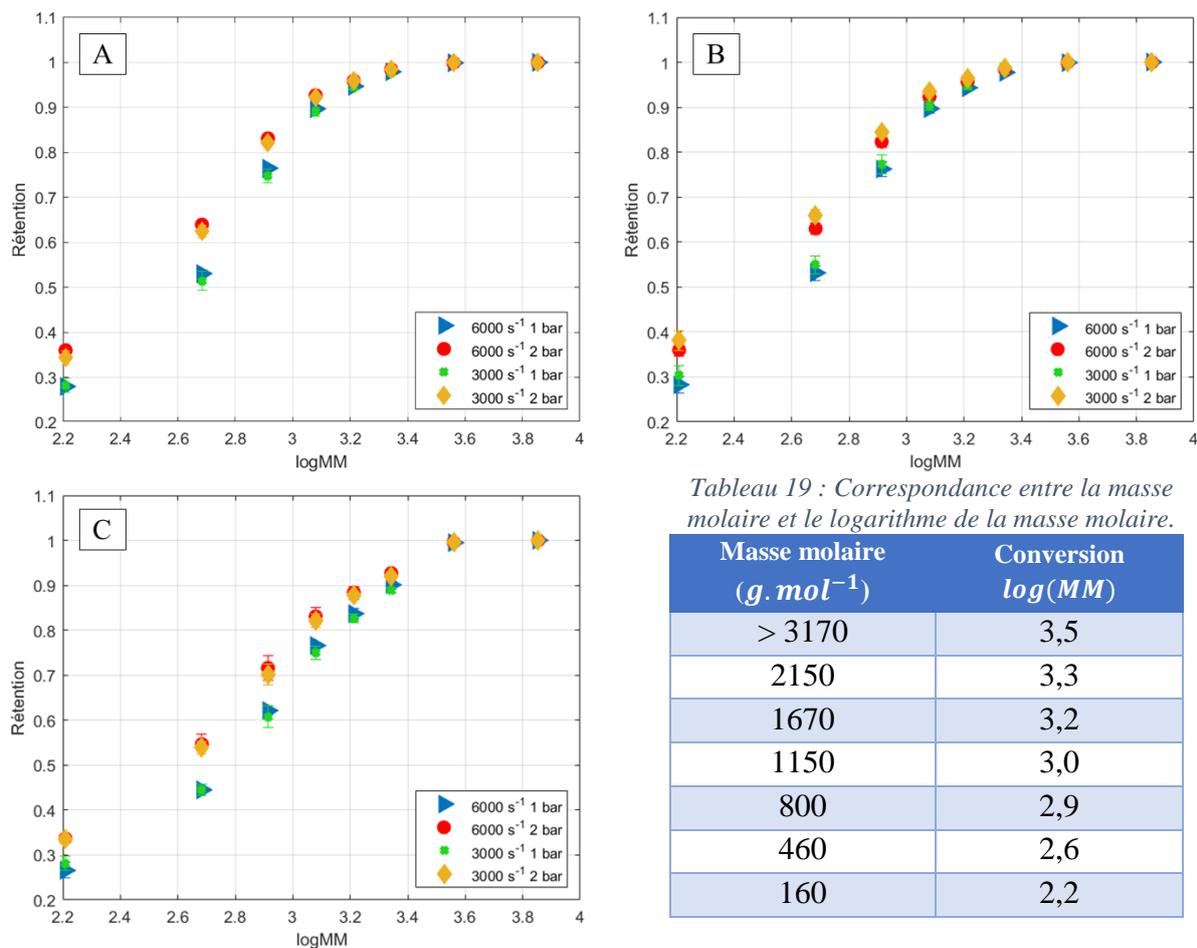


Tableau 19 : Correspondance entre la masse molaire et le logarithme de la masse molaire.

Masse molaire ( $g \cdot mol^{-1}$ )	Conversion $log(MM)$
> 3170	3,5
2150	3,3
1670	3,2
1150	3,0
800	2,9
460	2,6
160	2,2

Figure 55 : Valeurs des rétentions réelles calculées des membranes aux différentes conditions opératoires pour les seuils de coupure sélectionnés. Suspension de l'hydrolysate à  $10 g \cdot L^{-1}$ , pH 3 et  $\sim 51^{\circ}C$  ( $nr = 3$ ). La napine et la cruciférine sont représentées aux valeurs de 3,5 et 3,8 pour les montrer sur les mêmes graphes que les peptides, mais cela ne correspond pas à leur masse molaire ( $14,8$  et  $50 kg \cdot mol^{-1}$ ). (A)  $30 kg \cdot mol^{-1}$ . (B)  $50 kg \cdot mol^{-1}$ . (C)  $100 kg \cdot mol^{-1}$ .

Un des critères de sélection est le flux de perméat le plus élevé, pour une productivité optimale. Or, les flux à 1 bar sont environ 30% plus faible qu'à 2 bar (Figure 53 p.175), alors qu'en moyenne les rétentions des groupes peptidiques ne diffèrent que de 16% entre les deux PTM. Ainsi, cette différence n'est pas considérée comme plus importante et donc la condition au flux le plus élevé est conservée pour l'évaluation des performances.

Finalement, la condition à 2 bar est choisie pour le flux élevé qu'elle prodigue, et la vitesse de recirculation au taux de cisaillement de  $3000 s^{-1}$  est gardée pour limiter ces forces de cisaillement qui pourraient limiter l'action de l'enzyme dans l'étape suivante de mise en œuvre du REM (Prazeres & Cabral 1994).

### III.2.2. Comparaisons des performances : concentration discontinue vs diafiltration

Les performances séparatives ont été évaluées par la mise en œuvre de l'UF de l'hydrolysats optimal. La séparation membranaire peut être faite en deux modes principalement : en concentration discontinue (CD) ou en diafiltration (DF).

La CD est composée d'un bac d'alimentation contenant l'hydrolysats qui est envoyé vers la membrane (cf. *Figure 20* p.65 *EB*). Le perméat est récolté jusqu'à une réduction volumique critique (volume minimal de remplissage de la membrane et des tuyaux de l'appareillage) et le suivi peut être réalisé par le facteur de réduction volumique (*FRV*, *Eq. 29* p.64 *EB*) qui est le quotient entre le volume dans le bac initial et le volume à un temps  $t$  de l'avancement du procédé (Muller *et al.* 1999; Aimar 2006). Cependant, la réduction volumique découle sur une élévation de la concentration du côté rétentat, diminuant le flux de perméat et ainsi les performances (élimination des peptides plus lente par exemple).

La diafiltration (DF) consiste en une implémentation similaire, sauf que le volume initial dans le bac d'alimentation est gardé stable par ajout d'eau ou de tampon (cf. *Figure 21* p.66 *EB*). Ainsi, ce procédé est apparenté à une extraction par l'eau pour les molécules transmises. Ce système est suivi par le nombre de diavolumes (*DV*, *Eq. 30* p.65 *EB*), c'est-à-dire le nombre de volumes équivalents au volume initial (Muller *et al.* 1999; Aimar 2006). Ce mode permet de garder un flux de perméat quasiment identique et équivalent au flux initial tout le long du procédé, mais la consommation d'eau est par conséquent élevée par rapport à une CD.

Les deux mises en œuvre ont donc des capacités de transfert de molécules différentes, amenant à des performances différentes, qui doivent être étudiée pour une implémentation optimale. C'est ce qui est réalisé dans cette partie, schématisé par la *Figure 56* : le fractionnement de l'hydrolysats optimal est réalisé dans les conditions opératoires optimales sélectionnées précédemment (seuils de coupure de 30 et 100  $kg.mol^{-1}$  à *PTM* de 2 bar, taux de cisaillement de 3000  $s^{-1}$  et dans les conditions de l'hydrolyse à *pH* 3 et 55°C) en CD et DF. Les performances ont été suivies côté rétentat (rendement napine, pureté en protéines) et côté perméat (rendement en peptides totaux). La productivité a également été considérée en suivant le flux de perméat.

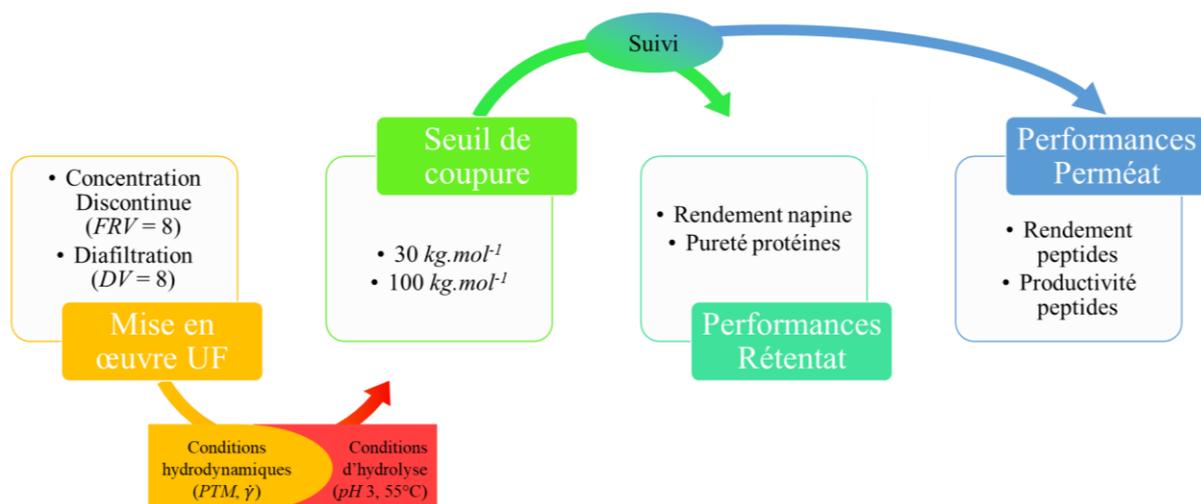


Figure 56 : Schéma de la méthodologie de l'évaluation des performances de la mise en œuvre en ultrafiltration.

### III.2.2.1. Séparation des napines et des peptides en CD et DF

#### III.2.2.1.1. Evolution des chromatogrammes massiques

Les prélèvements des rétentats et perméats au cours de l'avancement aux deux modes d'implémentation ( $FRV$  de 1 à 8 et  $DV$  de 0 à 8) avec les membranes de  $30\ kg.mol^{-1}$  ont été analysés en CLHP-ES. Les chromatogrammes résultants ont été convertis pour représenter la répartition massique de l'hydrolysat (cf. §II.4.4 p.114 *M&M*) (Bodin *et al.* 2015). Brièvement, le chromatogramme initialement enregistré à  $214\ nm$  de longueur d'onde est converti en concentration molaire pour chaque point  $x$  ( $C_x$ ) selon la loi de Beer-Lambert. Le point  $x$  représente un peptide virtuel avec un temps de rétention ( $TR_x$ ). La calibration préalable de la colonne de CLHP avec des peptides standards permet ainsi de lier la masse molaire de chaque peptide ( $MM_x$ ) à chaque  $TR_x$  et de calculer la concentration massique en chaque point  $x$  du chromatogramme. La correspondance entre les gammes de masse peptidiques et leur  $TR$  est disponible en rappel par le *Tableau 18* p.171.

La *Figure 57* présente les chromatogrammes des rétentats et perméats de la membrane de  $30\ kg.mol^{-1}$  et la *Figure 58* ceux de la membrane de  $100\ kg.mol^{-1}$ .

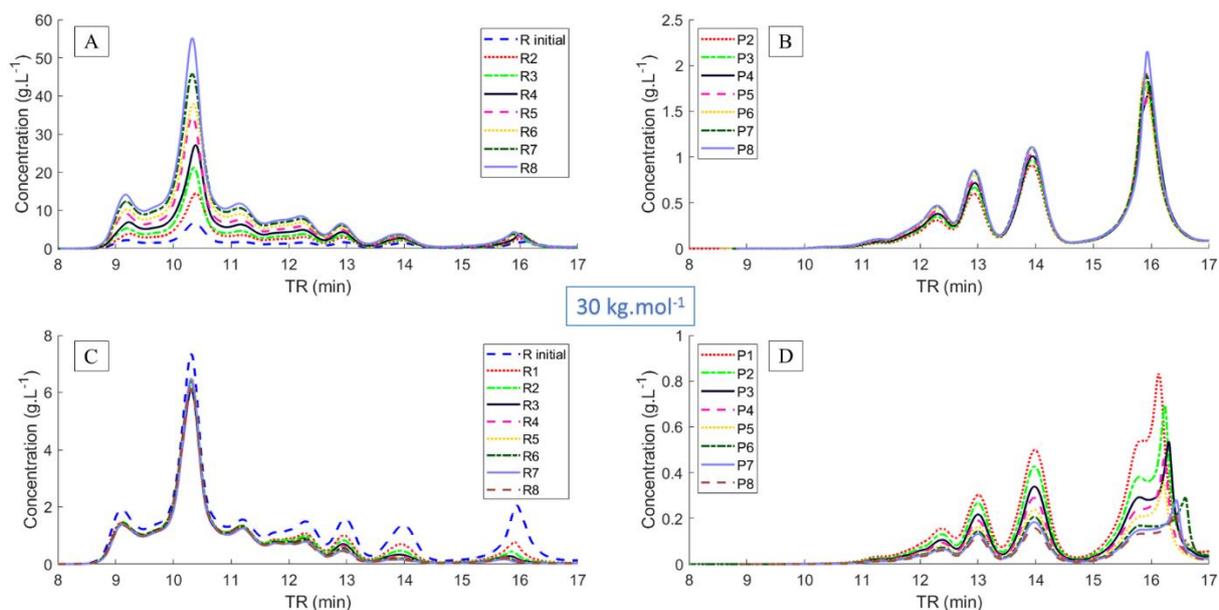


Figure 57 : Chromatogrammes ( $nr = 2$ ) en concentration massique ( $g.L^{-1}$ ) en fonction du temps de rétention (min) du fractionnement de l'hydrolysate de PTC. En mode CD, prélèvements aux (A) rétentat (dilué en analyse et multiplié par le FRV) et (B) perméat cumulé aux FRV de 1 à 8. En mode DF, prélèvements aux (C) rétentat et (D) perméat cumulé aux DV de 0 à 8. Membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup>.

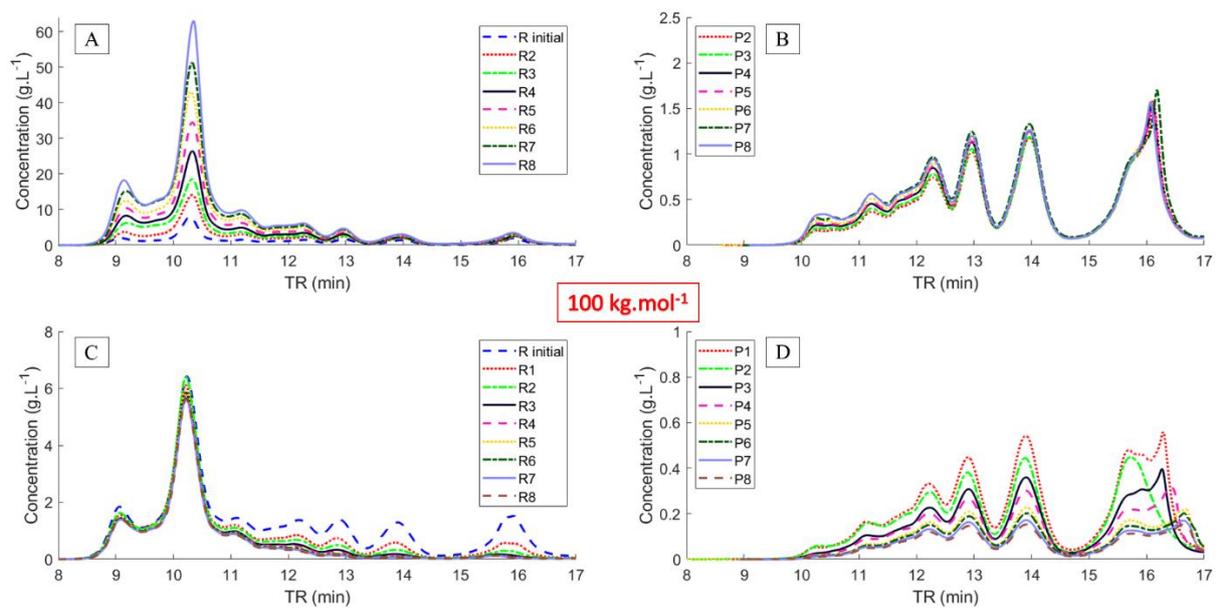


Figure 58 : Chromatogrammes ( $nr = 2$ ) en concentration massique ( $g.L^{-1}$ ) en fonction du temps de rétention (min) du fractionnement de l'hydrolysate de PTC. En mode CD, prélèvements aux (A) rétentat (dilué en analyse et multiplié par le FRV) et (C) perméat cumulé aux FRV de 1 à 8. En mode DF, prélèvements aux (C) rétentat et (D) perméat cumulé aux DV de 0 à 8. Membrane de 100 kg.mol<sup>-1</sup>.

Dans le compartiment rétentat en CD avec la membrane de 30 kg.mol<sup>-1</sup> (Figure 57 A), une forte augmentation des protéines et peptides de masses molaires supérieures à 460 g.mol<sup>-1</sup> est observée jusque FRV 8. Pour les groupes de peptides de 460 g.mol<sup>-1</sup> à 160 g.mol<sup>-1</sup>, une légère accumulation est observée jusqu'à FRV 6. Au-delà, leur concentration reste constante. La

concentration des peptides inférieurs à  $160 \text{ g.mol}^{-1}$  reste constante durant toute l'opération. Dans le compartiment perméat de la CD (*Figure 57 B*) un enrichissement progressif a lieu pour les groupes de peptides de 460 à  $2150 \text{ g.mol}^{-1}$ . Les peptides de  $160 \text{ g.mol}^{-1}$  ont le même transfert tout le long du procédé.

Pour le seuil de coupure de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ , dans le compartiment rétentat en CD (*Figure 58 A*) l'accumulation est observée pour les protéines et pour les groupes de peptides de tailles supérieures à  $1150 \text{ kg.mol}^{-1}$ . La concentration du groupe de peptides de  $800 \text{ kg.mol}^{-1}$  augmente jusqu'à *FRV* 6 puis reste constante, indiquant que leur transfert est meilleur. Cela représente environ 30% de peptides de ce groupe en moins dans le rétentat que pour le seuil de coupure de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ . Les groupes de peptides de 1150 à  $2150 \text{ g.mol}^{-1}$  ont aussi moins d'accumulation (23% environ en moyenne) et on les retrouve, en plus, grande proportion du côté du perméat. Dans le compartiment perméat (*Figure 58 B*) la concentration augmente progressivement pour les peptides de 800 à  $2150 \text{ g.mol}^{-1}$ . Les groupes de peptides de 160 et de  $460 \text{ g.mol}^{-1}$  ont une concentration plus ou moins constante tout le long du procédé de CD. La napine est moins retenue et sa concentration augmente, mais elle est de l'ordre de  $0,25 \text{ g.L}^{-1}$  à la fin dans le perméat, alors qu'elle atteint les  $31 \text{ g.L}^{-1}$  dans le rétentat. La perte est donc acceptable.

De manière générale, le seuil de coupure de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  permet d'obtenir des concentrations plus élevées (entre 11 et 30%) en groupes de peptides dans le perméat, par rapport au seuil de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ . La différence en napine n'est pas significative avec moins de 8% de concentration plus faible dans le rétentat avec le seuil de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ .

Pour le mode en DF, dans le compartiment rétentat du seuil de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  (*Figure 57 C*), l'appauvrissement en groupes de peptides de 160 et de  $460 \text{ g.mol}^{-1}$  est assez efficace : au bout de 5 diavolumes leurs concentrations ont diminuées de plus de 80%, mais il en reste encore environ 13% à la fin du procédé (par rapport à la quantité initiale). Pour les groupes peptidiques de 800 et  $1150 \text{ g.mol}^{-1}$ , les concentrations diminuent de manière plus progressive et au dernier *DV* il en reste encore 51% et 28% respectivement de leurs concentrations initiales. Pour les groupes de peptides de 1670 et  $2150 \text{ g.mol}^{-1}$ , la diminution est très faible, avec à la fin 67% et 80% respectivement des concentrations initiales. Dans le compartiment perméat (*Figure 57 D*) le groupe de peptides de  $160 \text{ g.mol}^{-1}$  a une concentration constante, alors que pour tous les autres groupes de peptides leur concentration dans le perméat augmente à chaque *DV* (données de prélèvements des perméats unitaires non présentées). Cette tendance n'est pas vraiment visible avec le perméat cumulé où les concentrations sont diluées à chaque ajout de *DV*. Ce qui

découle sur des chromatogrammes qui montrent des concentrations qui diminuent de même manière pour tous les groupes de peptides. En appliquant le facteur de dilution aux concentrations dans le perméat on retrouve néanmoins des pourcentages logiques de concentrations peptidiques transférées du rétentat au perméat final, qui est décroissant au fur et à mesure que la taille des groupes peptidiques augmente : de 99%, 82%, 58%, 30%, 15% et 5% pour les groupes de 160, 460, 800, 1150, 1670 et 2150  $g.mol^{-1}$  respectivement.

Pour le seuil de coupure de 100  $kg.mol^{-1}$ , dans le compartiment rétentat en DF (*Figure 58 C*), la majeure diminution en concentration pour tous les groupes de peptides est achevée au bout de deux *DV* (concentration diminuée de 27% à 77% par rapport à l'hydrolysats initial). La réduction par la suite est plus progressive pour des concentrations finales représentant 54%, 35%, 22%, 9%, 7% et 8% des concentrations initiales pour les groupes de peptides de 160, 460, 800, 1150, 1670 et 2150  $g.mol^{-1}$  respectivement. En comparaison avec le seuil de 30  $kg.mol^{-1}$ , ces concentrations sont plus basses de 34%, 47%, 54%, 62%, 47% et 14% pour les mêmes groupes peptidiques. Enfin, pour le compartiment perméat (*Figure 58 D*) la concentration de tous les groupes peptidiques est élevée au *DV* = 1, puis diminue au fur et à mesure avec quelques différences : la concentration reste constante pour le groupe peptidique de 160  $g.mol^{-1}$  à partir du *DV* 6, et celui du groupe 460  $g.mol^{-1}$  à partir du *DV* = 7. Les concentrations finales dans le perméat représentent ainsi 99%, 93%, 87%, 55%, 96% et 34% des concentrations initiales pour les groupes peptidiques de 160, 460, 800, 1150, 1670 et 2150  $g.mol^{-1}$  respectivement. La concentration en napine représente 8% de la concentration issus du rétentat, ce qui est acceptable pour permettre quand même une bonne purification sans perte significative.

Ces valeurs au seuil de 100  $kg.mol^{-1}$  sont donc plus intéressantes pour une purification supérieure que pour le seuil de 30  $kg.mol^{-1}$  surtout pour les groupes de peptides de haut poids moléculaire (800, 1150, 1670 et 2150  $g.mol^{-1}$ ), ce qui représente un enrichissement en peptides dans le perméat plus élevé de 39%, 81%, 25% et 29% respectivement. En revanche, pour les bas poids moléculaires (160 et 460  $g.mol^{-1}$ ) la différence est moindre, de 6% et 11% respectivement.

Ces tendances d'accumulation dans le rétentat et d'assez faible enrichissement dans le perméat (par rapport aux seuils de coupure et des masses des molécules) sont conformes aux valeurs de rétention assez hautes et de la diminution du transfert de matière en fonction de l'avancement du procédé. Ceci montre que les phénomènes d'interactions entre les composants sont les facteurs commandant le transfert (Ghosh *et al.* 2000; Muller *et al.* 2003). Par contre,

pour un cas, une faible différence de rétention induit une forte influence au niveau de la proportion de peptides transférés : 3 à 4 fois plus de peptides de 2150 et 1670  $kg.mol^{-1}$  pour le seuil de 100  $kg.mol^{-1}$  par rapport à 30  $kg.mol^{-1}$  avec des rétentions de 6 et 8% plus basses. Ce n'est pas le cas pour les autres groupes de peptides, où le facteur est au maximum de 1,3. Le transfert est donc quelque part aussi limitant pour chaque groupe de peptides, indépendamment de leur capacité de rétention, qui ne seront pas épuisés dans le rétentat même s'il en reste, sans doute bloqués par la couche de polarisation et l'encrassement.

Quoi qu'il en soit, les deux membranes permettent donc d'avoir un fractionnement assez différent qui donnerait des performances différentes. Premièrement au niveau des protéines, la membrane au seuil de 100  $kg.mol^{-1}$  serait meilleure au niveau de la purification des protéines, mais perdrait un peu en rendement en napine. Quant au seuil de 30  $kg.mol^{-1}$ , la purification sera moins élevée, mais le rendement de la napine devrait rester proche de 1. Ces hypothèses seront vérifiées dans le point suivant.

#### III.2.2.1.2. Pureté protéines et rendement napine

La *Figure 59* montre ainsi la capacité des membranes à purifier les protéines totales tout en gardant un rendement haut en napine dans les deux modes de fonctionnement. Premièrement, que ce soit en CD (*Figure 59 A*) ou en DF (*Figure 59 B*), les rendements de la napine suivent la même tendance : le rendement est meilleur à la fin des 8 *FRV* (environ 0,9) qu'à la fin des 8 *DV* (environ 0,8). En ce qui concerne la pureté des protéines, la membrane de 100  $kg.mol^{-1}$  montre des valeurs plus élevées dès le départ du procédé, et quel que soit le mode de fonctionnement. En mode CD, la pureté est jusqu'à 12% supérieure, et en DF jusqu'à 14%. En revanche, il semble qu'il ne serait pas possible d'atteindre les 100% de pureté, l'évolution semble se tendre vers sa limite à la fin des deux processus, car le transfert de peptides est de moins en moins important. Un maximum de pureté à 80,4% est donc atteint pour 100  $kg.mol^{-1}$  en DF, suivi de 71,5% en CD, puis 69,2% pour le seuil de 30  $kg.mol^{-1}$  en DF, et enfin 63,1% en CD.

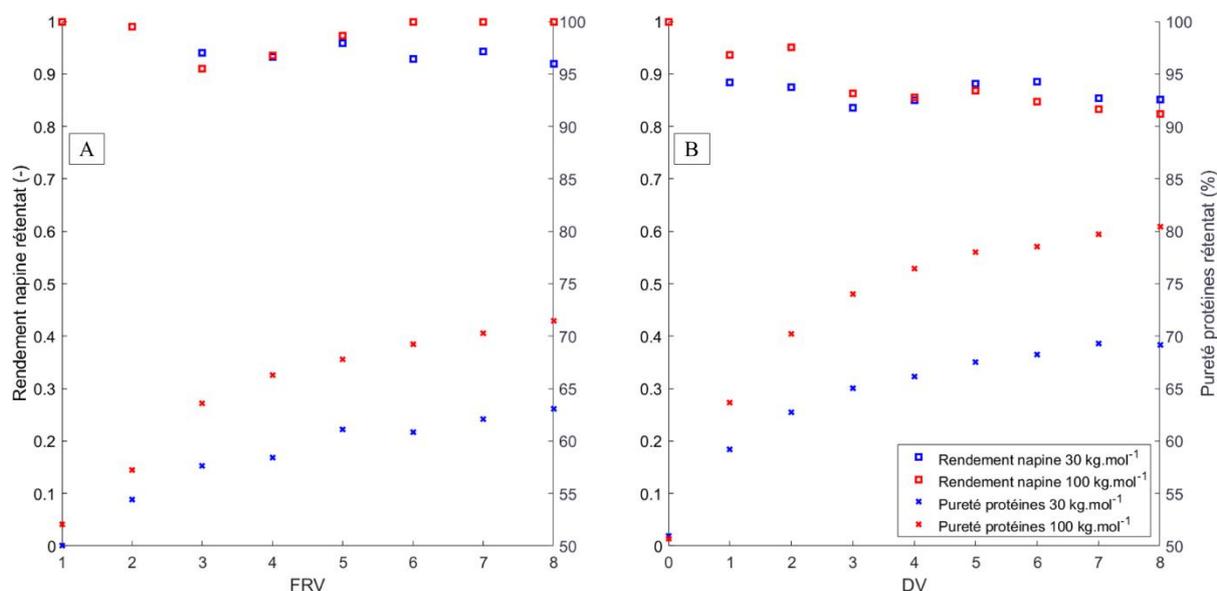


Figure 59 : Rendement en napine (carrés) et pureté en protéines (croix) suite au fractionnement en mode (A) CD et (B) DF des membranes de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  (bleu) et  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  (rouge). Moyenne sur deux répétitions. Implémentation à  $3000 \text{ s}^{-1}$  et PTM 2 bar. Température consigne à  $55^\circ\text{C}$  et pH 3.

Les deux membranes permettent donc de retenir efficacement la napine, mais la DF pour le seuil de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  semble être la meilleure option pour une purification supérieure à 80% en protéines. Cependant, ces seuls critères ne sont pas suffisants pour obtenir les performances attendues et avoir un procédé économique. Le paragraphe suivant se consacre donc à l'évaluation de la productivité en peptides et à la consommation d'eau par peptides au moyen de suivi du flux de perméat pour chaque configuration.

### III.2.2.2. Evolution des performances au cours des fractionnements en CD et DF

#### III.2.2.2.1. Flux de perméat

Entre les deux modes de séparation, la DF permet d'avoir une bonne extraction des molécules, mais consomme beaucoup plus d'eau que la CD. Cette dernière est donc plus économique au niveau de l'élimination de l'eau des produits pour en faire de la poudre, par exemple.

La *Figure 60 A* présente les flux de perméat du seuil de coupure de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  dans les deux modes d'implémentation d'UF. La CD a été réalisée au FRV de 1 à 8 et la diafiltration à volume constant aux DV de 0 à 8. La *Figure 60 B* présente les flux de perméat du seuil à  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  pour les mêmes configurations.

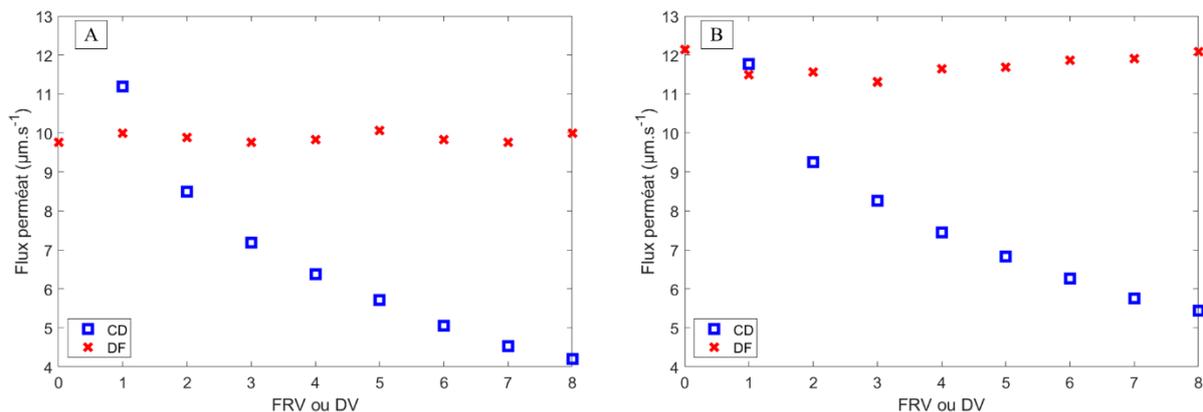


Figure 60 : Comparaisons des flux de perméat en mode CD (FRV) et DF (DV) des différentes membranes ( $nr = 2$ ). (A)  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ . (B)  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ .

Le flux en mode CD pour le seuil de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  est initialement à  $11,19 \mu\text{m.s}^{-1}$  puis décroît à  $4,2 \mu\text{m.s}^{-1}$ , ce qui représente une diminution de 62%. Le flux de la DF en revanche est au départ un peu plus bas ( $9,76 \mu\text{m.s}^{-1}$ ), mais reste très stable, voire augmente un peu à la fin du procédé ( $10 \mu\text{m.s}^{-1}$ ). Pour le seuil de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ , le flux en CD commence à  $11,77 \mu\text{m.s}^{-1}$  et termine à  $5,43 \mu\text{m.s}^{-1}$ , représentant une diminution de 53%. Le flux en DF est cette fois-ci légèrement plus élevé ( $12,14 \mu\text{m.s}^{-1}$ ), puis reste plus ou moins constant jusqu'à la fin ( $12,08 \mu\text{m.s}^{-1}$ ).

Les flux de perméat en CD ont donc une même tendance généralement observée, où l'accumulation à la surface de la membrane découle sur la formation d'une couche de polarisation. Le flux est modélisé par la théorie du film (Eq. 41 p.73 EB). Plus la concentration augmente (avec la réduction volumique), plus la diffusion vers la solution de rétentat augmente, et plus le flux diminue (Fane & Fell 1987; Jönsson & Trägårdh 1990; Chabeaud *et al.* 2009b).

Pour le mode en diafiltration, aucune variation significative du flux de perméat n'est observée au cours du procédé, ce qui est attendu pour ce type de fonctionnement (Lai *et al.* 2013; Song *et al.* 2021). En effet, selon la même théorie du film, la recirculation totale avant le soutirage définit la concentration à la membrane, donc l'ampleur de la couche de polarisation, et étant donné que par la suite aucune molécule n'est ajoutée (de l'eau seulement), elle reste constante, par conséquent le flux est constant aussi de manière générale (Asbi & Cheryan 1992). Néanmoins, cette théorie ne prend pas en compte la viscosité du perméat et l'encrassement, qui influencent le flux également. Malgré cela, l'hypothèse de l'influence primordiale de la couche de polarisation reste valable, car d'une part le perméat est très dilué en solutés, donc sa viscosité est proche de l'eau, et d'autre part le fait qu'il n'y a pas de diminution du flux (ou très marginal) indique qu'il y a très peu d'encrassement finalement.

Enfin, en CD la membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  ayant des pores plus grands, le flux est plus élevé de 4 à 22% par rapport aux flux de la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  en moyenne, entre le début et la fin du procédé. Et en DF le flux est supérieur entre 13% et 19%. La membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  sera donc toujours plus performante que la  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  pour une application purement séparative de l'hydrolysate.

### III.2.2.2.2. Productivité et ratio eau/peptides

Pour quantifier la rentabilité d'un procédé, en général, on se réfère au temps qu'il faut pour faire le produit, et combien d'énergie a été utilisée. Ainsi, le temps et l'eau utilisée pour produire une quantité de peptides sont de bons indicateurs de performance. Le relevé en flux de perméat permet de calculer le temps de sortie des peptides, évaluant ainsi le temps nécessaire pour les produire (productivité). Puis le volume de perméat récolté permet de savoir la quantité d'eau utilisée pour obtenir les peptides (ratio eau/peptides). C'est ce qui est représenté par la *Figure 61* suivante, la productivité et le ratio eau/peptides en fonction des modes de séparation et des seuils de coupure.

En mode CD, les productivités (*Figure 61 A*) ont les valeurs les plus hautes au début du procédé ( $1,4$  et  $0,96 \text{ g}_{Pep} \cdot h^{-1}$  pour les seuils de  $100$  et  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  respectivement) puis diminuent progressivement à  $1,09$  et  $0,81 \text{ g}_{Pep} \cdot h^{-1}$  au  $FRV = 8$ . La membrane au seuil de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  est constamment 28% environ moins productive.

En DF, les valeurs des productivités (*Figure 61 B*) sont 3 fois plus basses environ qu'en CD, mais la tendance reste la même, une diminution progressive à partir de  $0,43$  et  $0,6 \text{ g}_{Pep} \cdot h^{-1}$  pour les seuils de  $100$  et  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  respectivement. La productivité du seuil de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  est légèrement supérieure aux  $DV = 1$  et  $2$  (28% et 12% respectivement) puis la différence s'estompe vers  $0,18 \text{ g}_{Pep} \cdot h^{-1}$  à  $DV = 8$ .

Concernant le critère économique, le ratio eau/peptides en CD est très faible (*Figure 61 C*) ce qui est attendu. A  $FRV = 2$  les valeurs sont de  $0,32$  et  $0,48 \text{ L}_{eau} \cdot \text{g}_{Pep}^{-1}$  pour les seuils de  $100$  et  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  respectivement et à la fin les valeurs diminuent progressivement jusqu'à  $0,29$  et  $0,40 \text{ L}_{eau} \cdot \text{g}_{Pep}^{-1}$ . La différence entre les deux seuils est également constante d'environ 24% tout le long du procédé.

Pour la DF, le ratio eau/peptides est très élevé (*Figure 61 D*), ce qui est attendu également. Non seulement à  $DV = 1$  la consommation est deux fois plus élevée qu'en CD, avec les valeurs

de 0,63 et 0,86  $L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  pour les seuils de 100 et 30  $kg \cdot mol^{-1}$  respectivement, mais en plus le ratio augmente au fur et à mesure des DV, terminant à des valeurs de 1,94 et 2,7  $L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$ . La différence entre les seuils est également de plus en plus marquée.

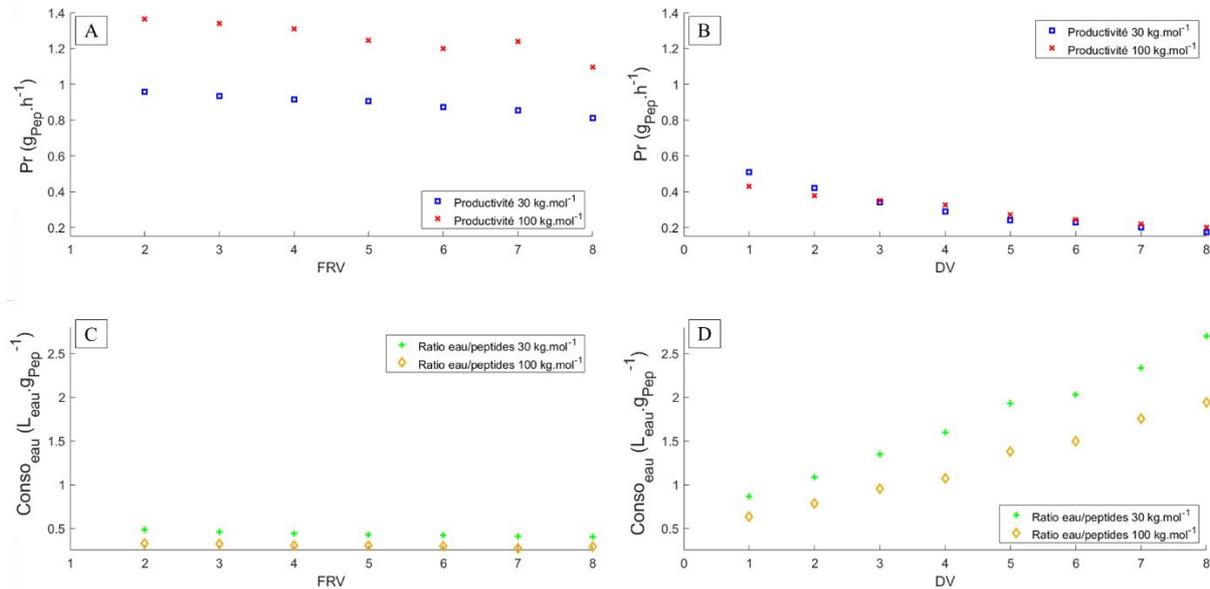


Figure 61 : Performances en fonction des modes d'implémentations et seuils de coupure ( $nr = 2$ ). (A) Productivité en mode CD avec FRV de 1 à 8. (B) Productivité en mode DF avec DV de 0 à 8. (C) Ratio eau/peptides en mode CD avec FRV de 1 à 8. (D) Ratio eau/peptide en mode DF avec DV de 0 à 8.

Etant donné que les flux de perméat et leurs évolutions sont à peu près similaires pour les deux membranes, la majeure explication des moins bonnes performances du seuil de coupure de 30  $kg \cdot mol^{-1}$  est la plus grande quantité de solutés retenus, notamment les groupes de peptides de 2150 et 1670  $g \cdot mol^{-1}$  (cf. §III.2.2.1.1 p.181 R&D). En effet, les tendances de concentrations ont plus ou moins été les mêmes, mais le seuil de 100  $kg \cdot mol^{-1}$  permettait d'obtenir des concentrations 30% plus élevées. Ainsi, dans toutes les configurations, la membrane au seuil de 100  $kg \cdot mol^{-1}$  serait plus productive et plus économique.

Toutes ces analyses sont nombreuses et assez complexes à interpréter. De plus, il faut croiser les données pour en déduire la moindre caractéristique optimale. Afin d'optimiser la méthodologie de recherche de meilleures performances, des diagrammes de valeurs croisées peuvent être utiles, car l'évolution de l'une est directement exprimée en fonction de l'autre, montrant rapidement les tendances. Cette représentation est abordée dans le paragraphe suivant, avec les valeurs de productivité et ratio eau/peptides décrites précédemment.

### III.2.2.2.3. Comparaisons croisées des performances

La Figure 62 montre ainsi les évolutions de la productivité et du ratio eau/peptides en fonction de la pureté des protéines pour chaque mode de fonctionnement et seuil de coupure.

Pour le mode CD, les productivités diminuent, alors que les puretés en protéines augmentent pour les deux membranes (**Figure 62 A**). La plus haute pureté est de 71,5%, mais la productivité est la plus basse de  $1,09 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$  pour le seuil de  $100 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$ . La diminution de la productivité est liée à la diminution du flux de perméat, mais aussi aux peptides de moins en moins transférés.

Pour la DF, les productivités diminuent également avec l'augmentation de la pureté, mais la plage de puretés obtenue avec le seuil de  $100 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  est plus étendue (**Figure 62 B**). Etant donné que le flux est constant, ce n'est que la diminution de solutés transférés qui serait à l'origine de cette tendance. Les pentes sont d'ailleurs plus raides qu'en CD, car la quantité absolue est 10 fois plus élevée qu'en DF (volume initial de  $750 \text{ mL}$  contre  $75 \text{ mL}$  en DF pour une même concentration), mais la pureté protéique finale est systématiquement supérieure en DF de 69,2% et 80,5% pour les seuils de 30 et  $100 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  respectivement. Les productivités de ce fait sont également inférieures avec des valeurs de 0,17 et  $0,19 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Le ratio eau/peptides en CD est présenté par la **Figure 62 C**. Pour les deux membranes la consommation diminue alors que le procédé progresse et la pureté augmente pour des valeurs de 63,1% et 71,5% et  $0,40$  et  $0,29 \text{ L}_{eau} \cdot \text{g}_{Pep}^{-1}$  pour les seuils de 30 et  $100 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  respectivement.

En DF les tendances en consommation d'eau sont en revanche antagonistes, ce qui attendu considérant l'eau ajoutée à chaque DV (**Figure 62 D**). Ainsi, pour atteindre des hautes puretés de 62,2% et 80,5% il faut consommer 2,7 et  $1,94 \text{ L}_{eau} \cdot \text{g}_{Pep}^{-1}$ , ce qui est élevé. Par exemple, si l'on veut produire 1000 kg de peptides, c'est 270 000 L d'eau ajoutée, qu'il faudra éliminer. L'énergie nécessaire pour vaporiser cette quantité est de  $1687 \text{ kWh}$ . Avec le prix actuel du kWh à 0,2063 €, cela revient à 348 €, sans compter le coût de mise en œuvre du procédé (fonctionnement et maintien de température). Ces diagrammes montrent aussi que le seuil de  $100 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  peut présenter un compromis avec une pureté en protéines acceptable ( $>75\%$ ), une productivité et une consommation en eau relativement abordable ( $0,32 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$  et  $0,95 \text{ L}_{eau} \cdot \text{g}_{Pep}^{-1}$  respectivement) : c'est au moment du  $DV = 4$  ou les performances chutent drastiquement. Si ces critères sont acceptés, ce mode avec cet avancement sera optimal et suffisant. Si des puretés supérieures sont recherchées, la concession doit être faite sur le ratio eau/peptides et la baisse en productivité.

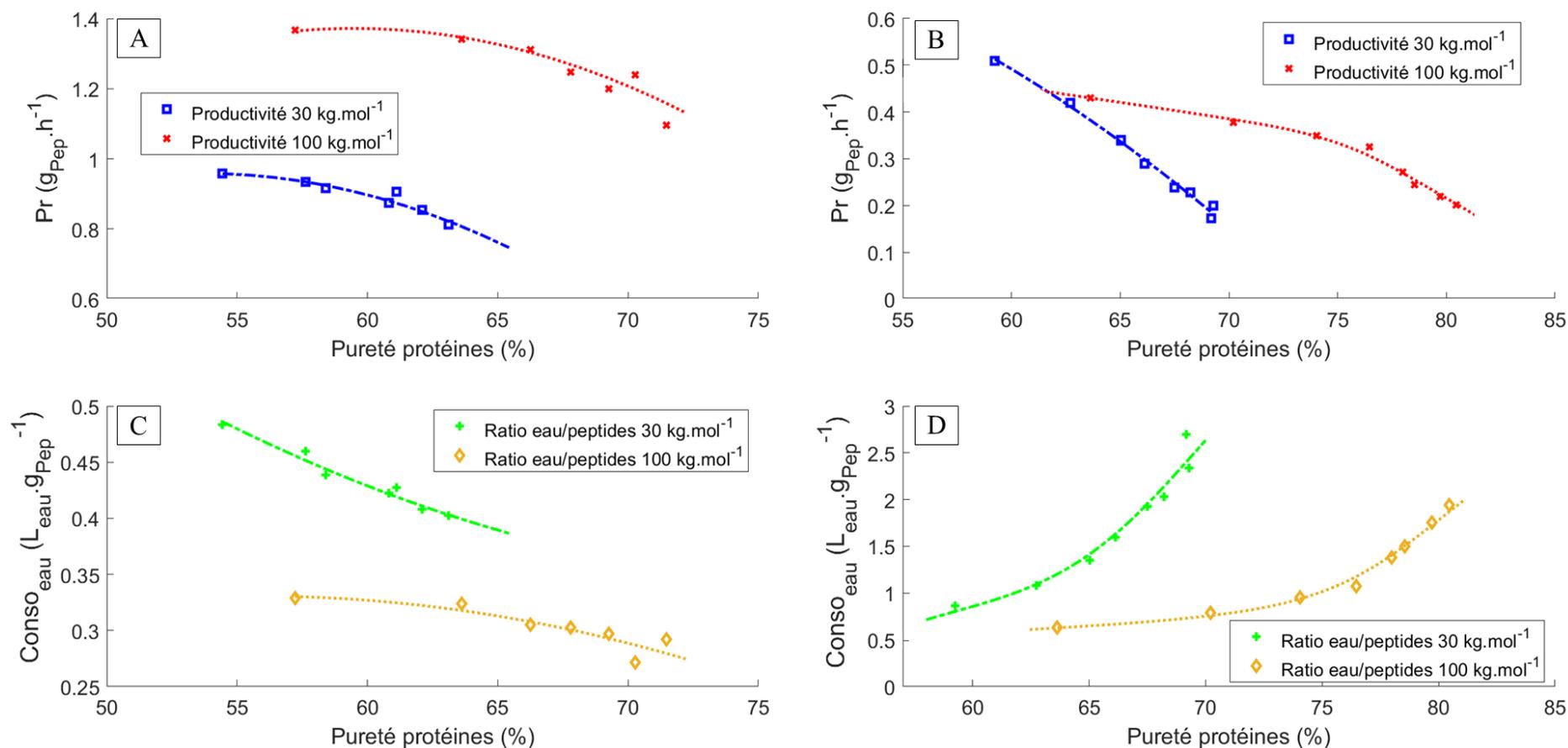


Figure 62 : Comparaisons des performances des membranes de 30 et de 100 kg.mol<sup>-1</sup> (nr = 2). (A) Productivité en mode CD. (B) Productivité en mode DF. (C) Ratio eau/peptides en mode CD. (D) Ratio eau/peptides en mode DF. Les lignes montrent les tendances des points, approximées par une fonction de lissage « spline », ou « cannelure » en français.

**Conclusion de la partie « Modélisation du fractionnement d'hydrolysat »**

- La sélectivité des membranes est influencée par la présence d'un encrassement et une couche de polarisation conséquente.
- La vitesse de recirculation n'influence pas la sélectivité, la pression transmembranaire a une légère influence.
- Les molécules dans l'hydrolysat forment des agrégats, aboutissant à une transmission moins efficace des peptides, mais une très bonne rétention de la napine.
- Les conditions opératoires sélectionnées sont  $3000\text{ s}^{-1}$  pour le taux de cisaillement et  $2\text{ bar}$  pour la *PTM*.
- La comparaison entre les membranes de  $30$  et de  $100\text{ kg.mol}^{-1}$  a montré des profils de fractionnement différents qui ont abouti à des performances supérieures par la membrane de  $100\text{ kg.mol}^{-1}$  en ce qui concerne la productivité peptidique, la faible consommation en eau, et une pureté en protéines élevée.

### III.3. Développement de l'outil de simulation d'un REM

Les technologies membranaires ont permis la production continue d'hydrolysats protéiques dans le cadre d'un couplage d'ultrafiltration et de protéolyse. Le principe étant qu'une membrane – avec une taille de pores et des propriétés physico-chimiques appropriées – associée à un réacteur permet de compartimenter l'enzyme et le substrat, tout en permettant le transport des molécules-produits. Le soutirage des peptides par la voie de perméat est compensé par une alimentation constante d'une solution de substrat dans le réacteur. La production continue peut alors durer plusieurs heures, voire jours. Elle permet un recyclage d'enzyme et améliore la productivité du procédé (Cheryan & Deeslie 1980). De nombreux exemples de mise en œuvre REM sont reportés dans la littérature pour la protéolyse des protéines de lait (Mannheim & Cheryan 1990; Bouhallab *et al.* 1992; Bouhallab & Touzé 1995; Chiang *et al.* 1995; Perea & Ugalde 1996; Margot *et al.* 1998; Martin-Orue *et al.* 1999; Cheison *et al.* 2007a; Trusek-Holownia 2008; Wu *et al.* 2013; Ewert *et al.* 2019; Huang *et al.* 2020b), de l'hémoglobine bovine (Bressollier *et al.* 1988), du sang porcin (Wei & Chiang 2009), de l'albumine de sérum bovin (Trusek-Holownia *et al.* 2016), de poisson (Nakajima *et al.* 1992), de blé (Berends *et al.* 2014; Merz *et al.* 2015b) et de soja (Roozen & Pilnik 1979; Nath *et al.* 2020; Sitanggang *et al.* 2021).

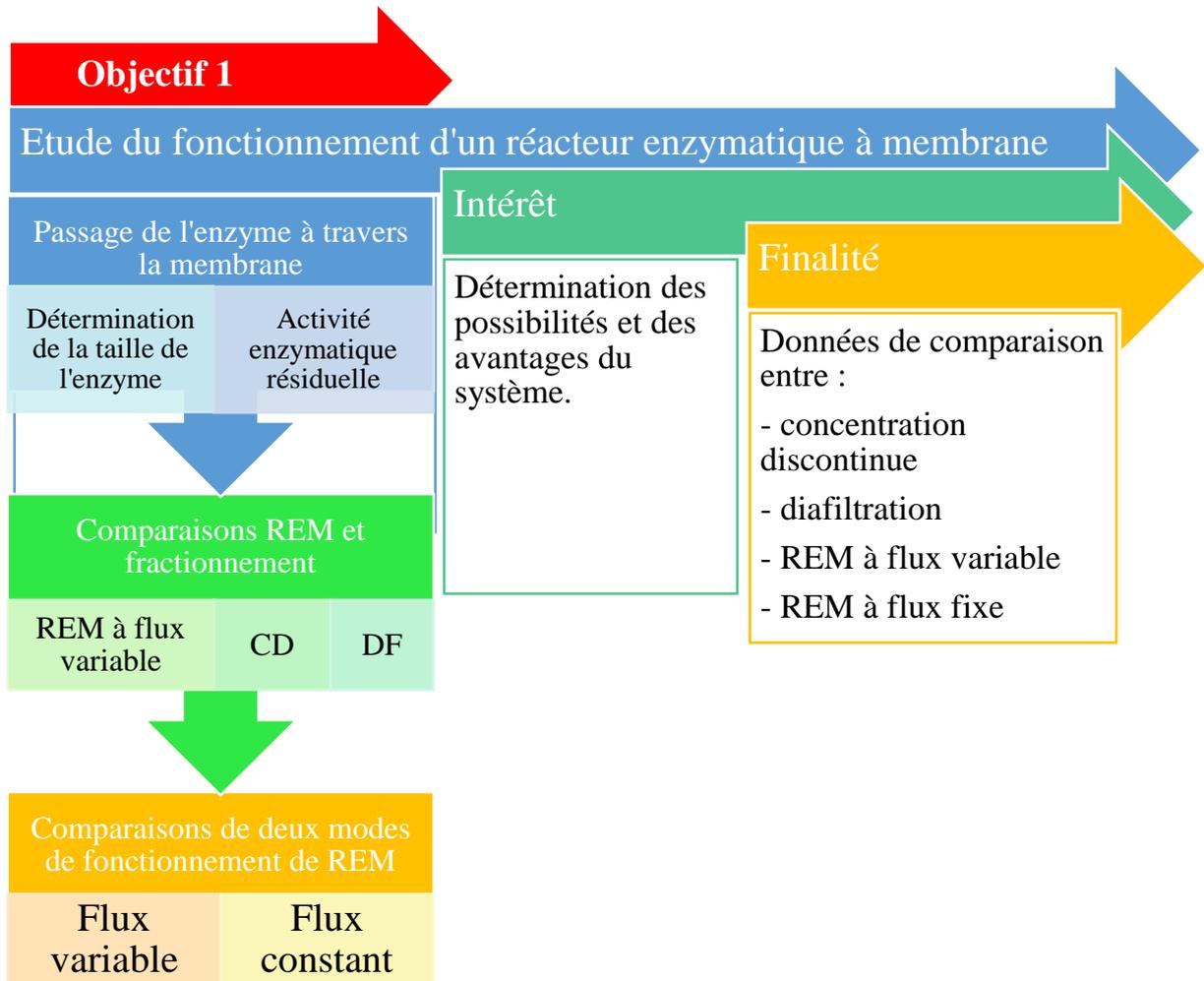
Ce procédé s'est révélé avantageux par rapport aux procédés *batch*, mais, la stabilité de la composition en peptides (produit) et l'optimisation de ce procédé se sont révélés complexes. Des méthodes de recherche de la production stable et optimale ont été proposées pour une production continue de polymères : l'Optimisation en Temps Réel (RTO de l'anglais « Real Time Optimization ») et le Contrôle Prédictif basé sur le Modèle (MPC de l'anglais « Model predictive control ») (Alvarez & Odloak 2012). L'un des principaux problèmes de ces applications est encore la stabilité. Les fermentations et les protéolyses enzymatiques étant très sensibles aux changements, ces méthodes ne semblent pas trop être utilisées.

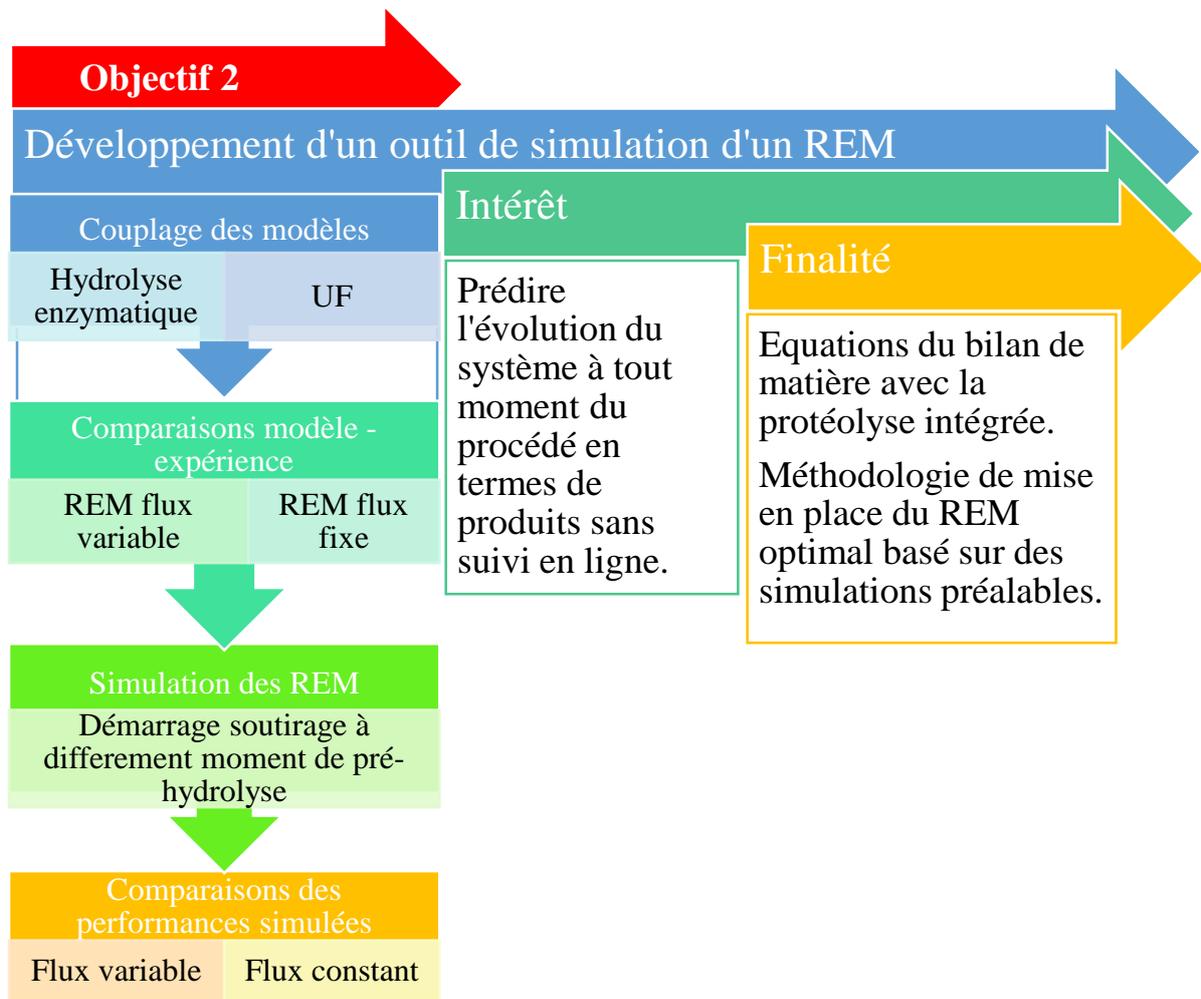
On leur préfère une approche d'optimisation par modèles, où les variables d'entrée sont fixes et maintenues tout le long du processus, qui devront être stables du début jusqu'à la fin. Ces stratégies sont aisément appliquées en mode *batch*, et peuvent être réalisées par des modèles cinétiques des réactions en question (Ruan *et al.* 2010; Munoz-Tamayo *et al.* 2012), par la méthode de surfaces de réponses (Guo *et al.* 2009; Korkmaz & Tokur 2022), ou encore par ces deux méthodes combinées : un plan d'expériences avec les modèles cinétiques des réactions (Valencia *et al.* 2015; Huang *et al.* 2020a; Beaubier *et al.* 2021a; Du *et al.* 2022). Ces optimisations permettent d'obtenir des modèles prédictifs de variation des molécules mises en

jeu et/ou des caractéristiques du produit recherchées. Naturellement, les mêmes méthodes ont été utilisées pour prédire le fonctionnement en continu, les modèles cinétiques étant couplés avec les modèles de séparation membranaire. Typiquement, à l'équation du bilan de masse de la séparation, est rajouté le terme  $r_i$ , le taux de réaction, multiplié par le volume réactionnel afin d'avoir la masse produite par la réaction. Le taux de production est ainsi modélisé par des modèles cinétiques, divers, le plus généralement par la cinétique de Michaelis-Menten, mais pour les protéines des modèles plus complexes ont été développés (Trusek-Holownia 2008; Trusek-Holownia & Noworyta 2015; Noworyta *et al.* 2018). Ces méthodes supposent de connaître parfaitement la sélectivité de coupure de l'enzyme et les sites de coupure sur la protéine. Dans le cas des enzymes à usage industriel, elles ne sont étudiées que dans un but applicatif, donc une méthodologie d'étude enzymatique poussée n'est pas recherchée ici. La stratégie est donc d'en faire le *minimum* pour une prédiction fiable. Ainsi, les hypothèses de formation des peptides sont basées uniquement sur le chromatogramme, et le modèle cinétique se résume à un système d'équations différentielles, représentant les taux de réaction. Ce genre de résolution est pratique lorsque de nombreuses réactions ont lieu à des vitesses respectives différentes et ordres de réaction complexes. En effet, dans la littérature on peut trouver quasi exclusivement un bon ajustement au premier ordre, pseudo-premier ordre ou second ordre (*cf.* §I.2.3.2 p.44 *EB*). Toutefois, c'est uniquement possible pour une hydrolyse complète du substrat. Quand il reste du substrat, cette modélisation n'est plus valable, ce qui est le cas ici. De plus, l'ordre de réaction est censé représenter le nombre de molécules en réaction. Ce qui est valable uniquement pour des réactions élémentaires, et n'est pas le cas de la protéolyse (*cf.* §I.2.1.3.1 p.33 *EB*). Il est assez complexe de décrire une réaction protéolytique en termes de concepts moléculaires simples, et l'ordre de réaction ne devient donc qu'un ordre « apparent » mathématique, qui est appelé le « coefficient d'élasticité » dans les cinétiques enzymatiques, et peut être non entier (Cornish-Bowden *et al.* 2005).

Dans les travaux présentés, un mécanisme est supposé en fonction des évolutions cinétiques de répartition de masse molaire des peptides évalués par chromatographie d'exclusion stérique. Le mélange est discrétisé en fractions peptidiques de masses molaires proches, auxquelles un taux de réaction est attribué par régression de données expérimentales en *batch*. Pour chaque groupe de peptides (« espèce »). Les équations de cinétique de réaction sont couplées aux équations de bilan de matière en UF. Ceci nécessite d'attribuer une valeur de rétention à ces espèces, déduites grâce à l'étalonnage de la membrane (*cf.* §III.2.1.2.3 p.178 *R&D*).

Cette méthode permet, d'une part, de simuler le système dans des conditions opératoires particulières, et d'autre part, de voir les impacts induits en changeant certaines variables. Cette partie est donc découpée en deux objectifs, le premier étant d'étudier deux modes de fonctionnement de REM, à flux de perméat variable et à flux de perméat fixe, et dans un deuxième temps, d'exploiter le modèle pour voir les impacts sur les caractéristiques en changeant le moment du soutirage au cours de la pré-hydrolyse.





### III.3.1. Etude de la rétention de la ProllyvePAC® par la membrane

La mise en place d'un REM implique plusieurs hypothèses de fonctionnement (Deeslie & Cheryan 1981a), entre autres (i) la réaction est irréversible et sans inhibition. (ii) Le système global du réacteur fonctionne comme un simple CSTR (*Continuous Stirring Tank Reactor*) avec un mélange idéal. (iii) Les limitations de transfert de masse et l'adsorption d'enzyme sur la membrane sont négligeables. Pour vérifier ce dernier point, et ainsi pour le choix de la membrane, la taille de l'enzyme a été déterminée et son activité dans le perméat a été évaluée.

#### III.3.1.1. Détermination de la taille de l'enzyme

La *Figure 63* montre un gel SDS-PAGE où la taille de la ProllyvePAC® a été évaluée à  $47,2 \text{ kg.mol}^{-1}$ . L'enzyme est donc composée d'une seule grande chaîne. Cela correspond à plusieurs enzymes aux propriétés similaires, qui ont été produites à partir de différentes souches d'*Aspergillus niger*. Elles font toutes partie de la famille des protéases à acide aspartique (EC

3.4.23.-) et activité endopeptidique. Cela correspond donc à l'observation du mécanisme *zipper* lors de l'hydrolyse des PTC. Ces protéases sont caractérisées par un fonctionnement optimal entre un  $pH$  3 et 5 et une plage d'action du  $pH$  2 au 6. Leur poids moléculaire varie de 30 à 50  $kg.mol^{-1}$ , comme la protéase isolée de la souche BCRC 32720 d'*A. niger* qui présentait une taille de 47,5  $kg.mol^{-1}$  (Yin *et al.* 2013) et deux protéases extraites de la souche IR3\_11 avec des tailles de 50,54 et 51,06  $kg.mol^{-1}$  respectivement (Purushothaman *et al.* 2019). Une autre particularité de ces protéases, est le repliement tertiaire en deux lobes à double symétrie, chaque lobe ayant un résidu d'aspartate participant à l'hydrolyse. Il a également été rapporté que la préférence au clivage se fait sur les acides aminés hydrophobes, volumineux et aromatique de chaque côté de la liaison peptidique (Theron & Divol 2014; Purushothaman *et al.* 2019).

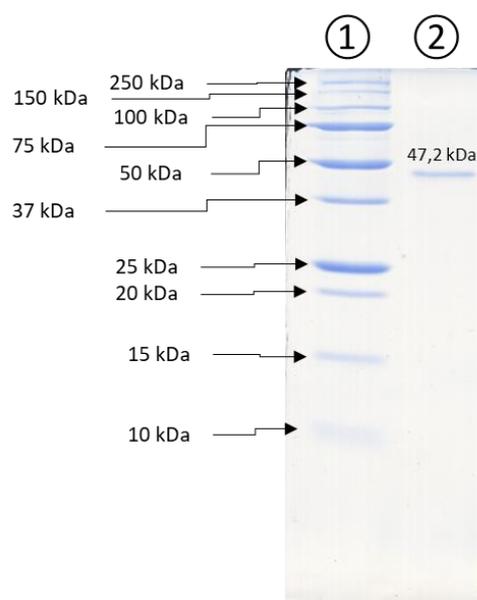


Figure 63 : SDS-PAGE 17% d'acrylamide dans les conditions dénaturantes de la ProlyvePAC©. Piste ① : Marqueur de taille protéique. Piste ② : 10  $\mu L$  enzyme (25  $\mu g$ ).

### III.3.1.2. Etude de l'activité dans le perméat

L'évaluation du passage enzymatique à travers la membrane d'UF a été faite en mesurant l'activité enzymatique dans le perméat : une première hydrolyse est réalisée (hydrolyse I), puis une ultrafiltration par concentration discontinue (sans changement de  $pH$ ) est réalisée pour récupérer un certain volume de perméat, auquel sont ajoutées les nouvelles PTC (hydrolyse II) (cf. §II.8.2 p.132 *M&M*). Les vitesses de réaction initiales (calculées grâce aux *Eq. 157* et *Eq. 158* p.133 *M&M*) de l'hydrolyse II sont ensuite comparées et exprimées en pourcentage d'activité restante par rapport à l'hydrolyse I. Comme le montre la **Figure 64**, une faible activité enzymatique est présente pour les trois membranes : 10% d'activité résiduelle pour la membrane de 100  $kg.mol^{-1}$  et moins de 1% pour les deux autres membranes. C'est en accord

avec les informations qu'on peut retrouver dans la littérature, car il apparaît qu'il n'y aurait pas forcément de corrélation entre le seuil de coupure et le poids moléculaire de l'enzyme. En effet, diverses valeurs d'activité dans le perméat ont été observées dans les réacteurs, allant de 0% à 40%, alors que dans tous les cas, les enzymes avaient des tailles bien supérieures au seuil de coupure (Bressollier *et al.* 1988; Sannier *et al.* 1994; Belhocine *et al.* 2000; Merz *et al.* 2015b). Par exemple l'enzyme papaïne avec une taille de  $23,7 \text{ kg.mol}^{-1}$  traverse la membrane de  $10 \text{ kg.mol}^{-1}$  (Carbosep M5) avec une activité dans le perméat à 22% au bout de 4 heures. En même temps, alors qu'elle ne devrait pas du tout être retenue, elle conserve une activité de 75% dans le rétentat séparé par membrane (Carbosep M14) dont les pores sont de  $0,14 \mu\text{m}$  (Belhocine *et al.* 2000). Dans le cas présent, la ProlyvePAC® de  $47,2 \text{ kg.mol}^{-1}$  n'a que 10% d'activité résiduelle avec une membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ . Cela peut effectivement s'expliquer encore par la couche de polarisation et l'encrassement par les protéines au préalable, car dans une autre étude, il a été montré qu'une concentration élevée en substrat a l'effet de limiter, voire éliminer le passage de l'enzyme dans le perméat (Merz *et al.* 2015b). Néanmoins, il a été décidé de mettre en œuvre le REM avec la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  dans un souci de cohérence entre la taille de la ProlyvePAC® et le seuil de coupure, ainsi que de limiter le transfert de la napine.

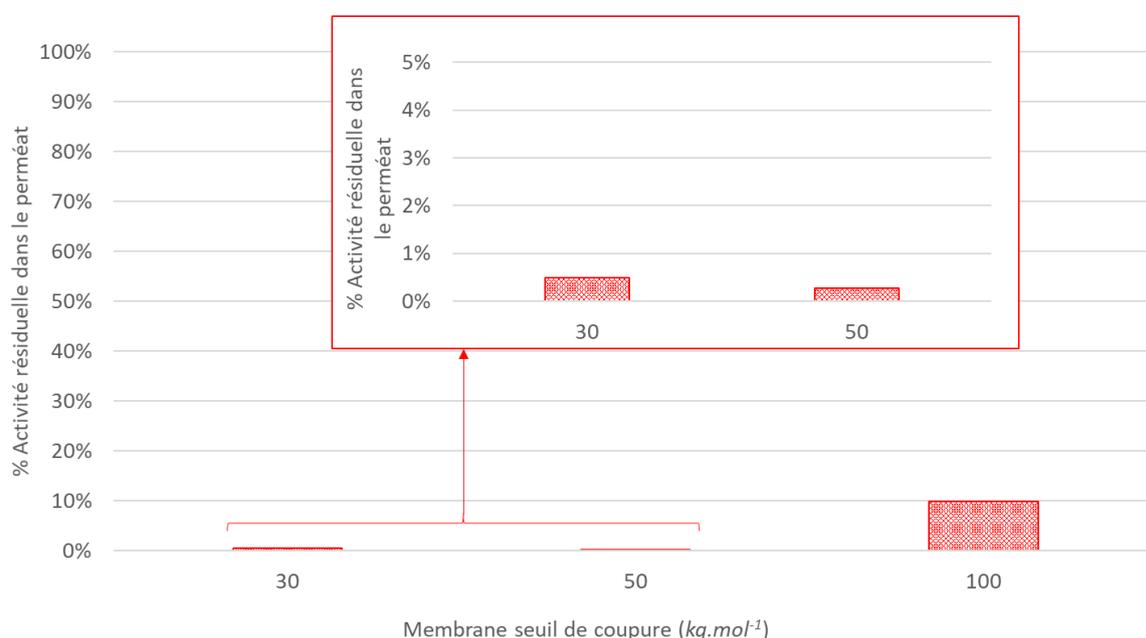


Figure 64 : Activité enzymatique résiduelle dans le perméat (hydrolyse II), comparée à l'activité de l'hydrolyse I dans les mêmes conditions opératoires (pH 3 et  $55^\circ\text{C}$ ).

### III.3.2. Comparaisons des mises en œuvre en CD, DF et REM

Pour valider les avantages d'un REM par rapport aux mises en œuvre discontinues (hydrolyse *batch* et séparation membranaire en CD ou DF), des comparaisons de performances

ont été réalisées. La **Figure 65 A** montre l'efficacité vis-à-vis de la conversion protéique (à partir du moment du soutirage). Ceci indique la conversion protéique par rapport à la membrane, notée  $X_m$  (cf. §I.4.3 p.96 **EB**). La DF donne le plus haut ratio à  $DV = 6$  de  $0,675 g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$ , suivi par la CD à  $0,426 g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$  au  $FRV = 7$ , puis le REM à  $0,372 g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$  à  $VR = 6$ . La DF est donc le procédé le plus efficace en termes d'élimination des peptides, ce qui est expliqué par le lavage à l'eau pure. Le REM et la CD ont plus ou moins la même efficacité et 40% en moyenne moins performants que la DF. En DF, la  $X_m$  augmente fortement tout le long du procédé. En CD, la  $X_m$  augmente de manière progressive. Pour le REM, jusqu'à 35 min la quantité de peptides soutirés est élevée, donc la  $X_m$  augmente fortement, puis à partir de 1 h, la  $X_m$  tend vers un plateau. La même tendance est retrouvée dans la littérature : une conversion nettement croissante jusqu'à 1 h ou 2 h puis une stagnation et/ou diminution progressive pour le reste du procédé (Mannheim & Cheryan 1990; Perea & Ugalde 1996; Hatzinikolaou *et al.* 2005). Cette diminution a été attribuée à une inactivation de l'enzyme (thermique ou mécanique), une adsorption sur la membrane ou une perte dans le perméat. Certains auteurs ont montré que le passage de l'enzyme dans le perméat ne présente pas d'impact significatif sur la conversion. En revanche, la présence d'une membrane dans le système conduit à une perte de 80% d'activité enzymatique contre une perte de 35% sans membrane dans le module (Mannheim & Cheryan 1990). Cette observation est toutefois largement modulée par la présence du substrat qui a un effet de « protection » éventuellement, en étant, d'une part, adsorbé par la membrane, et d'autre part, en empêchant l'autolyse de l'enzyme (Sannier *et al.* 1994; Perea & Ugalde 1996). Dans le cas du REM avec ProlyvePAC®, une vérification d'activité enzymatique sur l'hémoglobine bovine entre le début et la fin de la pré-hydrolyse montre qu'entre 63% et 100% d'activité enzymatique est conservée. Le REM présente une augmentation progressive qui tend à se stabiliser autour de  $0,37 g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$ . Cela est peut-être dû à une limitation du transfert des peptides par la couche de polarisation et l'accumulation des peptides du côté rétentat.

La **Figure 65 B** montre la consommation d'eau pour les trois procédés en fonction de la durée de soutirage (filtration). La DF consomme ainsi de  $0,86$  à  $2,03 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  entre le  $DV = 1$  et le  $DV = 6$ , la CD consomme de  $0,48$  à  $0,41 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  entre  $FRV = 2$  et  $FRV = 7$ , et le REM consomme de  $0,99$  à  $0,45 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  entre  $VR = 1$  et  $VR = 6$ . Ainsi, bien que la DF soit efficace en termes de production peptidique (**Figure 65 A**), elle consomme énormément d'eau. La CD en consomme le moins, et au fur et à mesure, cette quantité diminue, car contrairement à la DF, l'eau n'est pas rajoutée dans le système, représentant une économie de 44% à 80%

d'eau entre le début et la fin du procédé. Le REM débute par une consommation légèrement plus faible que la DF à  $DV = 2$ , mais diminue rapidement pour atteindre quasi le même niveau que la CD à  $FRV = 6$ , représentant une économie de 78% d'eau par rapport à la DF.

La **Figure 65 C** présente l'index enzymatique en fonction de la durée des trois procédés. La DF montre ainsi une augmentation progressive de l'index avec une valeur maximale de 132,8  $g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$  à  $DV = 6$ . La CD montre une même tendance, mais avec une valeur maximale plus faible à 94,1  $g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$ . Le gain de la DF par rapport à la CD est de 29%, ce qui est en rapport avec la  $X_m$ , qui est bien supérieur en DF (**Figure 65 A**). Le REM enfin, montre une nette augmentation constante tout au long du procédé, avec une valeur maximale de 690,6  $g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$ . L'index enzymatique est le critère phare de la comparaison entre les procédés en *batch* et en continu. En effet, l'enzyme étant un consommable cher la plupart du temps (plus de 1000 € par *kg* d'enzyme purifiée), l'indicateur de peptides produits par quantité d'enzyme introduite dans le système montre assez bien le gain économique de l'utilisation prolongée de l'enzyme : 78% (Merz *et al.* 2015b), 90% (Mannheim & Cheryan 1990) ou encore 92% (Perea & Ugalde 1996), par exemple. En revanche, les procédés de filtration ne semblent pas avoir été réalisés, mais l'index avait été considéré comme constant quel que soit le nombre de *VR* correspondant au procédé continu. Dans le cas présent, les expériences en ultrafiltration ont été réalisées et les gains sont de 80% et 86% respectivement par rapport à la DF et à la CD. L'allure droite de  $Y_{N/E}$  du REM montre également qu'il n'y a pas ou très peu de désactivation enzymatique, ce qui confirme l'hypothèse de départ en faveur d'un procédé continu (Mannheim & Cheryan 1990), et ce, malgré la faible présence d'activité enzymatique constatée dans le perméat (*cf.* §III.3.1.2 p.197 *R&D*).

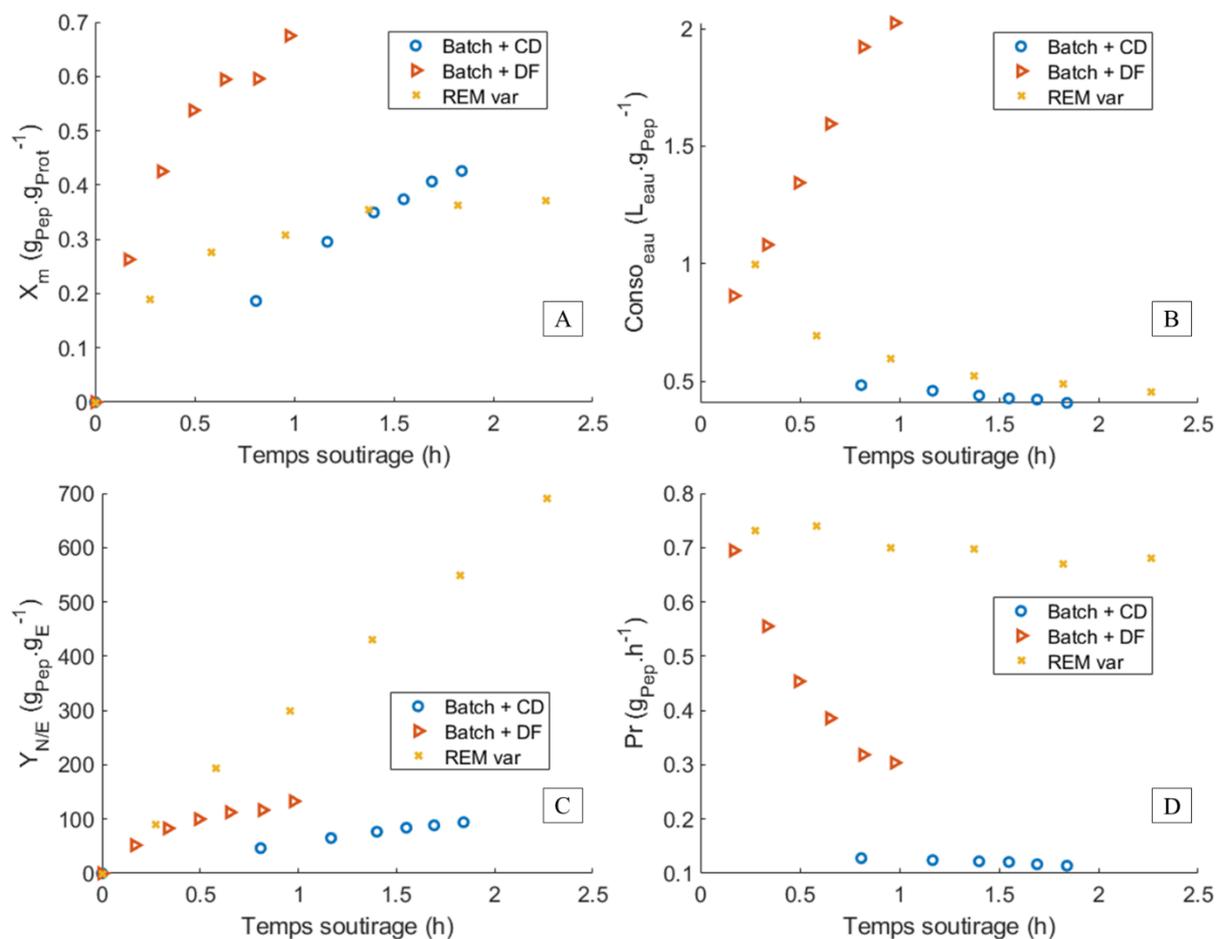


Figure 65 : Comparaisons des performances en fonction du temps de soutirage en REM (VR de 0 à 6 et mode en flux variable), hydrolyse en batch puis CD (FRV de 1 à 7) et hydrolyse en batch puis DF (DV de 0 à 6) avec la membrane de  $30 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $nr = 2$ ). (A) Peptides produits (perméat) par rapport aux protéines entrées initialement. (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. Le ratio E/S étant de 1/448. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du moment du soutirage.

La **Figure 65 D** enfin, présente la productivité des trois procédés en fonction de la durée. La DF produit beaucoup de peptides au début,  $0,69 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$  à  $DV = 1$ , puis de moins en moins avec plus que  $0,31 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$  à  $DV = 6$ . La CD a la plus faible productivité qui est presque constante tout au long du soutirage avec  $0,13 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$  à  $FRV = 2$  et  $0,11 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$  à  $FRV = 7$ . Le REM présente la production la plus élevée et stable, avec  $0,73 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$  à  $VR = 1$  et  $0,68 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{h}^{-1}$  à  $VR = 6$ . Il en ressort donc que la CD et le REM sont tous les deux des procédés stables, mais le REM le surpasse en produisant 83% de peptides en plus par heure à la fin, et ce même si le flux du perméat diminue, car ce dernier est chargé en même quantité de peptides à chaque VR. La DF en revanche produit de moins en moins de peptides, ce qui était observé déjà dans la partie consacrée au fractionnement (cf. §III.2 p.162 R&D). Etant donné que les peptides sont épuisés dans le rétentat, le perméat en transmet de moins en moins. Le REM produit ainsi

56% de peptides en plus en soutirage à la fin, ce qui est en accord avec les résultats trouvés pour un REM mis en place pour le lactosérum (Perea & Ugalde 1996).

Une dernière remarque est sur la durée des procédés. Étant donné que le temps du soutirage dépend du flux de perméat, on constate naturellement que la DF est le procédé le plus rapide (59 *min*, flux constant à  $\sim 10 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Il est suivi par la CD (1 h et 51 *min*, flux variable de  $\sim 11$  à  $4 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) puis en dernier le REM (2 h et 16 *min*, flux variable de  $\sim 10$  à  $4 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ces deux dernières installations ont quasiment la même décroissance en flux, mais dans le REM les protéines sont rajoutées dans la cuve du rétentat. Ainsi, l'ajout de matière ralentirait un peu plus le flux aboutissant à une fin de procédé plus tardive de 26 minutes.

En conclusion, ces données nous confirment que même si le REM est le procédé le plus lent et moins intéressant quant à la conversion protéines-peptides dans le perméat, il est économique vis-à-vis de la consommation en eau, rentable du point de vue de l'utilisation de l'enzyme, stable en productivité dans le temps et plus productif qu'un *batch* d'hydrolyse suivi d'une séparation membranaire discontinue (DF ou CD).

### III.3.3. Comparaisons de deux modes de REM : flux constant vs variable

Pour les réacteurs, une autre variable à considérer est le « temps de séjour ». C'est le temps mis pour traiter un volume égal de réactifs, qui est égal au volume du réacteur. Pour les réacteurs continus, c'est le terme de « temps de passage » qui lui est préféré, car les produits doivent avoir le temps d'être fabriqués avant de sortir du système, donc c'est l'indication du temps théorique de résidence des réactifs ou des produits dans le réacteur. A cela, on peut aussi ajouter le terme du « temps de séjour moyen du fluide », qui est égale au temps de passage si le débit est uniforme dans le réacteur (débit entrée = débit sortie), ce qui est le cas en REM. Pour la protéolyse, ce facteur est important, car en fonction de la population peptidique visée, un temps de séjour long permet d'augmenter la conversion protéique et donc la proportion de petits peptides (Deeslie & Cheryan 1981a, b, 1988). Ainsi, cela influe sur les propriétés des peptides finaux où, par exemple, avec un temps de séjour court, la capacité moussante de peptides de lait était optimale, mais pas la plus stable, alors qu'un temps de séjour long a produit des peptides plus petits avec moins de capacité moussante et une grande stabilité (Perea & Ugalde 1996). En fixant le temps de séjour, il est aussi possible de maîtriser très précisément les peptides soutirés, comme pour l'hydrolyse continue d'hémoglobine bovine, où un enrichissement en peptide intermédiaire opioïde a pu être obtenu en fixant le temps de séjour à 2 *min*, alors que ce peptide était faiblement détecté en implémentation *batch* (Kapel *et al.* 2003).

Dans une autre étude avec le concentrat protéique de luzerne, un temps de séjour fixé à 8 h pour produire des petits peptides, a permis d'obtenir un hydrolysate à activité inhibitrice d'ACE 30 fois supérieure à celle de l'hydrolysate de soja (Kapel *et al.* 2006). Ces différences ne sont pas systématiques. En effet, l'étude la plus récente sur des protéines de soja fermenté a montré que la durée du temps de séjour n'influe ni sur la production de peptides totaux, ni sur l'activité antioxydante, ni sur l'activité inhibitrice d'ACE (Sitanggang *et al.* 2021). En revanche, en ultrafiltrant l'hydrolysate avec des seuils de coupure plus faibles ( $2-5 \text{ kg.mol}^{-1}$ ), les perméats voient ces activités doubler. Donc le seuil de coupure de la membrane reste, comme pour l'ultrafiltration en *batch*, un facteur très important à sélectionner en fonction de la (des) propriété(s) de l'hydrolysate recherchée(s) (Nwachukwu & Aluko 2018).

Le temps de séjour est principalement contrôlé par le flux de perméat. Si le flux est variable au cours du procédé (application d'une *PTM* constante), le temps de séjour pour chaque *VR* sera de plus en plus élevé, car le flux diminue (pour cause de l'encrassement de la membrane) (*cf. Eq. 64 p.97 EB*). Si le flux est constant au cours du procédé (application d'une *PTM* variable), alors le temps de séjour sera le même pour chaque *VR*. Les deux modes ont été appliqués en fonction de la préférence, de la facilité de contrôle ou de l'objectif de population peptidique visé (*cf. Tableau 10 p.87 EB*).

Pour l'hydrolysate d'intérêt des PTC, il a été déterminé que le temps optimal pour l'hydrolyse (pour un *E/S* de 1/170) est de 50 minutes pour une conversion de 80% de la cruciférine. Pour l'implémentation en REM à flux constant, le temps de séjour était alors de 50 *min* pour maximiser la conversion. Dans le cas du REM à flux variable le temps de séjour moyen du fluide passe de 12 à 27 *min*. C'est 3 à 2 fois plus court que le temps optimal, cependant, les propriétés peuvent différer ou non en fonction du temps de séjour appliqué (Perea & Ugalde 1996; Sitanggang *et al.* 2021). Dans le cas présent, on cherche à purifier les protéines (napines et reste des cruciférines), mais aussi à produire des peptides à activité chélatrice, qui sont plutôt des peptides finaux et qui sont présents en quantités comparables suite à l'UF aux seuils de coupure de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$  et moins (*cf. Figure 51 p.170 R&D*). Cela peut attester du peu de différence en fonction du seuil de coupure, donc que l'activité chélatrice sera conservée en grande partie. L'intérêt de la comparaison entre les modes de fonctionnement en REM portera donc uniquement sur les critères de conversion protéique, consommation eau, index enzymatique et productivité.

La *Figure 66* présente les performances des modes de fonctionnement en REM à flux constant et variable en fonction du volume de remplacement. La *Figure 66 A* montre la conversion protéique membranaire ( $X_m$ ) où les valeurs aux deux modes sont très proches, de 0,19 et 0,18  $g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$  au  $VR = 1$ , et de 0,37 et 0,36  $g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$  au  $VR = 6$  pour les modes à flux variable et constant respectivement. La conversion est donc similaire et suffisante aux temps de séjour constant de 50 *min* qu'au temps de séjour variable de 12 à 27 *min* en fonction des *VR*. En revanche, le REM à flux constant est, par conséquent, plus lent avec une durée pour les six *VR* multipliée par 2,5. Ainsi, le temps de séjour n'a pas d'impact sur la  $X_m$ , car d'une part, avec la même pré-hydrolyse de 50 minutes dans les deux cas, le rétentat est chargé en peptides dès le début, et le passage dans le perméat se fait alors uniquement en fonction du flux. D'autre part, l'hydrolyse étant très rapide dès les premières minutes, la cruciférine rajoutée de manière progressive est hydrolysée quasi instantanément.

La *Figure 66 B* montre la consommation d'eau pour une quantité de peptides produits dans le perméat en fonction du temps de soutirage et des *VR*. Le REM à flux variable consomme de 0,49 à 0,39  $L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  entre le début et la fin du procédé. Le REM à flux constant consomme de 0,43 à 0,37  $L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  entre le début et la fin du procédé. La différence entre les deux modes est donc assez faible, de 12% au début puis elle s'estompe à la fin des procédés (écart de 5%). Le flux diminuant, le fonctionnement à flux variable tend donc à rejoindre la même performance que le mode à flux constant. Le fonctionnement à flux constant serait donc plus économique en eau, mais prendra plus de temps.

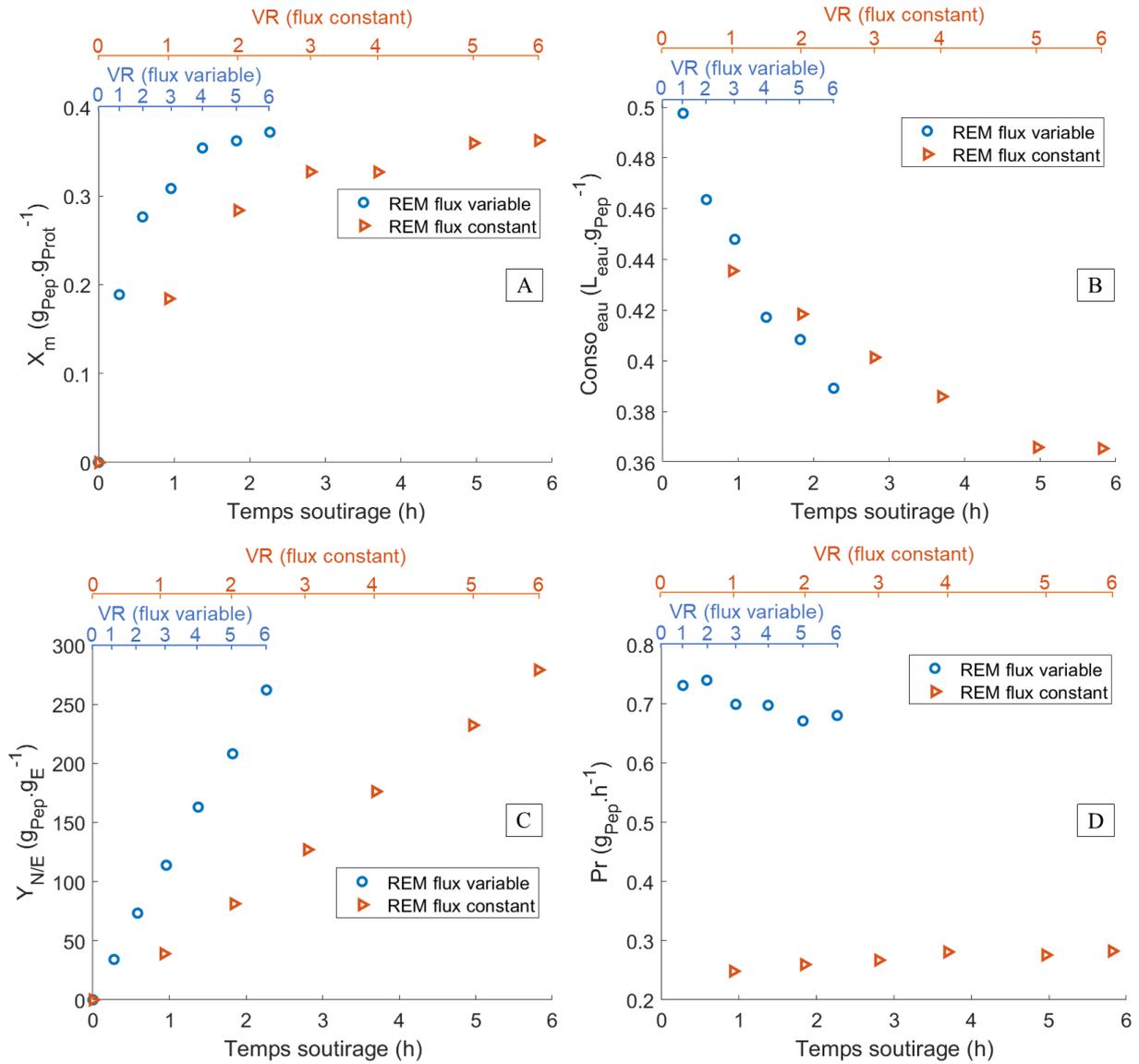


Figure 66 : Comparisons des performances en REM en fonction du temps de soutirage (abscisses en bas) et volume de remplacement (de 0 à 6, abscisses en haut) avec deux modes de fonctionnement (flux perméat variable vs constant) avec la membrane de  $30 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $n_r = 2$ ). (A) Peptides produits (perméat) par rapport aux protéines entrées initialement. (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. Le ratio E/S étant de 1/170. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du moment du soutirage.

La Figure 66 C présente l'index enzymatique en fonction du temps de soutirage et des VR pour chaque mode de fonctionnement du REM. Le mode à flux variable est à  $34,17 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{g}_E^{-1}$  au VR = 1 et augmente jusqu'à  $262,1 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{g}_E^{-1}$  au VR = 6. Les valeurs du mode à flux constant sont légèrement plus élevées, à  $39,04 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{g}_E^{-1}$  au VR = 1 et augmente jusqu'à  $279,1 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{g}_E^{-1}$  au VR = 6, mais cela ne représente que 6% de gain de peptides à la fin. Il n'y a donc pas d'influence du temps de séjour sur l'index enzymatique, pour les mêmes raisons que pour la conversion protéique : une quantité élevée de peptides disponibles dans le rétentat, qui sont éliminés en fonction du flux de perméat, ce dernier étant plus rapide à flux variable. Une

tendance linéaire indique également que l'enzyme n'a pas de perte significative d'activité (Mannheim & Cheryan 1990). C'est également confirmé par l'évaluation en parallèle de l'activité dans le rétentat et le perméat avec un protocole modifié d'Anson en milieu acide (Lanoë & Dunnigan 1978). L'activité dans le rétentat était stable et dans le perméat une activité de moins de 2% avait été détectée jusqu'à  $VR = 5$ , pour les deux modes de fonctionnement. Des activités enzymatiques un peu plus prononcées à 6% et 10% ont été observées aux  $VR = 6$ . Ainsi, le temps de séjour n'influence pas non plus l'efficacité de l'activité enzymatique.

La **Figure 66 D** présente la productivité, la production de peptides dans le perméat par heure (à partir du moment de soutirage) en fonction des  $VR$  et de la durée des procédés. Le mode à flux variable montre une production assez stable, mais qui diminue légèrement en passant de  $0,73 \text{ g}_{pep} \cdot \text{h}^{-1}$  au  $VR = 1$  à  $0,68 \text{ g}_{pep} \cdot \text{h}^{-1}$  au  $VR = 6$ . Le mode à flux constant a une production plutôt stable aussi, mais avec une légère augmentation avec  $0,25 \text{ g}_{pep} \cdot \text{h}^{-1}$  au  $VR = 1$  et  $0,28 \text{ g}_{pep} \cdot \text{h}^{-1}$  au  $VR = 6$ . En revanche, la différence de performance entre les deux modes est significative : entre 66% et 59% de peptides en plus pour le mode à flux variable à chaque  $VR$ . Ceci est attendu, car d'une part, la productivité est directement liée au flux de perméat parce qu'il entraîne avec lui les peptides. Ainsi, le flux est élevé pour le mode à flux variable (de  $9,92$  à  $4,48 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et faible à flux constant ( $2,38 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ). D'autre part, le temps de séjour étant plus long, moins de peptides sont soutirés par heure de fonctionnement du procédé.

En conclusion de ces deux modes de fonctionnements, le mode à flux constant présente des légers gains de conversion protéique, index enzymatique et de consommation d'eau, mais une productivité beaucoup plus faible avec le temps de fonctionnement de 2,5 fois plus élevé, ce qui conduirait plutôt à plus de dépenses énergétiques (maintien température). Le mode à flux variable est donc à l'inverse plus rapide et très productif. Dans le cas présent, pour une implémentation finale d'un REM, le choix entre les deux modes serait donc à faire en fonction de la facilité de mise en œuvre *vs* coût de procédé, le temps de séjour n'étant pas un facteur discriminant au vu de l'hydrolyse très rapide des PTC par la ProlyvePAC®.

### III.3.4. Production des peptides chélateurs

Une vérification a également été faite pour confirmer la conservation du caractère chélateur du perméat initialement découvert et optimisé avec cette propriété. Les perméats ont été réduits en volume, congelés, lyophilisés, puis remis en suspension dans l'eau à  $pH 7$  à des concentrations permettant d'avoir une gamme de chélation entre 0% et 100%. Le perméat non optimisé (cf. §II.2.1 p.106 et §II.2.2 p.106 *M&M*) avait un pouvoir chélateur de  $18,3 \mu\text{M}$  de

$Fe^{2+}$  par  $mg$  de peptides. Pour les REM les valeurs étaient de 13,4 et 13  $\mu M$  de  $Fe^{2+}$  par  $mg$  de peptides pour les fonctionnements à flux variable et constant, respectivement. Ce qui représente 73% et 71% environ de l'activité obtenue en *batch*. Cette différence est liée à la présence d'une population plus grande de peptides intermédiaires transmis à 30  $kg.mol^{-1}$  qu'à 3  $kg.mol^{-1}$  (environ 50%), impliquant sans doute une plus faible proportion des peptides chélateurs. Dans la stratégie du développement d'un hydrolysats bifonctionnel, la purification des protéines était ciblée, donc un haut transfert de peptides ainsi qu'un flux élevé ont été recherchés. De ce fait, la propriété de chélation a été impactée, mais une conservation de plus de 70% pour des telles modifications de procédé est acceptable.

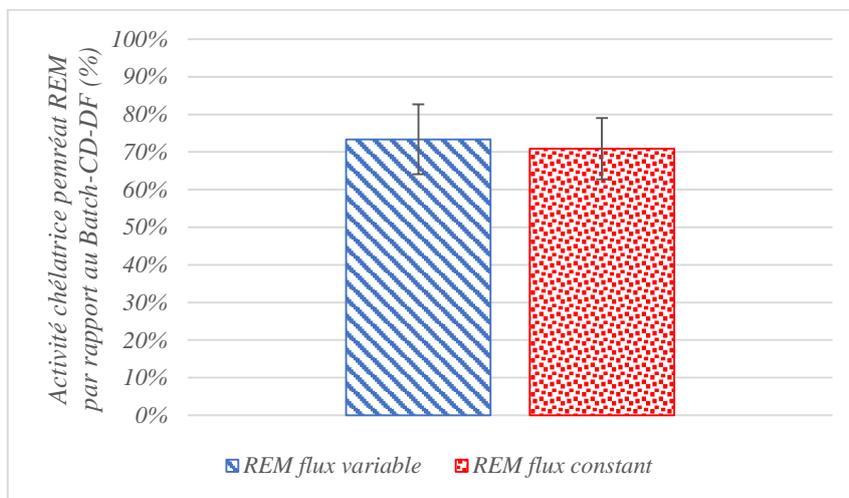


Figure 67 : Comparaison de l'activité chélatrice de fer ( $Fe^{2+}$ ) du perméat produit en condition d'une hydrolyse en batch (50°C – E/S 1/500 – pH 3 – 7 h) suivi d'une séparation (membrane plane, cellulose – 3  $kg.mol^{-1}$  – pH 9 – PTM 2,5 bar – FRV = 2 puis DV = 5) avec les perméats produits en REM en fonctionnement à flux variable et constant (55°C – E/S – 1/170 – pH 3 – 50 min – fibres creuses, polysulfone – 30  $kg.mol^{-1}$  – 3000  $s^{-1}$  – VR = 6).

### III.3.5. Modélisation des REM

#### III.3.5.1. Ecriture des équations - Hydrolyse

La modélisation du REM a été réalisée en utilisant les résultats des chapitres précédents de la réaction de protéolyse en *batch* et de la séparation membranaire.

La protéolyse enzymatique, est un système complexe produisant plusieurs familles de peptides à différentes vitesses et selon différents mécanismes (*one-by-one*, *zipper*). Le mécanisme *zipper* notamment pose problème, car les formes intégrales donnent une solution générale ne montrant pas une augmentation puis une disparition, juste le résultat de l'évolution des peptides totaux (Korobov & Ochkov 2011b). De ce fait, leur cinétique modélisée par l'intermédiaire du  $Xp$ , du  $DH$  ou du modèle de Michaelis-Menten, ne fournit pas d'informations sur la dynamique précise des différents groupes de peptides. Ainsi, une alternative est de plus

en plus utilisée pour décrire la formation et la dégradation des peptides pendant l'hydrolyse : la résolution du système d'équations différentielles simultanée de chaque composant (Adu-Amankwa & Constantinides 1984; Abdallah & Seoud 2010; Munoz-Tamayo *et al.* 2012; Fernández & Riera 2013). Cette méthodologie nécessite, néanmoins, une description complète de tous les clivages qui ont lieu et ils consistent en un ensemble d'équations différentielles des concentrations de la protéine et des peptides.

Fernández and Riera (2013), en analysant la cinétique de libération des 16 différents peptides simples à partir de la  $\beta$ -Lactoglobuline ( $\beta$ -Lg) par la trypsine, en ont identifié 3 types : (i) ceux libérés directement de la protéine. (ii) Les peptides intermédiaires. (iii) Les peptides finaux issus des peptides intermédiaires. Ici, le chromatogramme donne six pics peptidiques, qui, chacun regroupe hypothétiquement plusieurs différents peptides de masses molaires voisines ne permettant pas leur distinction. Or, il n'est pas question de chercher à optimiser la séparation en ayant identifié tous les peptides, mais d'avoir un outil simple et rapide d'analyse. En effet, pour identifier tous les peptides, une technologie de pointe est nécessaire, la spectrométrie de masse (MS). Or, en fonction des protocoles pour analyser des mélanges complexes, il faudrait d'abord des étapes préparatoires (fractionnement par chromatographie préparative, SDS-PAGE) puis l'analyse en MS qui peut prendre 2 h par échantillon, en enfin l'analyse informatique des spectres *via* des logiciels et des bases de données spécifiques. Alors qu'une analyse en CLHP-ES est possible sur des mélanges complexes sans préparation, l'analyse est rapide (30 min), et donne un chromatogramme interprétable en quelques minutes. Ainsi, pour un développement rapide, pour un industriel, il est plus simple de s'équiper d'un appareil de CLHP et de faire des développements rudimentaires, mais assez fonctionnels dans le contexte du cadre applicatif.

Par conséquent, l'analyse de la protéolyse proposée ici se base sur l'analyse du chromatogramme d'ES obtenu de l'hydrolysats des PTC, expliquée par les figures qui suivent.

La *Figure 68* montre le chromatogramme de la partie peptidique, et en admettant que 1 pic égale à 1 espèce, on peut supposer que six groupes de peptides sont générés, qu'ils soient ou non des peptides identiques, mais dont les conformations impliquent le même temps de rétention. Ensuite, parmi eux, se dessinent trois groupes de peptides intermédiaires et trois groupes de peptides finaux.

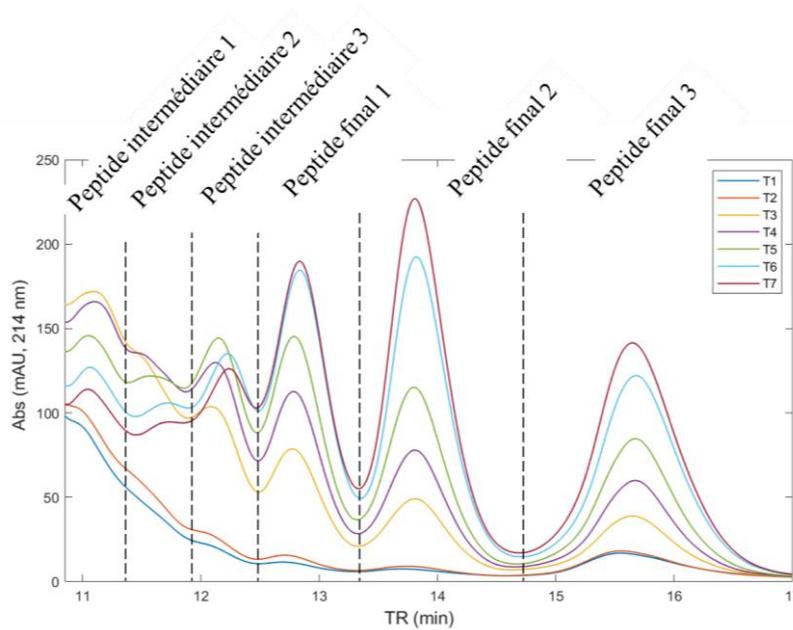


Figure 68 : Exemple de chromatogrammes superposés de l'hydrolyse des PTC, partie peptidique uniquement. Les traits noirs délimitent les groupes peptidiques supposés : groupes des peptides intermédiaires de 1 à 3 et groupes des peptides finaux de 1 à 3. T1 – T7 : différents moments de prélèvement entre 0 et 5 h d'hydrolyse.

Ensuite, la **Figure 69** montre comment les évolutions des concentrations des peptides et de la cruciférine sont reportées des chromatogrammes à un graphe des concentrations de chaque groupe de molécules en fonction du temps (cinétique d'hydrolyse).

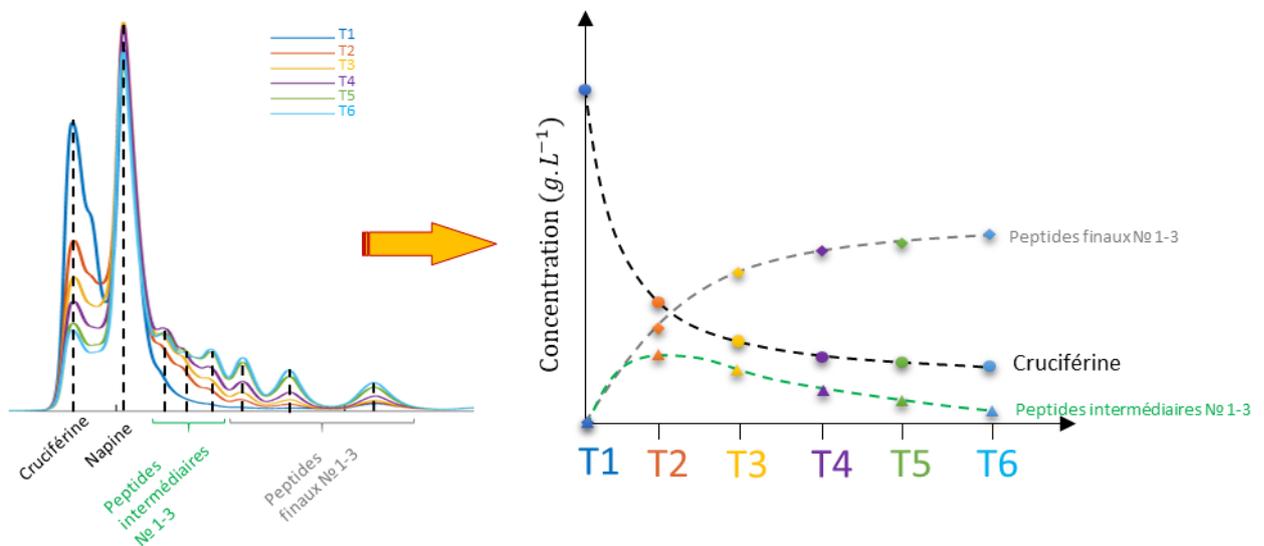


Figure 69 : Schématisation de la méthode pour la prise des concentrations pour la construction des cinétiques à partir des chromatogrammes et de la tendance d'évolution de chaque catégorie de molécule.

Ainsi, en intégrant la complexité du clivage enzymatique, toutes les hypothèses sont appliquées pour expliquer la dynamique des peptides, peu importe leur origine. Une protéolyse se lit alors sur 3 niveaux : protéine – peptides intermédiaires (augmentation de concentration puis diminution) – peptides finaux (augmentation de concentration uniquement).

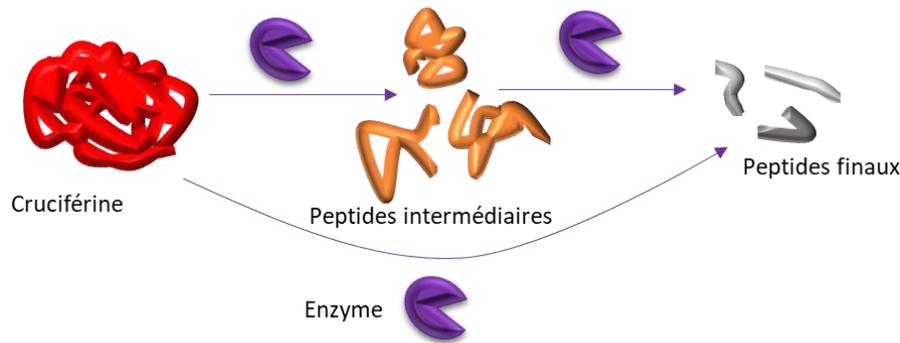


Figure 70 : Schéma du mécanisme supposé de la déplétion de la cruciférine et de la formation des peptides.

L'hydrolyse du premier niveau peut donc, en parallèle, donner des peptides intermédiaires et des peptides finaux (Figure 70). L'hydrolyse du deuxième niveau, ne donne que les peptides finaux. L'analyse du chromatogramme permet de déterminer l'endroit qu'occupent les peptides intermédiaires et les peptides finaux. Cela détermine les différents groupes de peptides. Ensuite, un modèle de réaction sous forme d'équations différentielles est écrit avec l'hypothèse d'apparition et de disparition pour les peptides intermédiaires, et les hypothèses d'apparition des peptides finaux. Il y a autant d'équations que de variation d'espèces considérées (groupes peptidiques, protéine) évoluant en parallèle.

Le modèle de réaction est basé donc sur le fait que peu importe les chemins conduisant à un groupe de peptides particulier, sa constante de réaction est une constante apparente de toutes celles entrant dans sa formation. A l'instar de l'hypothèse de simplification d'une cinétique de M-M, cette constante apparente comprend également la participation de la concentration de l'enzyme libre et du complexe enzyme-substrat (cf. §1.2.3.1 p.41 *EB*). En revanche, une distinction est appliquée entre certains chemins :

- Les peptides finaux proviennent de la protéine et des peptides intermédiaires.
- Les peptides intermédiaires proviennent de la protéine et disparaissent pour donner des peptides finaux. On suppose qu'un peptide intermédiaire ne donne pas un autre peptide intermédiaire, même si cela peut être erroné.
- Nous ne savons pas quel peptide intermédiaire participe à la formation de quel(s) peptide(s) final (finaux). Dans ce cas, il est supposé que chacun des trois groupes de peptides intermédiaires participe à la formation des trois groupes de peptides finaux par des constantes de réaction communes.

Les équations du système s'écrivent alors de la manière suivante avec les constantes significatives vérifiées par l'analyse de sensibilité (cf. §II.9.4 p.136 *M&M*) :

$$\frac{dCruc}{dt} = \underbrace{-k_C[Cruc]^n}_{\text{Déplétion protéine}} + \underbrace{k_g[Cruc]}_{\text{Partie de la protéine non hydrolysable}}$$

Avec  $k_C = k_1 + k_2 + k_3 + k_4 + k_5 + k_6$

$$\frac{dP_{i1}}{dt} = k_1[Cruc]^n - (k_7 + k_8 + k_9)[P_{i1}]$$

$$\frac{dP_{i2}}{dt} = k_2[Cruc]^n - k_{10}[P_{i2}]$$

$$\frac{dP_{i3}}{dt} = \underbrace{k_3[Cruc]^n}_{\text{Apparition Pep Inter à partir de la protéine}} - \underbrace{(k_{11} + k_{12} + k_{13})[P_{i3}]}_{\text{Disparition Pep Inter au profit des Pep Finaux}}$$

$$\frac{dP_{f1}}{dt} = k_4[Cruc]^n + k_7[P_{i1}] + k_{10}[P_{i2}] + k_{11}[P_{i3}]$$

$$\frac{dP_{f2}}{dt} = k_5[Cruc]^n + k_8[P_{i1}] + k_{12}[P_{i3}]$$

$$\frac{dP_{f3}}{dt} = \underbrace{k_6[Cruc]^n}_{\text{Apparition Pep Final à partir de la protéine}} + \underbrace{k_9[P_{i1}]}_{\text{Apparition Pep Final à partir du Pep Inter 1}} + \underbrace{k_{13}[P_{i3}]}_{\text{Apparition Pep Final à partir du Pep Inter 2}}$$

$\underbrace{\hspace{10em}}_{\text{Apparition Pep Final à partir du Pep Inter 3}}$

*Cruc* : Cruciférine  
 $k_g$  : Constante agrégation cruciférine  
 $n$  : Ordre de réaction  
 $k_x$  : Constantes de réaction  
 $P_{ix}$  : Peptide intermédiaire  
 $P_{fx}$  : Peptide final

Eq. 168 - Eq. 169 - Eq. 170 - Eq. 171 - Eq. 172 - Eq. 173 - Eq. 174

L'évolution des concentrations des peptides (intermédiaires et finaux) et protéine en fonction du temps avec leurs constantes d'apparition et consommation est ainsi modélisée. Tous les paramètres inconnus sont ajustés aux données expérimentales, permettant *a posteriori* de

simuler toute concentration à un temps voulu sur le domaine étudié. Ceci a été appliqué et validé sur l'hydrolysats optimal défini précédemment par le domaine de Pareto (cf. §III.1.3 p.158 R&D).

La Figure 71 ci-après montre la résolution des 15 paramètres cinétiques pour satisfaire les concentrations expérimentales (13 constantes de vitesse  $k_x$ , un ordre de réaction  $n$  et la constante d'agrégation de la cruciférine  $k_g$  qui donne la quantité non-hydrolysable de la protéine). Les concentrations peuvent ainsi être simulées entre 0 et 5 h. Une moins bonne approximation est faite sur les peptides intermédiaires 1 et 3, mais globalement ces lois de vitesse de disparition de la protéine et d'apparition des peptides aboutissent à une bonne corrélation entre l'évolution théorique de la concentration et les données expérimentales, pour chaque molécule.

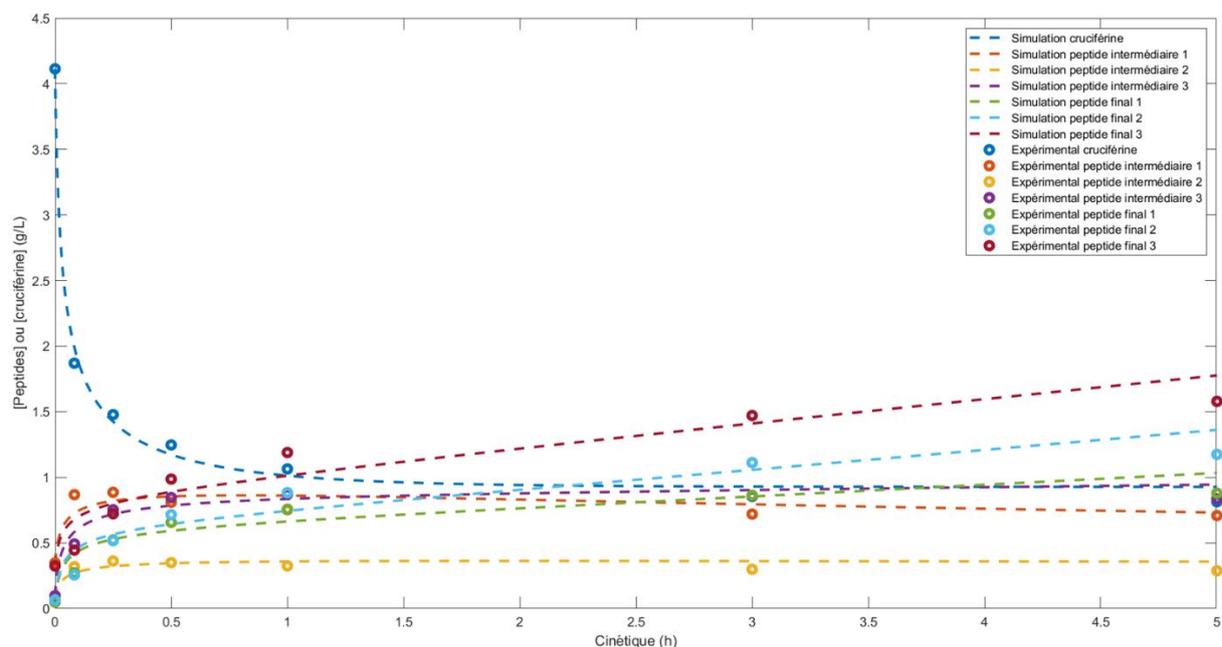


Figure 71 : Simulation par équations différentielles simultanées pour la prédiction des cinétiques protéique et peptidiques dans les conditions optimales de production identifiées (1/448 – pH 3 – 55°C).

La Figure 72 montre que l'écart entre les concentrations expérimentales et celles simulées (discrètes, correspondantes) sont dans la gamme de 25% d'erreur relative. Le mécanisme enzymatique supposé et le modèle mathématique constituaient donc en une évaluation satisfaisante de ce système.

Les paramètres déterminés seront ensuite utilisés dans la simulation de la réaction en mode continu.

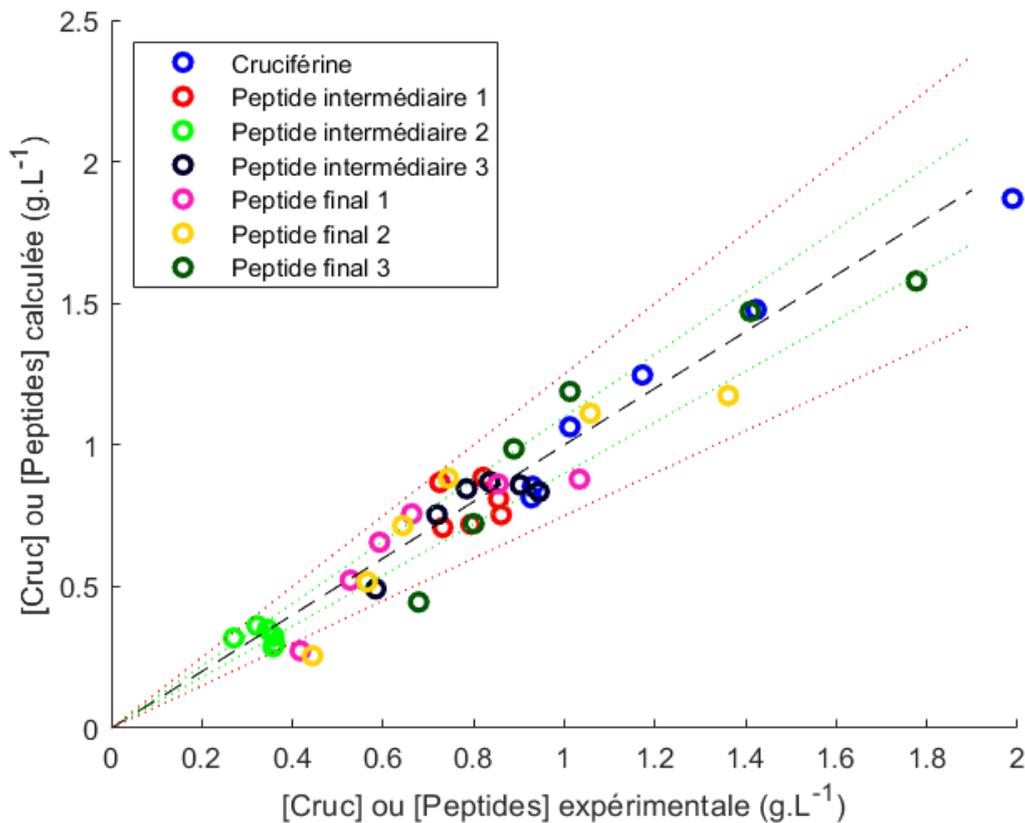


Figure 72 : Erreur relative de la concentration de la protéine et des peptides simulés à des temps donnés de l'hydrolyse par rapport à leurs concentrations expérimentales correspondantes. Tirets noirs (---) 0% erreur, pointillés verts (···) 10% erreur, pointillés rouges (···) 25% erreur.

### III.3.5.2. Transformation des concentrations simulées en chromatogrammes

Pour une simulation de l'hydrolyse en mode continu, il était nécessaire de penser en termes de continuité de la méthodologie développée pour la simulation d'une séparation membranaire (Bodin 2016). Elle est basée sur la simulation des chromatogrammes dans les compartiments rétentat et perméat, donc en conséquence une méthode de représentation de l'hydrolysats en chromatogramme à chaque instant  $t$  de la réaction a été développée.

La transformation en chromatogramme consiste à redessiner chaque pic représentatif d'un groupe de protéines ou peptides, puis de sommer le tout en un seul chromatogramme. Les pics ont été calculés avec la fonction de pseudo-Voigt (cf. §II.4.5 p.117 *M&M*). Généralement, les pics chromatographiques sont davantage représentatifs avec une fonction gaussienne, or dans l'analyse des chromatogrammes il s'est révélé que plus on se rapproche du signal protéique, plus le profil gaussien se dessine, et plus on se rapproche du signal des peptides de faible masse, plus le signal a une forme de la fonction de Lorentz. Une application stricte de l'une ou de l'autre fonction présentait alors une mauvaise modélisation sur l'un ou l'autre des extrêmes du signal. Le profil de Voigt étant une composition des deux fonctions, son utilisation semblait

être la plus appropriée pour une bonne reconstruction du chromatogramme sur tout le signal. Le modèle a été validé avec le point cinétique à 2 h, qui n'était pas compris dans l'ajustement des constantes cinétiques.

Globalement, la reconstruction des graphes (utilisés ou non pour l'ajustement) correspond aux graphes expérimentaux (*Figure 73*). Un écart assez important est observé sur les peptides intermédiaires : l'erreur relative est d'environ 40%. Ceci est la conséquence d'un ajustement moins précis sur cette zone des peptides intermédiaires 1 et 2, en plus de la surestimation qu'il pouvait y avoir entre la modélisation et l'expérimental. Pour les peptides finaux, l'erreur est correcte avec  $\pm 25\%$  d'écart. Cependant, l'écart sur la concentration des peptides intermédiaire n'est pas aussi important sur la *Figure 72* (en dessous de 25% d'erreur). Cela indique que c'est la méthode des reconstructions des pics qui serait en cause, un léger décalage augmente considérablement l'erreur relative. En effet, la concentration expérimentale prise en compte est celle au sommet des pics du chromatogramme, et ces points particuliers présentent autant de déviation que la figure précédemment citée. De plus, les endroits entre les pics sont également sujets à plus d'erreurs, étant donné que les pics se chevauchent, du signal « artefact » est ajouté. Or, des différences de même grandeur ont été observées lors des simulations de chromatogrammes par Bodin (2016), mais cela n'a pas été une gêne au succès des simulations de séparation membranaire de l'hydrolysats de lait. La méthodologie actuelle a été ainsi acceptée pour la suite des travaux.

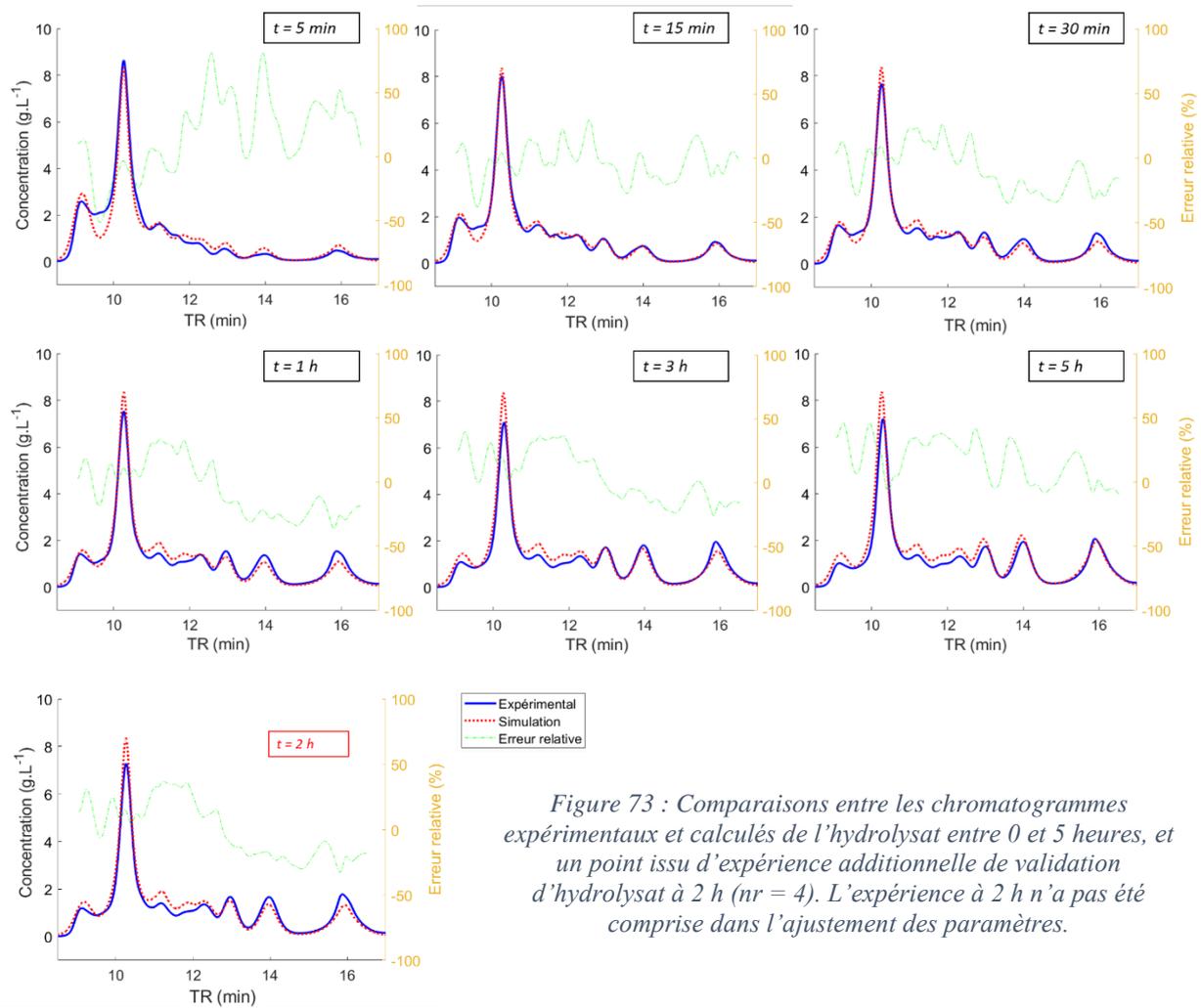


Figure 73 : Comparaisons entre les chromatogrammes expérimentaux et calculés de l'hydrolysate entre 0 et 5 heures, et un point issu d'expérience additionnelle de validation d'hydrolysate à 2 h ( $nr = 4$ ). L'expérience à 2 h n'a pas été comprise dans l'ajustement des paramètres.

Enfin, la **Figure 74** montre la superposition du chromatogramme prédit de l'hydrolysate et du chromatogramme moyen sur six productions de 2 L de cet hydrolysate optimal. On peut voir que comme pour les comparaisons précédentes, la prédiction est très correcte sur les peptides finaux et le peptide intermédiaire 3, en revanche une surestimation persiste sur les peptides intermédiaires 1 et 2. La prédiction de la cruciférine est correcte également. Le léger décalage de  $TR$  est dû au décalage d'élution dans la colonne d'ES, mais cela n'empêche pas l'identification de la protéine. La modélisation est donc aussi validée sur la production d'un plus grand volume d'hydrolysate.

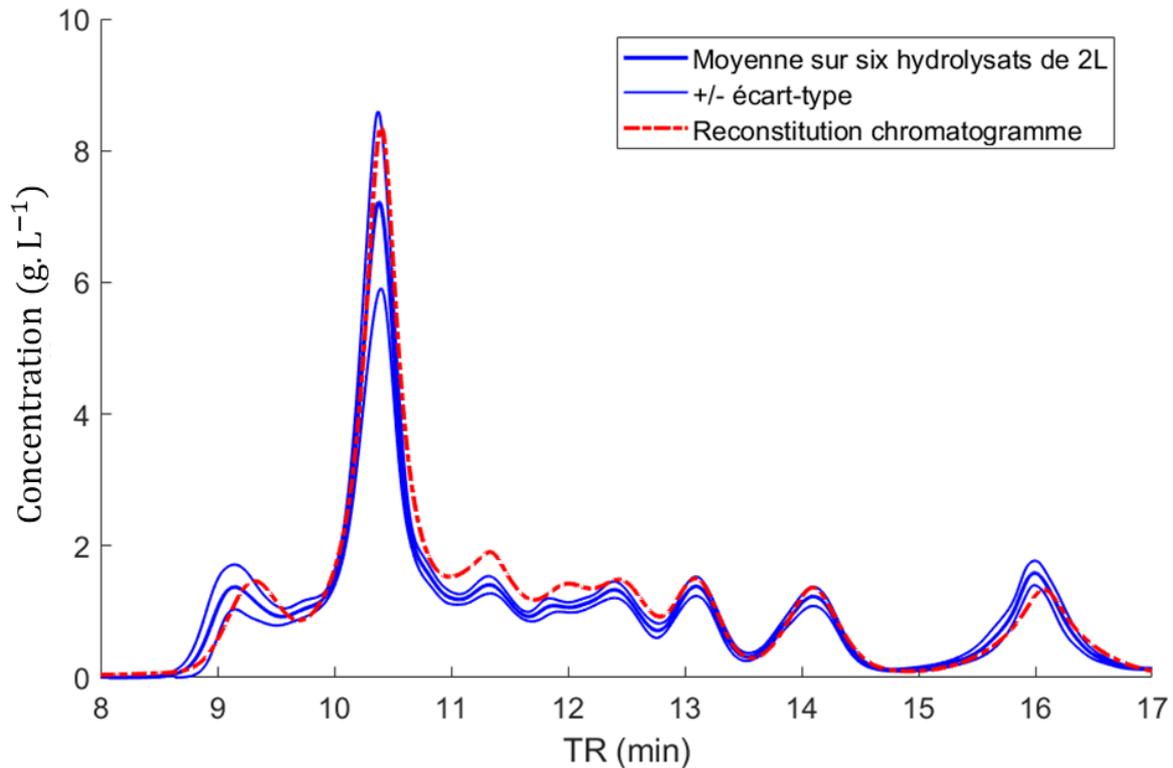


Figure 74 : Chromatogramme massique prédit (tirets rouges) de l'hydrolysats ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 3,  $55^\circ\text{C}$ , E/S 1/448 et 2 h) et le chromatogramme massique moyen ( $nr = 6$ ) des productions d'hydrolysats (traits bleus) correspondant aux mêmes conditions pour un volume final de 2 L.

### III.3.5.3. Modélisation des fractionnements en UF

Afin de pouvoir prédire les performances d'un REM, une modélisation doit être faite pour l'hydrolyse d'une part, et pour la séparation d'autre part. Le modèle d'hydrolyse ayant été défini et sa validité confirmée, la modélisation des caractéristiques de la partie séparation membranaire, en modes CD et DF a ensuite été réalisée (cf. §II.7.3 p.131 *M&M*). Pour ce faire, la théorie du film a été ajoutée à la modélisation par bilan de matière et les calculs ont été comparés aux expériences correspondantes.

La *Figure 75 A* présente le rendement en napine (rétentat), la pureté en protéines (rétentat) et le rendement en peptides (perméat) en mode CD pour la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ . Les expériences ayant été réalisées en deux fois, les deux réplicats sont présents pour les valeurs expérimentales. Le rendement de la napine est prédit au minimum à 0,99 à la fin du procédé, et les expériences sont en accord avec la prédiction dans les limites de 20% d'erreur avec un rendement  $\sim 0,94$  en moyenne entre les  $FRV = 3$  et  $FRV = 8$ . La pureté protéique, qui est de  $\sim 50\%$  au départ, augmente progressivement jusqu'à  $\sim 63\%$  au  $FRV = 8$ . La prédiction est très correcte avec moins de 5% d'erreur tout le long du procédé. Le rendement en peptides dans le perméat est de  $\sim 0,19$  au  $FRV = 2$  et augmente jusqu'à  $\sim 0,4$  au  $FRV = 8$ . La prédiction est également très bonne avec moins de 10% d'erreur tout le long du procédé.

La *Figure 75 B* présente le rendement en napine (rétentat), la pureté en protéines (rétentat) et le rendement en peptides (perméat) en mode DF pour la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ . Le rendement en napine est de  $\sim 0,88$  au  $DV = 1$  et diminue légèrement à  $\sim 0,8$  au  $DV = 8$ . La prédiction prévoit moins de perte avec  $0,96$  de rendement en napine à la fin, mais globalement toutes les valeurs expérimentales sont dans la limite des  $20\%$  d'erreur acceptée. La pureté en protéines augmente de  $\sim 50\%$  au  $DV = 0$  à  $\sim 0,69\%$  au  $DV = 8$ . La prédiction surestime ce paramètre au fur et à mesure du procédé, en passant d'une erreur de moins de  $10\%$  jusqu'à  $DV = 3$ , à moins de  $20\%$  entre le  $DV = 4$  et  $DV = 8$  et une valeur de pureté de  $85\%$  finale. La prédiction reste donc acceptable. Le rendement en peptides dans le perméat présente plus de dispersion au niveau des répliquats, avec  $\sim 0,23$  au  $DV = 1$  et de  $\sim 0,68$  en moyenne au  $DV = 8$ . La prédiction est moins bonne en surestimant le passage des peptides à  $0,3$  au  $DV = 1$  ou  $0,86$  au  $DV = 8$  par exemple. L'erreur serait alors un peu plus grande, plutôt de  $\sim 25\%$ . Cela peut rester acceptable, sachant qu'un répliquat sur deux est compris dans la limite des  $20\%$  d'erreur acceptable.

La *Figure 75 C* présente le rendement en napine (rétentat), la pureté en protéines (rétentat) et le rendement en peptides (perméat) en mode CD pour la membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ . Le rendement en napine diminue progressivement jusqu'à  $\sim 0,92$  au  $FRV = 8$ . La prédiction est correcte avec un rendement de  $0,97$  au même  $FRV$ , et le reste des valeurs sont comprises dans les  $20\%$  d'erreur acceptée. La pureté en protéines est de  $52\%$  au début, pour augmenter progressivement jusqu'à  $\sim 72\%$  au  $FRV = 8$ . La prédiction montre en revanche une nette augmentation entre le  $FRV = 1$  et  $FRV = 1,1$  ( $61\%$ ) alors que la tendance de l'augmentation expérimentale est plus progressive ( $58\%$  de pureté à  $FRV = 2$ ). Néanmoins, tous les points sont compris dans l'écart de  $20\%$  d'erreur acceptée, ce qui valide la modélisation. Le rendement des peptides dans le perméat est de  $\sim 0,31$  au  $FRV = 2$ , puis augmente jusqu'à  $\sim 62\%$  au  $FRV = 8$ . De la même manière que pour la pureté, la prédiction indique une augmentation très forte entre  $FRV = 1$  et  $FRV = 1,1$  ( $Rdm_{pep} = 0,33$ ) ce qui a pour conséquence d'éloigner les valeurs expérimentales au  $FRV = 2$  ( $Rdm_{pep} \sim 0,31$ ). Par la suite par contre, la prédiction est correcte avec les valeurs expérimentales dans les  $20\%$  d'erreur acceptée.

La *Figure 75 D* présente le rendement en napine (rétentat), la pureté en protéines (rétentat) et le rendement en peptides (perméat) en mode DF pour la membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ . Le rendement en napine diminue jusqu'à  $\sim 0,82$  en moyenne au  $DV = 8$ . La prédiction montre la même tendance avec une valeur de fin de  $0,81$ . Quasiment tous les points expérimentaux sont compris dans les  $20\%$  d'erreur acceptée, ce qui valide ce modèle. La pureté en protéines est de

~50% au départ, et augmente jusqu'à 80% au  $DV = 8$ . La prédiction s'écarte un peu à partir du  $DV = 4$  pour une valeur finale de 96%, mais tous les points sont dans la limite des 20% d'erreur, donc le modèle reste acceptable. Le rendement en peptides est de ~0,32 au  $DV = 1$  et augmente jusqu'à ~0,84 au  $DV = 8$ . A l'instar de la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ , la dispersion entre les valeurs des deux réplicats est aussi élevée. Ceci résulte en un réplicat qui est compris dans la prédiction avec 20% d'erreur acceptée, alors que l'autre est plus éloigné, la prédiction surestimant le passage de peptides à la fin avec 0,96 de rendement. Néanmoins, en prenant la moyenne sur chaque point, toutes les valeurs seraient dans la plage d'erreur acceptée, donc finalement le modèle prédictif peut être validé.

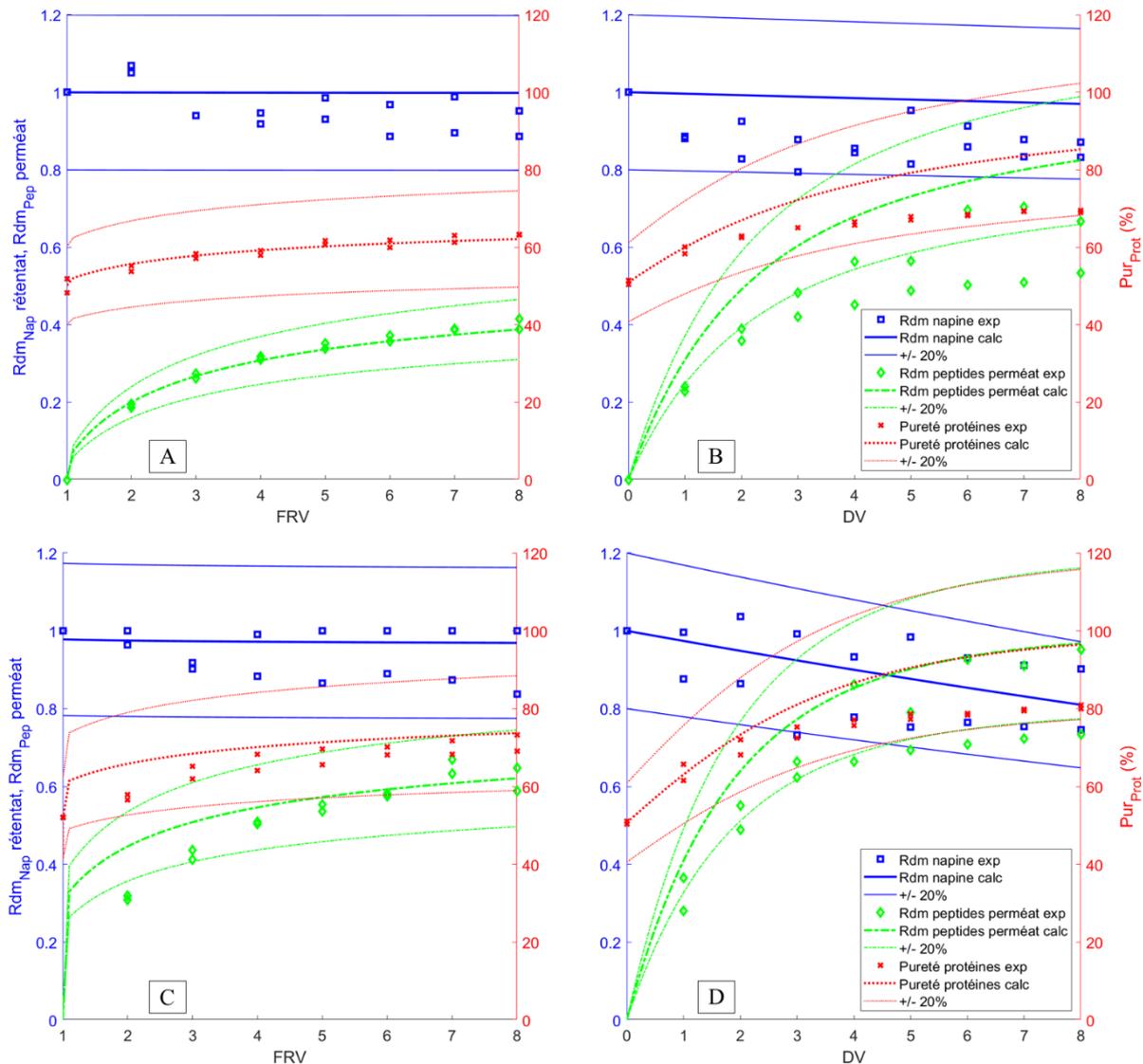


Figure 75 : Comparaisons de la simulation des performances (rendement napine rétentat, pureté protéines rétentat et rendement peptides perméat) en ultrafiltration à  $3000 \text{ s}^{-1}$  et PTM de 2 bar. (A) En CD pour la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ , (B) en DF pour la membrane de  $30 \text{ kg.mol}^{-1}$ , (C) en CD pour la membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$  et (D) en DF pour la membrane de  $100 \text{ kg.mol}^{-1}$ .

En conclusion, d'un côté, en CD les prédictions sont quasiment dans les bornes de  $\pm 20\%$  de l'erreur relative acceptée, pour les deux membranes et pour tous les critères. De l'autre côté, la prédiction en DF est bonne pour le rendement en napine, par contre une surestimation est présente pour la pureté en napine atteignant les 20% d'erreur relative au  $DV = 8$ , et enfin le rendement en peptides a une prédiction acceptable pour une expérience sur deux. La théorie du film (cf. Eq. 134-Eq. 152 p.126-128 *M&M*) a grandement amélioré la prédiction par rapport à une hypothèse simple de transfert de peptides (cf. Eq. 53-Eq. 56 p.77-77 *EB*), mais les expériences montrent une grande variabilité quant au transfert en DF, témoignant de la complexité du système. La faiblesse de la méthode est l'étalonnage, qui n'est pas fait dans des conditions de flux limite, amenant sans doute à cette déviation quand le nombre de diavolumes augmente. Néanmoins, sachant que les paramètres pour calculer la rétention réelle et les coefficients de transfert de matière  $k_{cl}$  ont été empruntés à la littérature (cf. Eq. 125 p.123 *M&M*), lesquels ont été déterminés avec des modules et des molécules différentes, ces résultats sont assez satisfaisants pour la suite de l'étude. Une piste d'amélioration tout de même pour des études plus poussée sur ce procédé serait de déterminer expérimentalement la rétention réelle et les coefficients de transfert de matière  $k_{cl}$ , comme il est fait de plus en plus pour la séparation des mélanges complexes (Nakao & Kimura 1981; Causserand 2006; Ahmad *et al.* 2006; Bakhshayeshi *et al.* 2012).

#### III.3.5.4. Ecriture des équations – Hydrolyse et séparation membranaire

Le modèle de la protéolyse étant déterminé, et la modélisation de la séparation membranaire validée, les deux peuvent être combinés. Le schéma de la *Figure 76* résume les concepts à prendre en compte pour le bilan de matière total. Pour le côté rétentat,  $Q_a$  est le débit d'alimentation de la suspension des PTC,  $C_a$  la concentration en PTC (cruciférine ou napine),  $C_r$  la concentration en molécules dans le rétentat (l'indice  $i$  représentant les protéines ou les peptides),  $V_r$  est le volume du rétentat,  $Q_r$  est le débit sortant du rétentat (fixé),  $Q_c$  est le débit à la sortie du module de filtration,  $C_c$  la concentration en molécules à la colonne membranaire (l'indice  $i$  représentant les protéines ou les peptides),  $r_i$  et le taux de réaction (égale à  $-r_{cruc}$  pour la disparition de la cruciférine et  $r_{peptide_i}$  pour l'apparition des peptides (cf. Eq. 168 - Eq. 169 - Eq. 170 - Eq. 171 - Eq. 172 - Eq. 173 - Eq. 174 p.211)). Du côté perméat,  $C_p$  est la concentration en molécules transférées dans le perméat à la membrane,  $Q_p$  est le débit du perméat et  $V_p$  le volume du perméat.

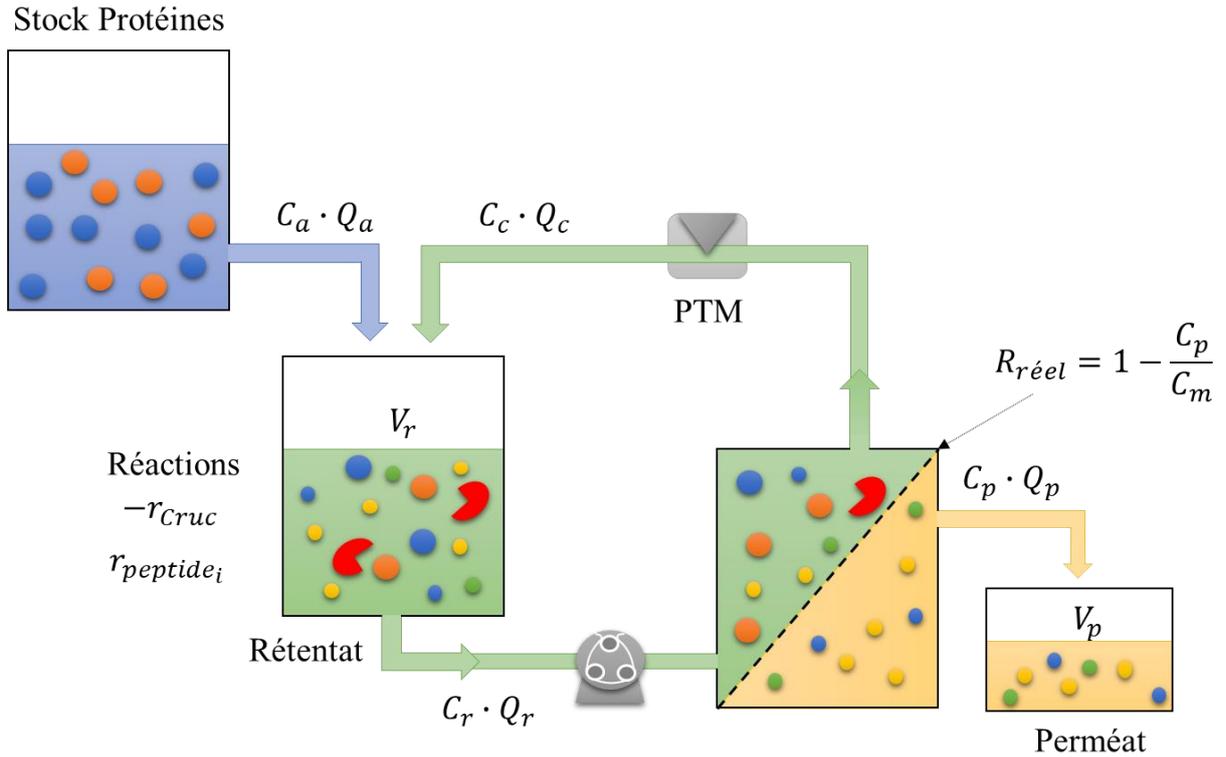


Figure 76 : Schéma du montage REM représentant le flux de matière.

### Rétentat

$$\frac{dC_{ri} \cdot V_r}{dt} = Q_a \cdot C_{ai} - Q_r \cdot C_{ri} + Q_c \cdot C_{ci} + r_i \cdot V_r \quad \text{Eq. 175}$$

Avec  $\frac{dV_r}{dt} = 0$  ;  $Q_a = Q_p$  ;  $Q_r \cdot C_{ri} - Q_c \cdot C_{ci} = Q_p \cdot C_{pi}$  ;

$$C_{pi} = (1 - R_{réel_i})C_{mi} \text{ et une division par } V_r$$

$$\Leftrightarrow \frac{dC_{ri}}{dt} = \frac{Q_p(C_{ai} - (1 - R_{réel_i})C_{mi})}{V_r} + r_i \quad \text{Eq. 176}$$

En intégrant l'Eq. 136 (p.127) de  $C_m$  en fonction de  $C_r$  :

$$\frac{dC_{ri}}{dt} = \frac{Q_p \left[ C_{ai} - (1 - R_{réel_i}) \cdot \left( (C_{ri} - C_{pi}) \times e^{\frac{J_{flux}}{k_{cli}}} + C_{pi} \right) \right]}{V_r} + r_i \quad \text{Eq. 177}$$

Les évolutions de la partie non-hydrolysable de la cruciférine (~20%) et la napine sont considérées comme des accumulations simples :

$$\frac{dC_{ri}}{dt} = \frac{Q_p(C_{ai})}{V_r} \quad \text{Eq. 178}$$

### Perméat

$$\frac{dC_{p_i} \cdot V_p}{dt} = Q_p \cdot C_{p_i}$$

Avec  $\frac{dV_p}{dt} = Q_p$  ; la concentration en peptide sortant de la membrane,

$C_{p_i} = (1 - R_{réel_i}) \cdot C_{m_i}$  ; et en soustrayant les peptides déjà pris en

compte dans le perméat  $\widetilde{C}_{p_i}$  :

$$\frac{dC_{p_i}}{dt} = \frac{Q_p \cdot (1 - R_{réel_i}) \cdot C_{m_i} - Q_p \cdot \widetilde{C}_{p_i}}{V_p} \quad \text{Eq. 179}$$

En intégrant l'Eq. 136 (p.127) de  $C_m$  en fonction de  $C_r$  :

$$\Leftrightarrow \frac{dC_{p_i}}{dt} = \frac{Q_p \cdot \left[ (1 - R_{réel_i}) \cdot \left( (C_{r_i} - C_{p_i}) \times e^{\frac{J_{flux}}{k_{cl_i}}} + C_{p_i} \right) - \widetilde{C}_{p_i} \right]}{V_p} \quad \text{Eq. 180}$$

Le système est donc composé de 17 équations différentielles comprenant la variation dans le temps des protéines (napine, cruciférine hydrolysable et non-hydrolysable), des peptides dans le rétentat et le perméat et les volumes des rétentat et perméat. La partie de la pré-hydrolyse est modélisée en même temps en appliquant  $Q_p = 0$  jusqu'à 50 minutes.

Concernant ce dernier point de la pré-hydrolyse de 50 min, il est à noter qu'une modification de l'hydrolyse optimale a été faite. En effet, au départ sur le front de Pareto la production économique en mode *batch* selon la méthode « min-max » se trouvait au milieu de la courbe, pour un temps d'hydrolyse de 2 heures. Or, pour un fonctionnement de REM au temps de séjour constant et égal au temps d'hydrolyse, c'est difficilement réalisable (flux cible très faible). De plus, ce mode de fonctionnement devant être comparé au mode de fonctionnement au temps de séjour variable avec le même nombre de volume de remplacement. Cette durée d'hydrolyse devait être raccourcie. Le front de Pareto permet de faire justement ce changement, étant donné que toutes les solutions présentées sont équivalentes. Une durée d'hydrolyse longue nécessite peu d'enzyme, et une durée courte nécessite beaucoup d'enzymes. Dans le cas présent, l'accent a été mis sur le fait que l'hydrolyse optimale doit se faire le plus rapidement possible, permettant un débit de perméat adéquat. Ainsi, pour avoir un débit facile à suivre avec un chiffre rond de 2 mL.min (~2,4  $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ), le point optimal a été choisi à 50 min de temps d'hydrolyse (proche de la limite minimale de 45 min), ce qui correspond au passage d'un volume de 100 mL. Le

nouveau ratio  $E/S$  utilisé pour les REM est donc de 1/170 et la même méthodologie (cf. §III.3.5.1 p.207 R&D) de détermination de paramètres du modèle de la protéolyse a été appliquée.

### III.3.5.5. Validation de la modélisation du REM par bilan de masse

Les modélisations de la protéolyse et celle de la séparation membranaire ayant été validées, les deux sont maintenant couplées pour modéliser un REM. Les variations de masse pour chaque compartiment et chaque molécule ont donc été modélisées avec les *Eq. 175* à *Eq. 180* (p.220) dans les conditions d'hydrolyse optimale (55°C,  $E/S$  1/170). La modélisation du flux de perméat à la *PTM* de 2 bar a été faite à partir de l'expérience en CD. Les variations des peptides sont celles des peptides totaux.

La *Figure 77* présente les modélisations et leurs vérifications expérimentales pour le REM en fonctionnement à flux de perméat variable. Les expériences ont été réalisées en deux fois, les valeurs pour les deux réplicats sont donc représentées sur les figures.

La *Figure 77 A* présente la modélisation de la concentration des peptides totaux dans le rétentat en fonction de la durée totale du procédé REM. La pré-hydrolyse a lieu jusqu'à 50 min puis la *PTM* est appliquée pour le soutirage. La pré-hydrolyse résulte donc en une concentration de  $\sim 6,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , puis à la fin du soutirage ( $VR = 6$ ) la concentration est de  $\sim 23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , témoignant d'une accumulation de peptides dans le rétentat. Les résultats en UF seule ont déjà montré une tendance à retenir les peptides très fortement à cause des phénomènes d'agrégation entre les molécules et une couche de polarisation importante (cf. §III.2 p.162 R&D). C'est ce qui est retrouvé ici avec une concentration de peptides dans le rétentat qui a presque quadruplée. Néanmoins, on ne cherche pas encore ici à obtenir un lessivage total des peptides, mais une modélisation correcte du procédé. Ainsi, on peut voir qu'une sous-estimation du modèle est présente pour la pré-hydrolyse, et que par la suite la prédiction du soutirage est correcte en restant dans les 20% d'erreur acceptée, sauf pour le dernier point expérimental, un peu plus élevé que la prédiction à  $\sim 18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

La *Figure 77 B* présente la modélisation de la concentration des peptides totaux dans le perméat en fonction de la durée totale du procédé REM. Au  $VR = 1$ , la valeur moyenne de peptides sortis est de  $\sim 2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , puis le soutirage est plutôt stable, avec une légère augmentation au  $VR = 6$  à  $\sim 2,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de peptides. La prédiction est assez bien représentative de cette évolution, avec les points expérimentaux globalement dans les 20% d'erreur acceptée.

La *Figure 77 C* présente la modélisation du flux et du volume du perméat en fonction de la durée totale du procédé. Il n'y quasiment pas de dispersions entre les points expérimentaux, du début du soutirage ( $\sim 9,9 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) jusqu'à la fin ( $\sim 4,5 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ), prélevé au  $VR = 6$ . Le flux de perméat étant un facteur très important pour le transfert des peptides, il faudrait qu'il y ait le moins d'erreur possible sur sa prédiction. En l'occurrence, l'erreur est d'environ 10% en moyenne sur tous les points de prélèvement. La modélisation basée sur le mode d'UF en CD a donc permis une bonne approximation pour le fonctionnement en REM. Le volume de rétentat étant égal à 100 mL, donc pour le volume du perméat c'est 600 mL qui sont attendus. En revanche, la prédiction surestime le volume de 100 mL à chaque VR. Cela serait dû à la surestimation de 10% du flux, qui résulte en une surestimation du volume de perméat prédit. Cependant, cela reste dans les 20% d'erreur acceptable et ne devrait donc pas être très préjudiciable à des simulations futures.

La *Figure 77 D* enfin, présente les concentrations des protéines dans le rétentat, la napine et la cruciférine, en fonction de la durée totale du REM. La concentration de la napine est de  $\sim 4,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  au départ de la pré-hydrolyse, puis diminue un peu jusqu'à  $\sim 3,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  à la fin de la pré-hydrolyse. Puis, comme la napine n'est pas hydrolysée et est retenue par la membrane, une fois le soutirage et l'ajout de solution stock enclenché, la napine s'accumule dans le rétentat jusqu'à  $\sim 32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . C'est environ huit fois plus concentré qu'au départ, et cela correspond à ce qui est attendu étant donné qu'à la concentration initiale, six VR sont ajoutés avec la napine. La modélisation surestime un peu la concentration tout le long du procédé, mais reste assez correcte, avec globalement tous les points dans les 20% d'erreur acceptée. En ce qui concerne la cruciférine, pendant la pré-hydrolyse la concentration initiale à  $\sim 3,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  diminue jusqu'à  $0,38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  avant l'application du soutirage. Puis au soutirage, elle s'accumule un peu jusqu'à  $\sim 9,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Sachant que sa concentration finale sans hydrolyse serait d'environ  $22,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , et qu'environ 20% de la cruciférine n'est pas hydrolysée, la concentration finale devrait être de  $4,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Or, la concentration finale est double de celle attendue, indiquant que l'hydrolyse a été moins efficace que prévue, amenant à une accumulation de la cruciférine plus élevée. Étant donné qu'il n'y a pas de désactivation enzymatique notable (conservation de l'activité dans le rétentat et activité quasi-inexistante dans le perméat), la concentration de la cruciférine pourrait être la cause. En effet, la cruciférine a des propriétés gélifiantes (Wanasundara *et al.* 2016), et il a été démontré avec les protéines du lactosérum que plus leur concentration est élevée, plus la gélation est importante, et plus le *DH* est faible, donc plus la conversion protéique est faible (Butré *et al.* 2012).

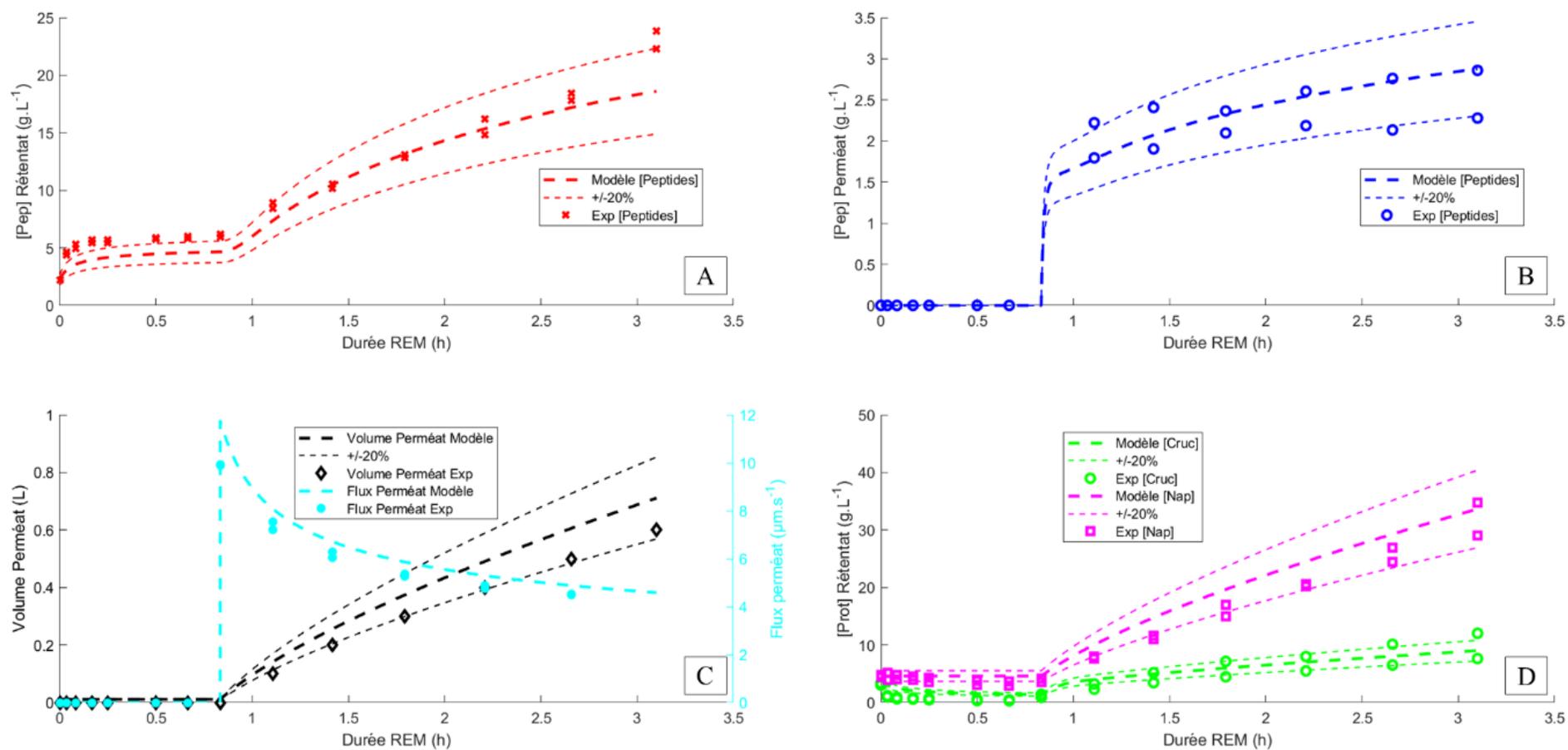


Figure 77 : Comparaisons de l'expérience ( $n_r = 2$ ) et de la modélisation du REM en fonctionnement à flux de perméat variable ( $55^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 3$ , E/S 1/170, PTM 2 bar, taux de cisaillement de  $3000 \text{ s}^{-1}$ ) à partir du début de la pré-hydrolyse. (A) Concentration des peptides totaux dans le rétentat. (B) Concentration des peptides totaux dans le perméat. (C) Volume et flux du perméat. (D) Concentration de la cruciférine et de la napine dans le rétentat.

Dans le cas présent, même si l'hydrolyse est quasi instantanée lors de l'ajout de la solution de stock, quelques molécules de cruciférine peuvent échapper et s'agglomérer aux cruciférines déjà agglomérées/gélifiées, ce qui augmente au fur et à mesure la concentration de la cruciférine indisponible pour l'hydrolyse. Toutefois, on ne s'intéresse pas à l'hydrolyse totale de la cruciférine, mais à sa modélisation. La prédiction montre ainsi que l'évolution de la concentration de la cruciférine est bien représentée au cours du procédé.

La *Figure 78* présente ensuite l'erreur relative de bilan de matière sur tout le procédé du REM en mode à flux variable, de l'expérience et de la modélisation pour vérifier que la masse entrée est égale à la masse en sortie. En l'occurrence, cela permet de vérifier que la quantité hydrolysée de la cruciférine correspond à la quantité de peptides produits, qu'ils soient dans le rétentat ou dans le perméat. Pour l'expérience, l'erreur est plus élevée sur la partie de la pré-hydrolyse, mais globalement tous les points sont compris dans les 20% d'erreur relative acceptée, ce qui montre qu'il n'y a pas de problèmes de perte ou d'ajout de matière inexplicée à chaque étape. La modélisation montre également que les changements induits au cours du temps, l'ajout de matière, l'hydrolyse et le transfert de peptides sont bien intégrés et cela valide les équations du modèle ainsi que toute la méthodologie utilisée pour y parvenir.

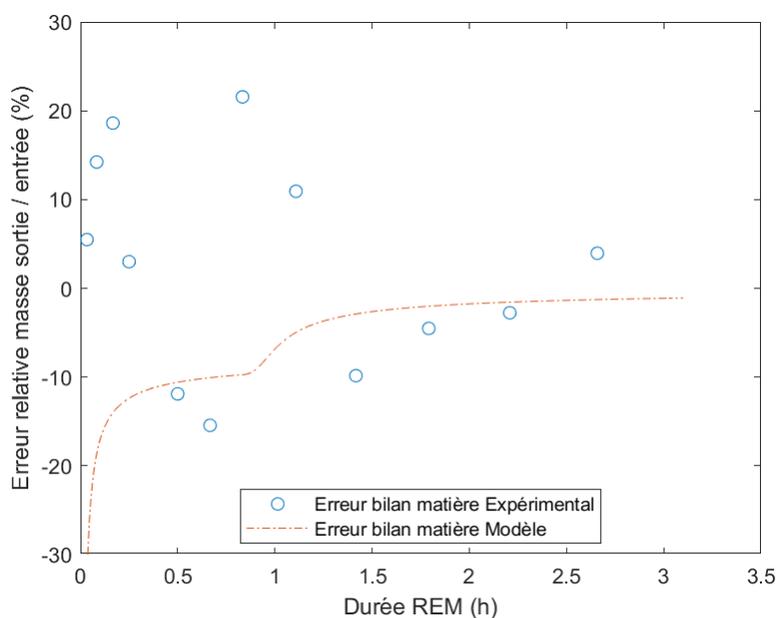


Figure 78 : Erreur relative sur le bilan de matière entrée – sortie pour le fonctionnement REM à flux de perméat variable ( $nr = 2$ ).

La *Figure 79* présente les modélisations et leurs vérifications expérimentales pour le REM en fonctionnement à flux de perméat constant.

La *Figure 79 A* présente la modélisation de la concentration des peptides totaux dans le rétentat en fonction de la durée totale du procédé REM. La pré-hydrolyse a lieu jusqu'à 50 min puis la *PTM* est appliqué pour le soutirage. La pré-hydrolyse donne à la fin une concentration de  $\sim 5,5 \text{ g.L}^{-1}$  de peptides puis à la fin du soutirage ( $VR = 6$ ) la concentration est de  $\sim 19 \text{ g.L}^{-1}$ . Les peptides s'accumulent donc aussi dans le rétentat pour ce mode. La modélisation de la pré-hydrolyse est correcte avec les valeurs sur la limite de +20% d'erreur acceptée, et par la suite la prédiction du soutirage est correcte en restant autour de la prédiction principale dans les 20% d'erreur acceptée.

La *Figure 79 B* présente la modélisation de la concentration des peptides totaux dans le perméat en fonction de la durée totale du procédé REM. Au  $VR = 1$ , la valeur moyenne de peptides sortis est de  $\sim 2,2 \text{ g.L}^{-1}$ , puis le soutirage est plutôt stable, avec une légère augmentation au  $VR = 6$  avec  $\sim 2,7 \text{ g.L}^{-1}$  de peptides. La prédiction montre une augmentation plus forte, mais à part le premier point expérimental du soutirage hors de la prédiction, la modélisation est dans les 20% d'erreur acceptée.

La *Figure 79 C* présente la modélisation du flux et du volume du perméat en fonction de la durée totale du procédé. Le flux étant fixé dans ce cas, il n'y a pas vraiment de modélisation, mais elle a été laissée pour garder la même présentation que pour le mode à flux variable. La prédiction sur le volume surestime le volume de 50 à 100 mL à chaque  $VR$ . Cependant, cela reste dans les 20% d'erreur acceptable, comme pour le mode à flux variable, et devrait être très acceptable pour les simulations futures.

La *Figure 79 D* enfin, présente les concentrations des protéines dans le rétentat, la napine et la cruciférine, en fonction de la durée totale du REM. La concentration de la napine est de  $\sim 4,5 \text{ g.L}^{-1}$  au départ de la pré-hydrolyse, puis diminue un peu jusqu'à  $\sim 4 \text{ g.L}^{-1}$  à la fin de la pré-hydrolyse, et enfin augmente linéairement jusqu'à  $\sim 35 \text{ g.L}^{-1}$ . Cela reste correct vis-à-vis de l'accumulation attendue, et la modélisation en bonne avec, globalement, tous les points dans les 20% d'erreur acceptée. Concernant la cruciférine, pendant la pré-hydrolyse la concentration initiale est à  $\sim 3,3 \text{ g.L}^{-1}$ , puis elle diminue jusqu'à  $0,88 \text{ g.L}^{-1}$  avant l'application du soutirage. Puis au soutirage, elle s'accumule linéairement jusqu'à  $\sim 10,2 \text{ g.L}^{-1}$ . Comme pour le mode à flux variable, la cruciférine a été moins hydrolysée que prévue, possiblement à cause de l'agrégation ou de sa capacité de gélification.

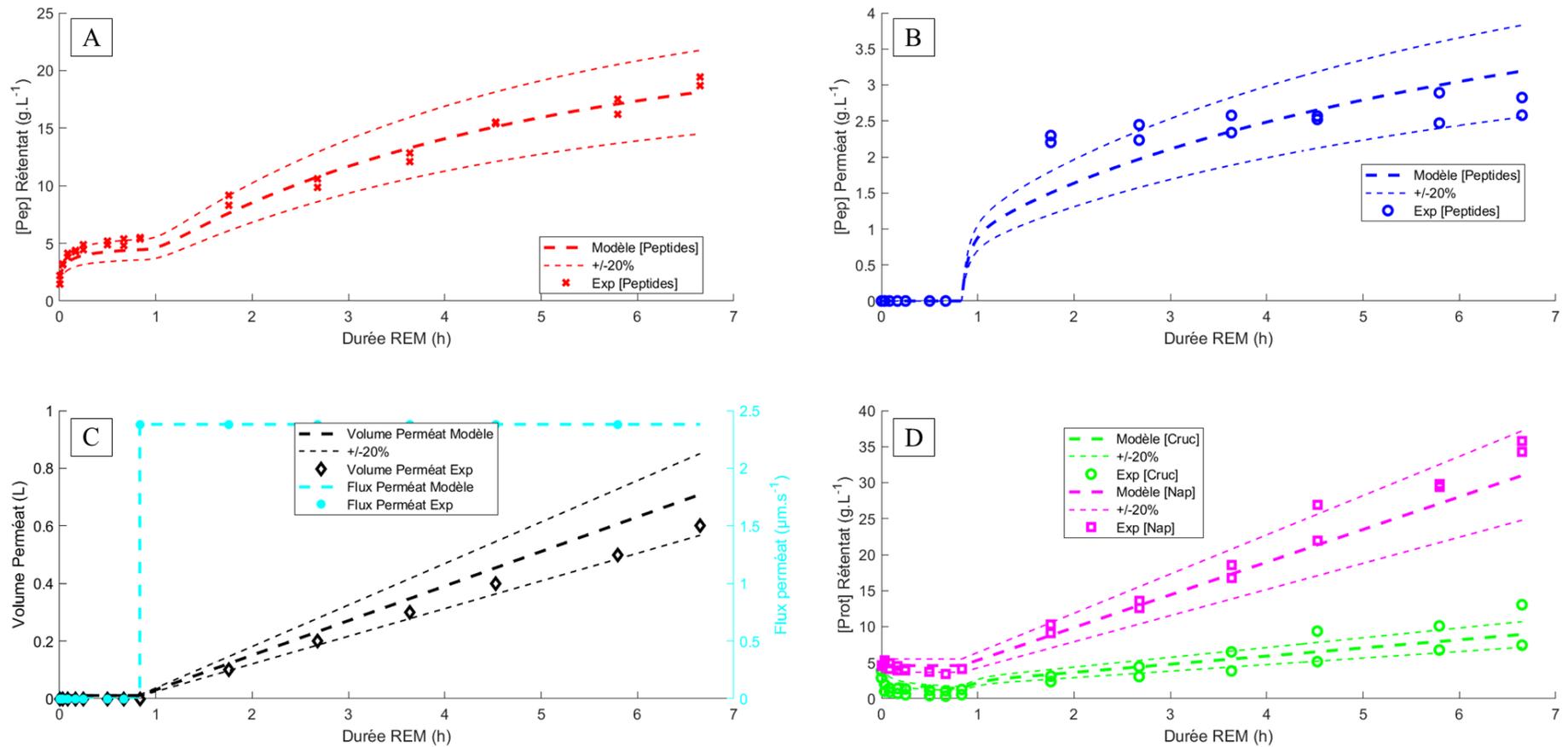


Figure 79 : Comparaisons de l'expérience (nr = 2) et de la modélisation du REM en fonctionnement à flux de perméat constant (55 °C, pH 3, E/S 1/170, débit perméat 2 mL.min<sup>-1</sup> (flux ~2,4 μm.s<sup>-1</sup>), taux de cisaillement de 3000 s<sup>-1</sup>) à partir du début de la pré-hydrolyse. (A) Concentration des peptides totaux dans le rétentat. (B) Concentration des peptides totaux dans le perméat. (C) Volume du perméat et flux du perméat. (D) Concentration de la cruciférine et de la napine dans le rétentat.

La **Figure 80** présente l'erreur relative de bilan de matière sur tout le procédé du REM en mode à flux constant. Expérimentalement, le bilan est bon avec quasiment tous les points en dessous de 10% d'erreur relative, sauf le point à 40 min de pré-hydrolysée et au  $VR = 1$ , mais qui sont dans la limite de 20% d'erreur. La modélisation est également très correcte, avec moins d'erreur sur le soutirage que sur la pré-hydrolyse, et valide donc la méthodologie dans ce cas aussi.

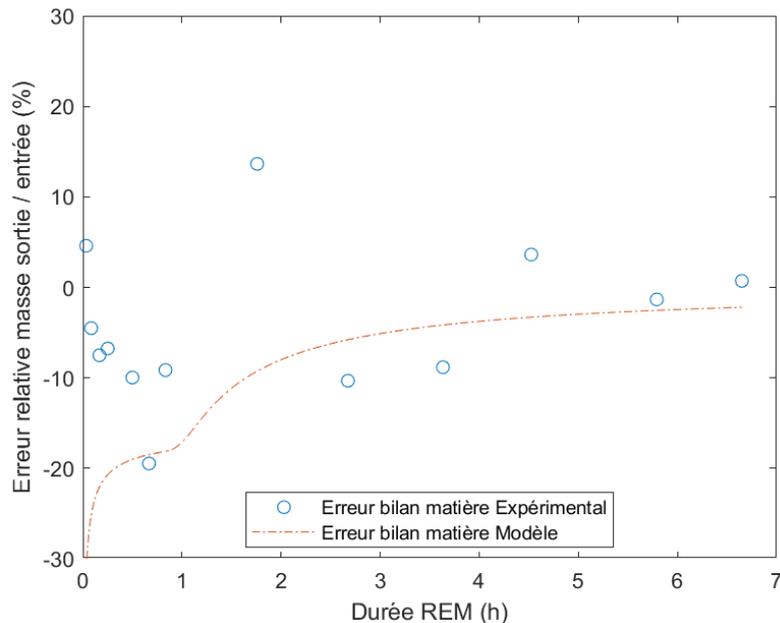


Figure 80 : Erreur relative sur le bilan de matière entrée – sortie pour le fonctionnement REM à flux de perméat constant ( $nr = 2$ ).

En conclusion, le modèle de systèmes d'équations mis en place est valide et peut donc modéliser l'évolution des concentrations de tous les composants de l'hydrolysate au cours du temps dans les deux modes de fonctionnement de REM, à flux variable ou constant.

### III.3.5.6. Validation du modèle par les grandeurs de caractérisation

Pour aller plus loin, le modèle a été éprouvé en modélisant directement les grandeurs de caractérisation, toujours pour les deux modes de fonctionnement, et a été comparé aux valeurs expérimentales. Les calculs ont été réalisés de la même manière que pour le paragraphe précédent III.3.3 (cf. Eq. 160-Eq. 163 p.135 M&M).

La **Figure 81 A** présente la modélisation et l'expérience correspondante pour le REM en fonctionnement à flux variable de l'évolution de la conversion protéique en fonction des  $VR$ . Au  $VR = 1$ ,  $X_m$  vaut  $\sim 0,19 g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$  puis augmente progressivement jusqu'à  $\sim 0,38 g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$  au  $VR = 6$ . La modélisation prévoit la même tendance, avec les points expérimentaux moyens compris dans la limite de 20% d'erreur.

La **Figure 81 B** présente la consommation d'eau par grammes de peptides dans le perméat en fonction des VR. Au VR = 1, la consommation expérimentale démarre à  $\sim 0,5 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  puis diminue progressivement jusqu'à  $\sim 0,39 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  au VR = 6. La prédiction montre que la consommation est très élevée au tout début, presque de  $1 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$ , donc très peu de peptides sont transmis, mais cela change rapidement au cours de la moitié du premier VR où elle est de  $0,65 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$ , puis ce coût est amoindri progressivement en suivant la même tendance que l'expérimentation. La prédiction est donc valide.

La **Figure 81 C** présente l'index enzymatique en fonction des VR. La tendance des points expérimentaux est linéaire, jusqu'à  $\sim 262 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$  au VR = 6. La tendance de la prédiction est légèrement courbée à partir du VR = 4, mais reste très proche de la valeur expérimentale avec  $279 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$  au même VR. Les points de l'expérience restent ainsi dans la limite de l'erreur acceptable et valident la prédiction.

La **Figure 81 D** présente la productivité, la masse de peptides dans le perméat par heure de fonctionnement totale du REM en fonction des VR. La productivité expérimentale moyenne augmente de  $\sim 0,18 g_{Pep} \cdot h^{-1}$  au VR = 1 jusqu'à  $\sim 0,5 g_{Pep} \cdot h^{-1}$  au VR = 6. La prédiction suit la même tendance avec les points expérimentaux globalement dans la limite des 20% d'erreur acceptée.

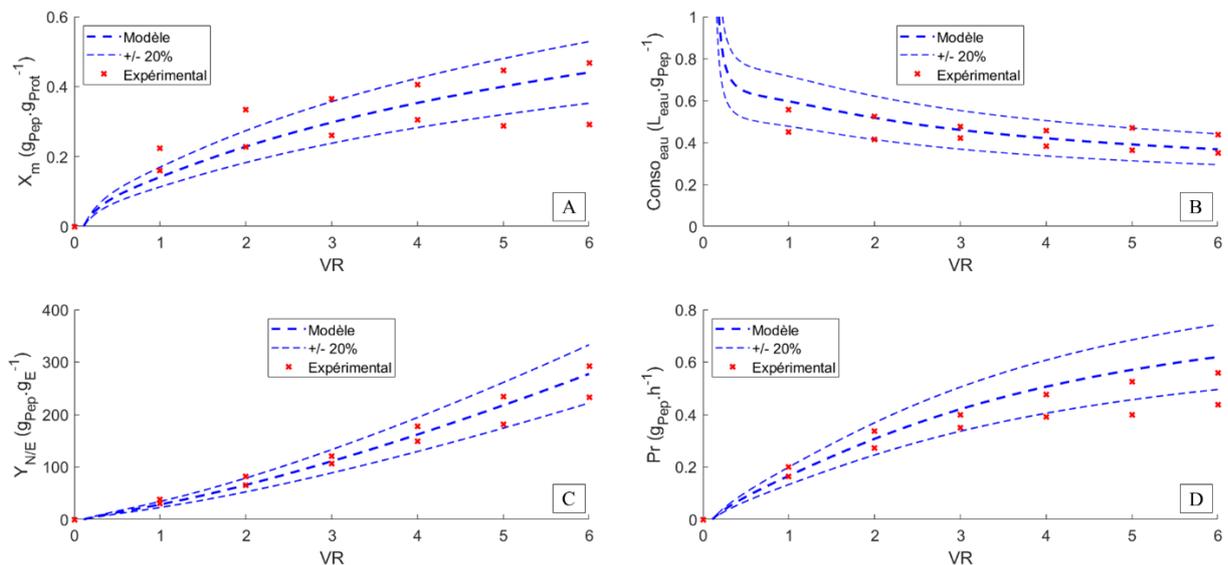


Figure 81 : Comparaisons des paramètres de caractérisation de l'expérience ( $nr = 2$ ) et de la modélisation du REM en fonctionnement à flux de perméat variable ( $55^\circ C$ , pH 3, E/S 1/170, PTM 2 bar, taux de cisaillement  $3000 s^{-1}$ ). (A) Conversion protéique des peptides totaux produits (perméat) par rapport aux protéines entrées (rétentat). (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du début de la pré-hydrolyse.

La **Figure 82 A** présente la modélisation et l'expérience correspondante pour le REM en fonctionnement à flux constant de l'évolution de la conversion protéique en fonction des VR. Au VR = 1,  $X_m$  vaut  $\sim 0,18 g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$  puis augmente progressivement jusqu'à  $\sim 0,36 g_{Pep} \cdot g_{Prot}^{-1}$  au VR = 6. Quasiment la même valeur est présente au VR = 5, indiquant plutôt une tendance stationnaire à partir de ce VR. La modélisation prévoit plutôt une augmentation, avec 0,46 au VR = 5 et 0,52 au VR = 6. Il faudrait donc prendre avec précaution la prédiction de ce critère pour ce mode de fonctionnement en sachant qu'il sera sans doute très surestimé.

La **Figure 82 B** présente la consommation d'eau par grammes de peptides dans le perméat en fonction des VR. Au VR = 1, la consommation expérimentale démarre à  $\sim 0,45 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  puis diminue très légèrement jusqu'à  $\sim 0,37 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  au VR = 6. La prédiction montre que la consommation est aussi très élevée au tout début, supérieure à  $1 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  au VR < 0,4 puis la consommation diminue progressivement jusqu'à  $0,71 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  au VR = 1, et  $0,53 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  au VR = 2. Ainsi, il n'y a que le point expérimental au VR = 1 qui n'est pas dans la limite des 20% d'erreur, mais pour la suite la prédiction représente assez bien la tendance de l'expérience, ce qui valide la modélisation. On peut aussi remarquer que pour le REM en mode à flux constant, la diminution de la consommation d'eau est plus progressive que pour le mode à flux variable. Ceci est lié directement au flux, qui en effet, diminue rapidement pendant le premier VR.

La **Figure 82 C** présente l'index enzymatique en fonction des VR. La tendance des points expérimentaux est linéaire, jusqu'à  $\sim 276 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$  au VR = 6. La tendance de la prédiction est légèrement un peu plus courbée à partir du VR = 3, mais reste très proche des valeurs expérimentales avec  $304 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$  au VR = 6. La prédiction est donc validée pour ce critère.

La **Figure 82 D** présente la productivité, la masse de peptides dans le perméat par heure de fonctionnement totale du REM en fonction des VR. La productivité expérimentale moyenne augmente de  $\sim 0,13 g_{Pep} \cdot h^{-1}$  au VR = 1 jusqu'à  $0,2 g_{Pep} \cdot h^{-1}$  au VR = 3, puis plus progressivement jusqu'à  $\sim 0,24 g_{Pep} \cdot h^{-1}$  au VR = 6. La prédiction a une tendance croissante aussi, mais plus élevée, avec  $0,31 g_{Pep} \cdot h^{-1}$  au VR = 6. Une surestimation pourrait être présente pour les VR supérieurs, mais globalement la prédiction est assez bonne et peut être validée.

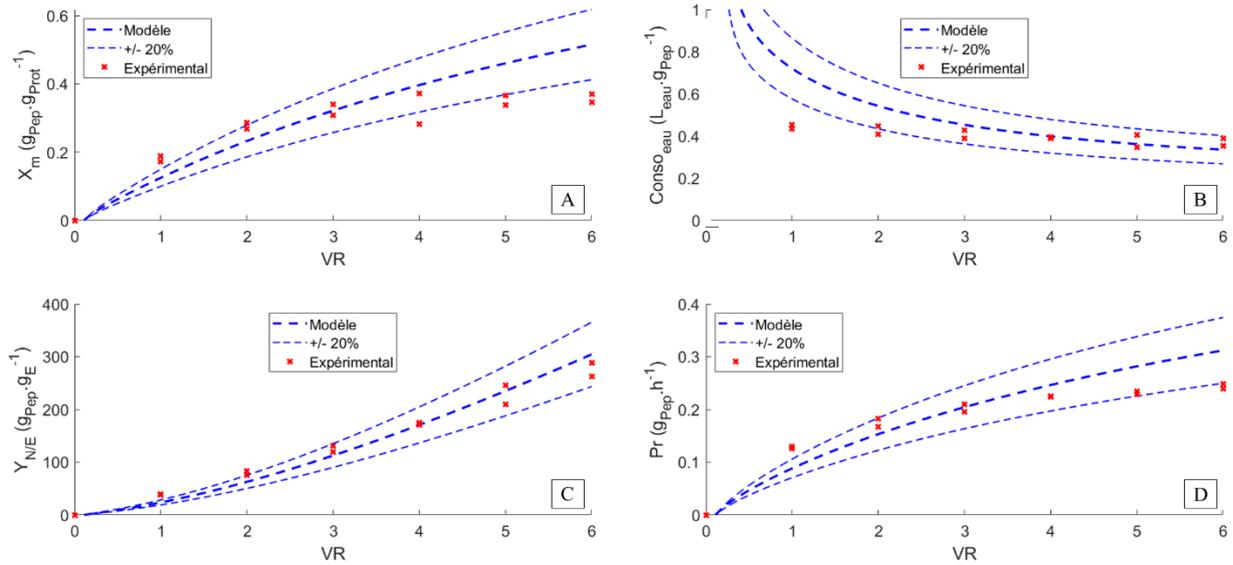


Figure 82 : Comparaisons des paramètres de caractérisation de l'expérience ( $nr = 2$ ) et de la modélisation du REM en fonctionnement à flux de perméat constant ( $55^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 3$ ,  $\text{E/S } 1/170$ , débit perméat  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , taux de cisaillement  $3000 \text{ s}^{-1}$ ). (A) Conversion protéique par les peptides totaux produits (perméat) par rapport aux protéines entrées (rétentat). (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du début de la pré-hydrolyse.

En conclusion, les modélisations des REM, basées sur les équations de bilan de masse sont valides dans l'ensemble pour la prédiction des concentrations (peptides dans le perméat, dans le rétentat, protéines dans le rétentat, flux de perméat et volume du perméat), mais aussi pour la prédiction des valeurs de caractérisations ( $X_m$ ,  $Conso_{eau}$ ,  $Y_{N/E}$  et  $Pr$ ), que ce soit dans un mode à flux variable ou constant. Des investigations peuvent ainsi être faites en simulant les fonctionnements dans d'autres conditions opératoires pour rechercher les paramètres du fonctionnement optimal à mettre en place.

### III.3.6. Simulations : exemple d'application sur la durée de pré-hydrolyse

Pour une démonstration de l'utilité de la simulation de REM, une variable va être modifiée afin de voir les conséquences sur les valeurs de caractérisations : la durée de la pré-hydrolyse. Les protéolyses en continu dans la littérature étaient mises en œuvre parfois avec une pré-hydrolyse : le REM fonctionnait en mode de recirculation totale pendant un certain temps, sans  $PTM$  appliquée, ce qui permettait à l'enzyme d'hydrolyser en avance les protéines. Cela donne plusieurs avantages pour des solutions très chargées : cela diminue la viscosité du rétentat en augmentant la proportion de peptides et ainsi de diminuer la  $PTM$  nécessaire pour avoir un même flux de perméat que sans pré-hydrolyse (Mišún *et al.* 2008). Cela permet de doubler l'index enzymatique, de diminuer l'encrassement irréversible de la membrane par un facteur 4, d'augmenter la conversion, et enfin d'augmenter la capacité de réacteur (Tauntong *et al.* 2014).

En fonction des solutions protéiques utilisées donc, il serait intéressant de savoir si une pré-hydrolyse est nécessaire, ou de déterminer quelle est la durée requise pour qu'une pré-hydrolyse ne prenne pas plus de temps que nécessaire et découle sur les valeurs des caractéristiques souhaitées.

La **Figure 83** présente ainsi le récapitulatif des simulations réalisées pour les deux modes de fonctionnement pour analyser les conséquences sur les grandeurs caractéristiques du REM en démarrant le soutirage en même temps que la pré-hydrolyse ( $t = 0$ ) et à la moitié ( $t = 25 \text{ min}$ ). Les deux étant comparés au cas initial, en fin de pré-hydrolyse ( $t = 50 \text{ min}$ ). La durée totale du processus est la même pour les trois simulations d'un mode (3,1 h pour le flux variable et 6,6 h pour le flux constant).

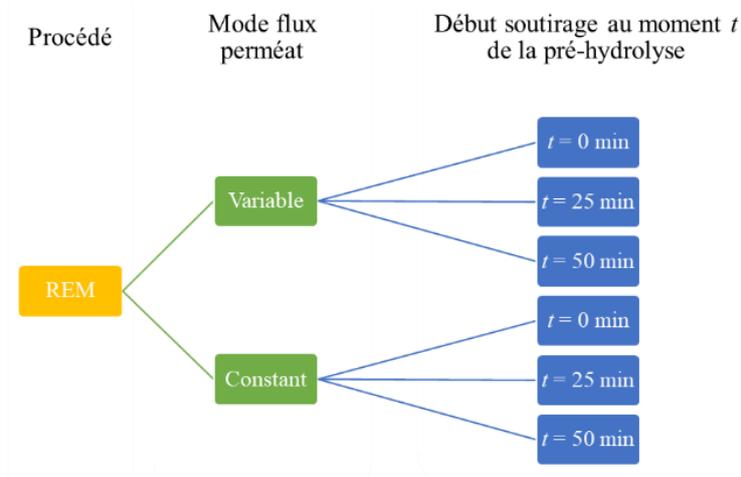


Figure 83 : Schéma explicatif des différentes simulations réalisées sur la durée de la pré-hydrolyse dans les deux modes de fonctionnement du REM.

La **Figure 84** représente les résultats des simulations pour le REM en fonctionnement à flux variable pour les trois modalités de pré-hydrolyse.

La **Figure 84 A** présente la conversion protéique ( $X_m$ ) en fonction des VR. La différence la plus notable concerne le soutirage en même temps que le début de l'hydrolyse, qui est un peu plus faible entre  $VR = 0$  et  $VR = 2$  que pour les autres durées. C'est ce qui pourrait être attendu étant donné que les protéines sont en grande quantité au début de l'hydrolyse, contrairement à la fin (44% à 30 min et 16% à 1 h). Cet écart s'efface avec le nombre de VR, indiquant que ce retard sur la  $X_m$  n'est pas significatif sur la durée totale du procédé si le nombre de VR est supérieur à 2. Une augmentation du temps de pré-hydrolyse présente très peu de différences : environ 4% entre les modalités du soutirage en fin de pré-hydrolyse et à mi-chemin de la pré-hydrolyse, et entre demie pré-hydrolyse et sans pré-hydrolyse.

La **Figure 84 B** présente la consommation d'eau par gramme de peptides en fonction des VR. La modalité de l'hydrolyse et du soutirage démarrés en même temps montre également une consommation d'eau plus élevée que les deux autres modalités, et elle est notablement plus élevée au cours du premier volume de remplacement (45% en moyenne). Ce qui est également attendu étant donné qu'il n'y avait pas autant de charge en peptides au début du soutirage que pour les autres modalités. A l'instar de la  $X_m$ , après le deuxième VR les différences ne sont plus significatives, avec  $0,35 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  pour le soutirage en fin de pré-hydrolyse au VR = 7, puis  $0,34 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  pour le soutirage à la demie pré-hydrolyse au VR = 8 et  $0,32 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  pour le soutirage sans pré-hydrolyse au VR = 9.

La **Figure 84 C** présente l'index enzymatique en fonction des VR. Il n'y a pas de différences sur ce critère jusqu'au VR = 7 pour les trois modalités ( $343 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$ ). Le soutirage des peptides produits serait alors assez similaire et la quantité soutirée serait de même grandeur que la modalité sans pré-hydrolyse. Au-delà en revanche, plus le nombre de VR est élevé, plus le rendement est élevé, avec 15% de plus pour un soutirage à la demie hydrolyse ( $407 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$ ) et 27% pour un soutirage dès le début de l'hydrolyse ( $470 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$ ). Ce qui est attendu dans le cas où l'enzyme resterait active, plus il y aura de peptides à soutirer, plus l'index serait élevé.

La **Figure 84 D** présente la productivité en fonction des VR et montre des écarts plus marqués entre les modalités. Dans ce cas-ci, c'est le début du soutirage en même temps que la pré-hydrolyse qui permet d'avoir le plus haut rendement en peptides dès le commencement. En effet, étant donné que les peptides produits sont tout de suite transférés, il y en aura plus par heure, même s'ils sont peu nombreux au départ. Puis, cette production est stable après le VR = 2 à hauteur de  $0,87 g_{Pep} \cdot h^{-1}$ . C'est 24% de plus que dans le cas où le soutirage est démarré une fois la pré-hydrolyse finie au VR = 7 ( $0,66 g_{Pep} \cdot h^{-1}$ ). Pour les deux autres cas, le soutirage en fin de pré-hydrolyse est le moins productif, car il n'y pas de production les 50 premières minutes, suivi du soutirage à la demie hydrolyse, avec 11% de peptides produits en plus ( $0,76 g_{Pep} \cdot h^{-1}$ ) et qui sont transférés pendant ces 25 minutes de soutirage plus tôt.

Enfin, une analyse d'évolution de toutes les modalités et caractéristiques montre que plus le soutirage commence tôt dans l'hydrolyse, plus de VR devront être réalisés. En fait, étant donné que le temps de l'hydrolyse est pris en compte dans la durée totale, la simulation met à profit ce temps pour réaliser des VR supplémentaires, avec 25 minutes par VR. Ainsi, on peut noter que plus de VR conduisent à des meilleures performances pour certaines caractéristiques ( $X_m$ ,  $Y_{N/E}$  et  $Pr$  pour les modalités de soutirage en fin et à mi-chemin de la pré-hydrolyse).

En conclusion, pour ce mode de fonctionnement à flux variable, il est plus intéressant de démarrer l'hydrolyse et le soutirage en même temps, juste après l'étape de mise en place de la couche de polarisation avec la suspension de protéines initiales. La conversion, et l'index enzymatiques seraient les mêmes, mais la consommation en eau et la productivité sont plus intéressantes, à condition de réaliser plus de 2 VR. Même si la viscosité est plus élevée dans ces conditions (35% plus élevé que pour l'hydrolysats dans le cas présent) la transmission des peptides au fur et à mesure de leur fabrication pourrait limiter l'encrassement.

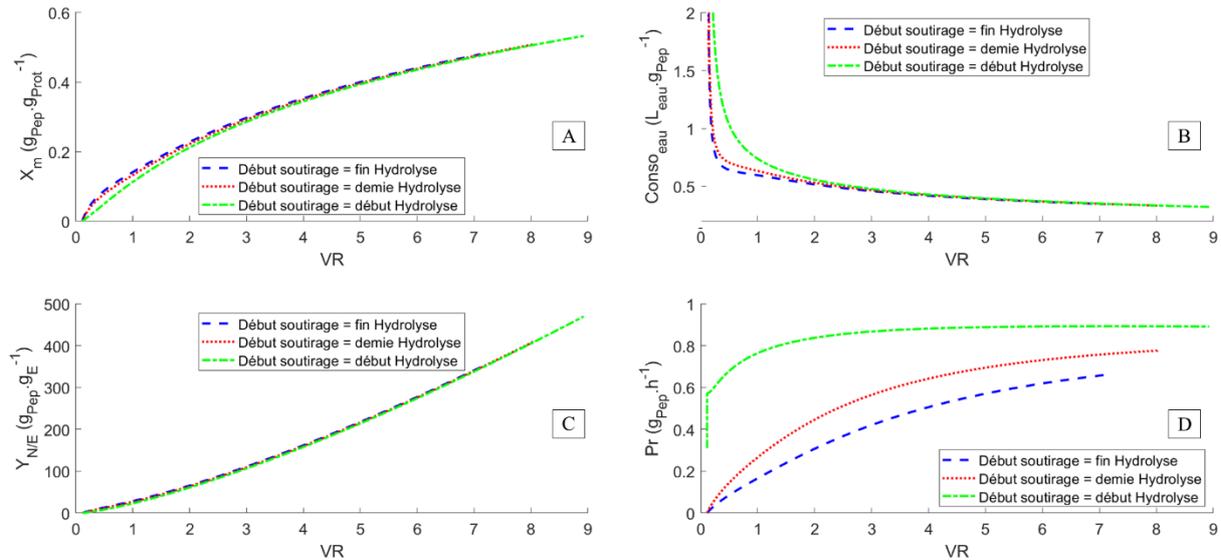


Figure 84 : Comparaisons des simulations d'enclenchement du soutirage à différents moments de la pré-hydrolyse pour le REM en fonctionnement à flux de perméat variable. (A) Conversion protéique des peptides totaux produits (perméat) par rapport aux protéines entrées (rétenant). (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du début de la pré-hydrolyse.

La Figure 84 présente les résultats des simulations pour le REM en fonctionnement à flux constant pour les trois modalités de pré-hydrolyse.

La Figure 85 A présente la conversion protéique ( $X_m$ ) en fonction des VR. Dans ce cas, il n'y a pas de différences significatives entre les trois modalités, sauf en fin du procédé où plus de VR sont réalisés, plus la conversion est élevée. Cette fois-ci, c'est un demi VR qui peut être réalisé en plus par 25 min au lieu de la pré-hydrolyse. Une augmentation d'un demi VR présente alors très peu de différences, avec  $0,56 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{g}_{Prot}^{-1}$  pour la modalité du soutirage en fin de pré-hydrolyse,  $0,58 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{g}_{Prot}^{-1}$  à mi-chemin de la pré-hydrolyse, et  $0,6 \text{ g}_{Pep} \cdot \text{g}_{Prot}^{-1}$  sans pré-hydrolyse.

La Figure 85 B présente la consommation d'eau par gramme de peptides en fonction des VR. Les écarts entre les modalités sont moins marqués jusqu'au VR = 2, avec 15% en moyenne

entre le soutirage débuté en début et en fin de pré-hydrolyse. Le faible flux constant permettrait ainsi d'avoir plus ou moins la même charge en peptides soutirés quel que soit le stade de la pré-hydrolyse. Puis, après le deuxième VR, les différences ne sont plus significatives, avec  $0,31 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  pour le soutirage en fin de pré-hydrolyse au VR = 7, puis  $0,30 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  pour le soutirage à la demie pré-hydrolyse au VR = 7,5 et  $0,3 L_{eau} \cdot g_{Pep}^{-1}$  pour le soutirage sans pré-hydrolyse au VR = 8.

La **Figure 85 C** présente l'index enzymatique en fonction des VR. Ce critère ne montre pas de différences jusqu'au VR = 7 pour les trois modalités ( $377 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$ ). Toutes les modalités ont donc la même la quantité de peptides soutirés. Puis les valeurs augmentent légèrement avec le nombre de VR avec  $419 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$  pour un soutirage à la demie pré-hydrolyse et  $459 g_{Pep} \cdot g_E^{-1}$  pour un soutirage dès le début de la pré-hydrolyse.

La **Figure 85 D** présente la productivité en fonction des VR et montre des écarts un peu plus marqués entre les modalités. Le début du soutirage en même temps que la pré-hydrolyse permet toujours d'avoir le plus haut rendement en peptides dès le commencement. Il représente, cependant, seulement 9% et 17% de gain de productivité par rapport au soutirage à mi-chemin et avec une pré-hydrolyse entière. Les tendances d'évolution sont les mêmes pour les trois modalités, avec une augmentation jusqu'à  $0,34 g_{Pep} \cdot h^{-1}$ , puis  $0,37 g_{Pep} \cdot h^{-1}$  et  $0,41 g_{Pep} \cdot h^{-1}$  pour la pré-hydrolyse entière, la demie pré-hydrolyse et sans pré-hydrolyse, respectivement.

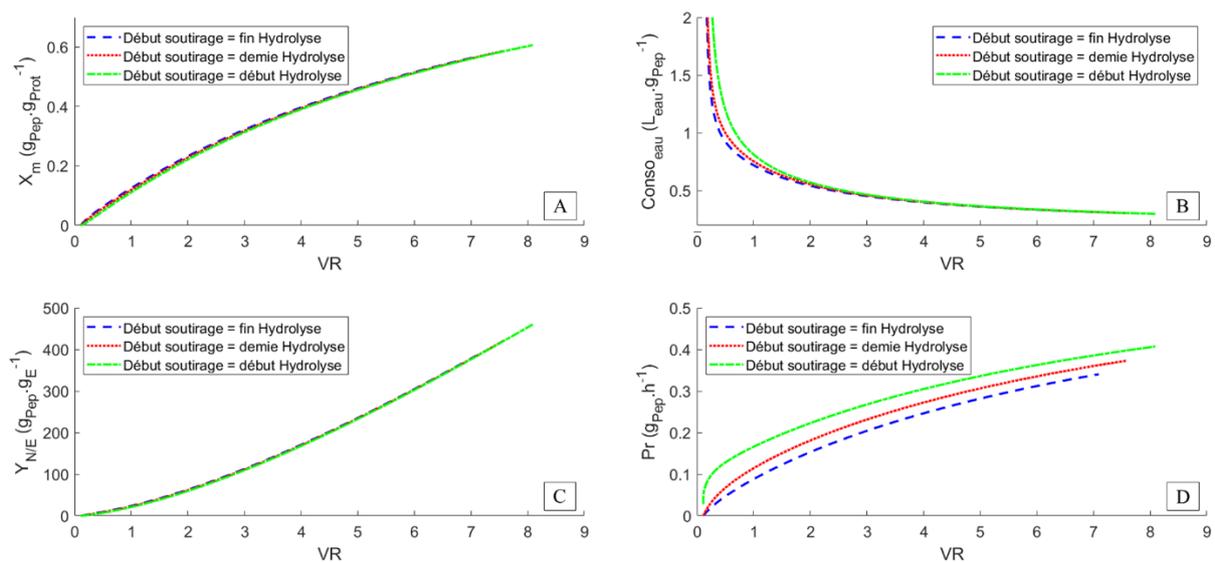


Figure 85 : Comparaisons des simulations d'enclenchement du soutirage à différents moments de la pré-hydrolyse pour le REM en fonctionnement à flux de perméat constant. (A) Conversion protéique des peptides totaux produits (perméat) par rapport aux protéines entrées (rétenant). (B) Consommation de litres d'eau par grammes de peptides produits (perméat). (C) Index enzymatique en peptides produits (perméat) par rapport à la quantité d'enzyme utilisée. (D) Production peptides (perméat) par heure, durée à partir du début de la pré-hydrolyse.

En conclusion pour le fonctionnement de REM à flux de perméat constant, la modalité d'un soutirage sans pré-hydrolyse semble aussi plus intéressant, car la conversion protéique et l'index enzymatique sont les mêmes, mais la consommation en eau est légèrement plus faible et la productivité est légèrement plus haute.

Pour finir, en comparant les caractéristiques sur les deux modes de fonctionnement de REM, à flux variables et flux constant : pour la modalité sans pré-hydrolyse, on remarque que la  $X_m$  est légèrement plus intéressant à flux constant,  $Y_{N/E}$  est légèrement plus intéressant pour le flux variable, la  $Conso_{eau}$  est légèrement plus intéressante à flux constant, mais la productivité est deux fois plus élevée à flux variable. En conséquence, le choix le plus pertinent dans le cas présent est un REM sans pré-hydrolyse avec un flux variable. Cela a déjà été observé pour les valeurs expérimentales, un flux élevé même décroissant dans le temps représente un gain non négligeable pour un procédé efficace (cf. §III.3.3. p.202 *R&D*). De plus, il serait 2,5 fois plus rapide donc potentiellement plus économique au niveau du gain du temps et de consommation d'énergie.

Finalement, ce type de simulation permettra de choisir les meilleurs paramètres de mise en œuvre d'un REM avant même de l'implémenter. Cela constituera un outil de choix dans le développement méthodique de production d'hydrolysats fonctionnels.

### **Conclusion de la partie « Simulation d'un REM »**

#### **➤ Objectif 1 : Etude du fonctionnement d'un REM**

- Rétention satisfaisante de l'enzyme par la membrane sélectionnée.
- Le REM est plus intéressant sur des critères de productivité et de coût enzymatique par rapport à des procédés discontinus hydrolyse en *batch* puis CD ou DF.
- Entre un REM en fonctionnement à flux de perméat variable et constant, le mode variable est deux fois plus productif et plus rapide.

#### **➤ Objectif 2 : Développement d'un outil de simulation de REM**

- Le modèle implémenté comprenant la partie d'hydrolyse protéique et la séparation membranaire est acceptable pour la simulation de la variation de masse dans les deux compartiments.
- Les paramètres de caractérisation ont également pu être modélisés avec une erreur acceptable de 20%.
- Des simulations ont pu être faites dans le cas où le soutirage de peptides commencerait à d'autres moments de la pré-hydrolyse et les résultats ont montré qu'un soutirage précoce amène à une meilleure productivité sans impacter négativement les autres critères.

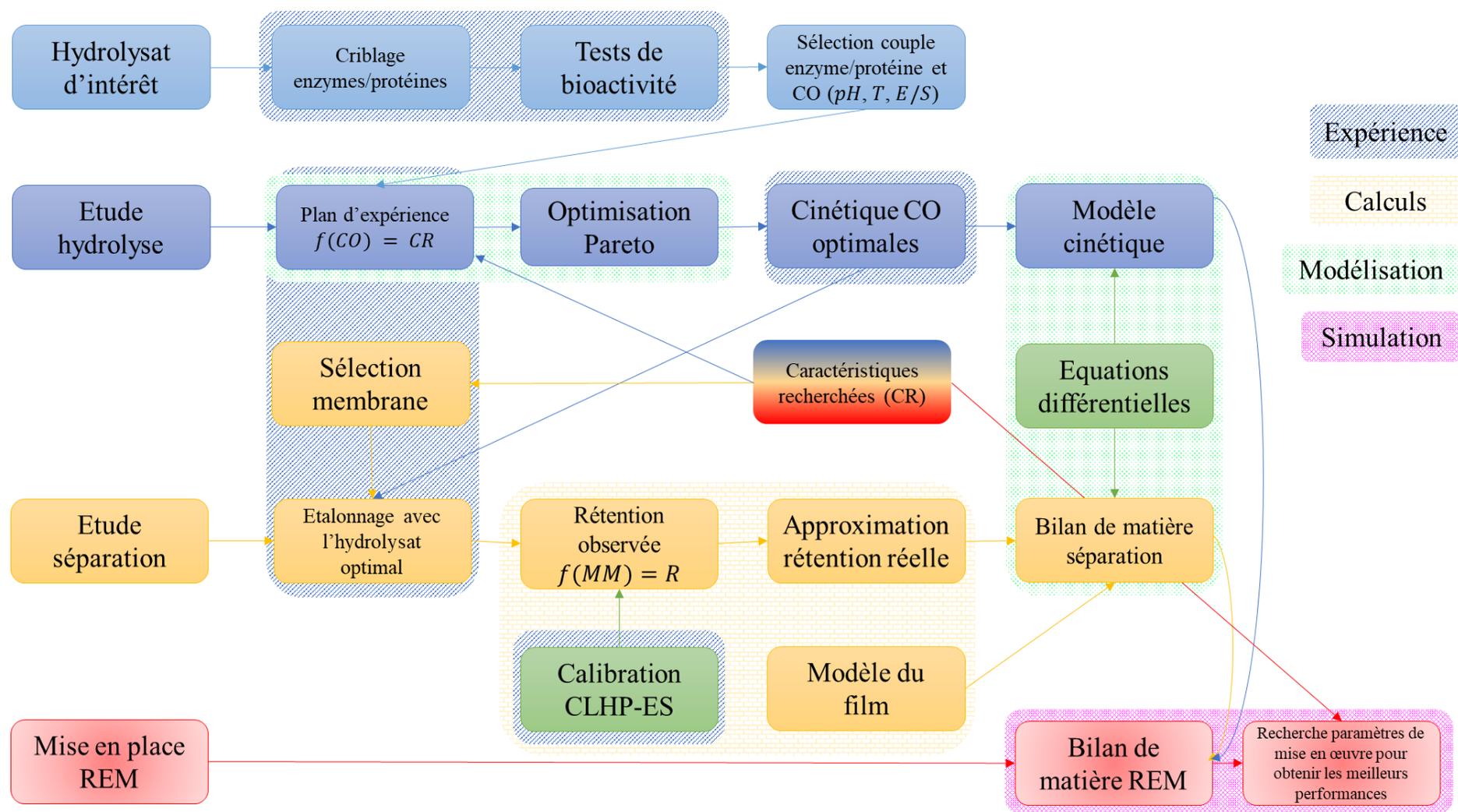


Figure 86 : Résumé de la méthodologie optimisée de mise en œuvre d'un REM pour la production d'un hydrolysate d'intérêt. CO : Conditions opératoires. CR : Caractéristiques recherchées. R = Rétention.

## Conclusion générale et perspectives

Pour rendre le procédé de production continue d'hydrolysats d'intérêt méthodique et attractif, une méthodologie a été développée pour déterminer les étapes de modélisation, optimisation et simulation.

Premièrement, une méthodologie de modélisation par plan d'expériences a été faite pour obtenir un modèle polynomial de la constante cinétique  $k_C$  qui peut prédire la concentration des protéines à chaque instant  $t$  de l'hydrolyse en fonction des conditions opératoires ( $pH$ ,  $T$ ,  $E/S$ ). Cette modélisation a été utilisée pour réaliser une optimisation sur des critères technico-économiques (quantité enzyme, temps) grâce au front de Pareto. Un jeu de conditions opératoires correspondant au point économique choisi a alors été défini comme l'*optimum* de l'hydrolyse : une pureté maximale de la napine pour une durée de l'hydrolyse médiane (2 h) et une quantité de l'enzyme relativement faible.

Pour la deuxième étape, la modélisation de l'hydrolyse a été étendue aux peptides. Un système d'équations a été défini pour modéliser la disparition de la protéine, l'apparition et la disparition des peptides intermédiaires et l'apparition des peptides finaux. Puis, ce modèle a été ajusté aux valeurs expérimentales de la cinétique d'hydrolyse de l'hydrolysats optimisé pour obtenir les constantes cinétiques. Ainsi, l'évolution de la répartition des molécules de l'hydrolysats pouvait être prédite à chaque instant de l'hydrolyse. Cette modélisation a été vérifiée sur une production de 2 L de l'hydrolysats optimisé.

La troisième étape consistait à optimiser la séparation de cet hydrolysats d'intérêt. Des membranes aux différents seuils de coupure et différentes conditions opératoires (vitesse de recirculation,  $PTM$ ) ont été criblées. Le jeu de conditions opératoires a été sélectionné de manière à obtenir les meilleures performances séparatives : rétention des protéines et enzymes, transmission des peptides maximale et flux de perméat maximal. Une modélisation basée sur le bilan de matière et la théorie du film a été appliquée aux rétentions mesurées et les concentrations initiales de tous les composants de l'hydrolysats (protéines, peptides). La modélisation a été validée en ultrafiltration : concentration discontinue et diafiltration.

La dernière étape consistait à coupler les modèles de cinétique de la protéolyse et de la séparation membranaire. La modélisation prenait ainsi en compte l'évolution de la répartition des molécules de l'hydrolysats due à l'hydrolyse enzymatique d'une part, et l'évolution des concentrations des molécules dans les compartiments rétentat et perméat d'autre part, tout en

prenant en compte l'ajout de nouvelles protéines dans le système. Cette modélisation est l'outil de simulation de REM, et a été validée en mettant en place deux modes de soutirage : un flux de perméat variable et un flux de perméat constant. Les modélisations ont ainsi été validées en comparant les valeurs modélisées et expérimentales (concentrations des molécules et valeurs caractéristiques de REM), qui présentaient globalement une erreur prédictive acceptable de  $\pm 20\%$ .

Cette méthodologie réduit considérablement la complexité de l'optimisation d'un REM en modélisant et optimisant les étapes d'hydrolyse et de séparation chacun de leur côté, puis en associant les équations de modélisations, découlant sur un modèle global de simulation d'un fonctionnement en continu fiable.

Les perspectives de ce travail se concentrent sur l'amélioration des modèles. Le modèle cinétique de protéolyse, notamment, qui pourrait être révisé sur la prédiction des peptides intermédiaires. Puis, cette méthodologie pourra être vérifiée et validée dans d'autres conditions d'hydrolyse et de systèmes d'hydrolysats. Le modèle pour le fractionnement membranaire pourrait être amélioré en additionnant des expériences pour déterminer les coefficients dépendant du module spécifique mis en œuvre.

Des simulations de REM sur d'autres critères pourront aussi être testées, en combinaison avec une optimisation économique au sens de Pareto, pour trouver une mise en œuvre optimale (comme une application de flux différents, des cycles de flux fixe/variable, un ajout d'eau, une différente concentration initiale, *etc.*). Ceci afin de tester l'outil de modélisation de manière exhaustive en changeant les paramètres d'entrée pour vérifier la possibilité de réguler le procédé avec une modélisation dynamique.

## Références bibliographiques

- Abdallah L.A.M. & Seoud A.-L.A. 2010. Determination of the Rate Constants for a Consecutive Second Order Irreversible Chemical Reaction Using MATLAB Toolbox. *European Journal of Scientific Research* 41: 412–419.
- Abdullah F.I., Chua L.S., Rahmat Z., Soontorngun N. & Somboon P. 2018. Trypsin Hydrolysed Protein Fractions as Radical Scavengers and Anti-bacterial Agents from *Ficus deltoidea*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 24: 279–290.
- Abu-Reesh I.M. 2000. Optimal design for CSTR's in series performing enzymatic lactose hydrolysis. *Bioprocess Engineering* 23: 709–713.
- Acumen Research and Consulting. 2022. Protein Ingredients Market - Global Industry Size, Share, Analysis, Trends and Forecast 2022 - 2030.
- Adhikari B.B., Chae M. & Bressler D.C. 2018. Utilization of Slaughterhouse Waste in Value-Added Applications: Recent Advances in the Development of Wood Adhesives. *Polymers* 10: 176.
- Adje E.Y., Balti R., Lecouturier D., Kouach M., Dhulster P., Guillochon D. & Nedjar-Arroume N. 2013. Controlled Enzymatic Hydrolysis: A New Strategy for the Discovery of Antimicrobial Peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 5: 176–186.
- Adler-Nissen J. 1976. Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 1090–1093.
- Adler-Nissen J. 1984. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology* 34: 215–222.
- Adler-Nissen J., Eriksen S. & Olsen H.S. 1983. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition* 32: 411–423.
- Adler-Nissen J. & Olsen H.S. 1979. The Influence of Peptide Chain Length on Taste and Functional Properties of Enzymatically Modified Soy Protein. In: Pour-El A. (ed.), *Functionality and Protein Structure*, American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 125–146.
- Adu-Amankwa B. & Constantinides A. 1984. Mathematical modeling of diffusion and reaction in the hydrolysis of vegetable protein in an immobilized enzyme recycle reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 156–166.
- Adu-Amankwa B., Constantinides A. & Vieth W. 1981. Enzymatic modification of vegetable protein, Immobilization of *Penicillium duponti* enzyme on reconstituted collagen and the use of the immobilized-enzyme complex for solubilizing vegetable protein in a recycle reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 2609–2627.
- Afnor NF X 45-103. 1997. *Filtration des liquides - Membrane poreuses - Taux de rétention des mebranes d'ultrafiltration et de nanofiltration. Annulée le 08-12-2017.*

- Agard N.J., Mahrus S., Trinidad J.C., Lynn A., Burlingame A.L. & Wells J.A. 2012. Global kinetic analysis of proteolysis via quantitative targeted proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 1913–1918.
- Agrawal H., Joshi R. & Gupta M. 2016. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. *Food Chemistry* 204: 365–372.
- Aguirre L., Garro M.S. & Savoy de Giori G. 2008. Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria. *Food Chemistry* 111: 976–982.
- Aguirre Montesdeoca V., Van der Padt A., Boom R.M. & Janssen A.E.M. 2016. Modelling of membrane cascades for the purification of oligosaccharides. *Journal of Membrane Science* 520: 712–722.
- Agyei D., Ongkudon C.M., Wei C.Y., Chan A.S. & Danquah M.K. 2016. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing* 98: 244–256.
- Ahmad A.L., Chong M.F. & Bhatia S. 2006. Ultrafiltration modeling of multiple solutes system for continuous cross-flow process. *Chemical Engineering Science* 61: 5057–5069.
- Ahn J., Cao M.-J., Yu Y.Q. & Engen J.R. 2013. Accessing the Reproducibility and Specificity of Pepsin and other Aspartic Proteases. *Biochimica et biophysica acta* 1834: 1222–1229.
- Aimar P. 2006. Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Mise en œuvre et performances. *Techniques de l'Ingénieur* J2793 V1: 18.
- Aimar P., Bacchin P. & Maurel A. 2010a. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : mécanismes de transfert. *Techniques de l'Ingénieur* J2789 V1: 29.
- Aimar P., Bacchin P. & Maurel A. 2010b. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : perméabilité et sélectivité. *Techniques de l'Ingénieur* J2790 V3: 25.
- Aimar P. & Daufin G. 2004. Séparations par membrane dans l'industrie alimentaire. *Techniques de l'Ingénieur* F3250 V1: 26.
- Aimar P. & Meireles M. 2010. Calibration of ultrafiltration membranes against size exclusion chromatography columns. *Journal of Membrane Science* 346: 233–239.
- Alashi A.M., Blanchard C.L., Mailer R.J., Agboola S.O., Mawson J.A. & Aluko R.E. 2018. Influence of enzymatic hydrolysis, pH and storage temperature on the emulsifying properties of canola protein isolate and hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology* 53: 2316–2324.
- Alashi A.M., Blanchard C.L., Mailer R.J., Agboola S.O., Mawson A.J., He R., Girgih A. & Aluko R.E. 2014a. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry* 146: 500–506.
- Alashi A.M., Blanchard C.L., Mailer R.J., Agboola S.O., Mawson A.J., He R., Malomo S.A., Girgih A.T. & Aluko R.E. 2014b. Blood pressure lowering effects of Australian canola

- protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International* 55: 281–287.
- Albenzio M., Santillo A., Caroprese M., Della Malva A. & Marino R. 2017. Bioactive Peptides in Animal Food Products. *Foods* 6: 35.
- Al-Mardeai S., Elnajjar E., Hashaikeh R., Kruczek B., Van der Bruggen B. & Al-Zuhair S. 2022a. Simultaneous Enzymatic Cellulose Hydrolysis and Product Separation in a Radial-Flow Membrane Bioreactor. *Molecules* 27: 288.
- Al-Mardeai S., Elnajjar E., Hashaikeh R., Kruczek B., Van der Bruggen B. & Al-Zuhair S. 2022b. Membrane Bioreactors: A Promising Approach to Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Catalysts* 12: 1121.
- Al-Mutwalli S.A., Dilaver M. & Koseoglu-Imer D.Y. 2020. Performance Evaluation of Ceramic Membrane on Ultrafiltration and Diafiltration Modes for Efficient Recovery of Whey Protein. *Journal of Membrane Science and Research* 6: 138–146.
- Alvarez L.A. & Odloak D. 2012. Optimization and control of a continuous polymerization reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 29: 807–820.
- Andrade T.A., Martín M., Errico M. & Christensen K.V. 2019. Biodiesel production catalyzed by liquid and immobilized enzymes: Optimization and economic analysis. *Chemical Engineering Research and Design* 141: 1–14.
- Andre J. 2015. Immobilization of trypsin for peptide synthesis and hydrolysis reactions. Karlsruhe Institut für Technologie, Odessa: 122.
- Angelovičová M. & Angelovič M. 2013. Rapeseed Cakes as an Important Feed Raw Material for Laying Hens. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*.
- ANSES, Mortensen A., Aguilar F., Crebelli R., Di Domenico A., Dusemund B., Frutos M.J., Galtier P., Gott D., Gundert-Remy U., Lambré C., Leblanc J., Lindtner O., Moldeus P., Mosesso P., Oskarsson A., Parent-Massin D., Stankovic I., Waalkens-Berendsen I., Woutersen R.A., Wright M., Brandt P. van den, Fortes C., Merino L., Toldrà F., Arcella D., Christodoulidou A., Barrucci F., Garcia A., Pizzo F., Battacchi D. & Younes M. 2017. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA Journal* 15.
- Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M. & Güçlü K. 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 85: 957–998.
- Araujo J., Sica P., Costa C. & Márquez M.C. 2020. Enzymatic Hydrolysis of Fish Waste as an Alternative to Produce High Value-Added Products. *Waste and Biomass Valorization*.
- Archer M.C., Ragnarsson J.O., Tannenbaum S.R. & Wang D.I.C. 1973. Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: Process and kinetic considerations. *Biotechnology and Bioengineering* 15: 181–196.

- Arunkumar A. & Etzel M.R. 2014. Fractionation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin from bovine milk serum using staged, positively charged, tangential flow ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 454: 488–495.
- Aruoma O.I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 32: 671–683.
- Asbi B.A. & Cheryan M. 1992. Optimizing process time for ultrafiltration and diafiltration. *Desalination* 86: 49–62.
- Ashaolu T.J. 2020. Antioxidative peptides derived from plants for human nutrition: their production, mechanisms and applications. *European Food Research and Technology* 246: 853–865.
- Aubel G. van, Cambier P., Dieu M. & Van Cutsem P. 2016. Plant immunity induced by COS-OGA elicitor is a cumulative process that involves salicylic acid. *Plant Science* 247: 60–70.
- Azhari R. & Lotan N. 1991. Enzymic hydrolysis of biopolymers via single-scission attack pathways: a unified kinetic model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2: 9–18.
- Babini E., Tagliacruzchi D., Martini S., Dei Più L. & Gianotti A. 2017. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. *Food Chemistry* 228: 186–196.
- Bacchin P. 1994. Formation et résistance au transfert d'un dépôt de colloïdes sur une membrane d'ultrafiltration. Université Paul Sabatier, Toulouse: 194.
- Bak K.H., Waehrens S.S., Fu Y., Chow C.Y., Petersen M.A., Ruiz-Carrascal J., Bredie W.L.P. & Lametsch R. 2021. Flavor Characterization of Animal Hydrolysates and Potential of Glucosamine in Flavor Modulation. *Foods* 10: 3008.
- Bakhshayeshi M., Teella A., Zhou H., Olsen C., Yuan W. & Zydney A.L. 2012. Development of an optimized dextran retention test for large pore size hollow fiber ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science* 421–422: 32–38.
- Baldasso C., Barros T.C. & Tessaro I.C. 2011. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination* 278: 381–386.
- Banerjee S. & Bhattacharya S. 2012. Food Gels: Gelling Process and New Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 334–346.
- Barba D., Beolchini F., Cifoni D. & Veglió F. 2001. Whey protein concentrate production in a pilot scale two-stage diafiltration process. *Separation Science and Technology* 36: 587–603.
- Barca A.M.C.D.L., Wall A. & López-Díaz J.A. 2005. Allergenicity, trypsin inhibitor activity and nutritive quality of enzymatically modified soy proteins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56: 203–211.

- Barjoveanu G. & Teodosiu C. 2010. Modeling and simulation of an ultrafiltration process for the removal of suspended solids and colloids from wastewater. *Environmental Engineering and Management Journal* 9: 361–371.
- Bassan J.C., Goulart A.J., Nasser A.L.M., Bezerra T.M.S., Garrido S.S., Rustiguel C.B., Guimarães L.H.S. & Monti R. 2015. Buffalo Cheese Whey Proteins, Identification of a 24 kDa Protein and Characterization of Their Hydrolysates: In Vitro Gastrointestinal Digestion. *PLoS ONE* 10.
- Bayramoğlu G., Yilmaz M. & Arica M.Y. 2004. Immobilization of a thermostable  $\alpha$ -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. *Food Chemistry* 84: 591–599.
- Beaubier S. 2019. Amélioration de la digestibilité et maintien des propriétés fonctionnelles d'un isolat d'albumines de colza par protéolyse enzymatique : identification d'hydrolysats d'intérêt et optimisation de leur production. Université de Lorraine, Nancy: 220.
- Beaubier S., Framboisier X., Fournier F., Galet O. & Kapel R. 2021a. A new approach for modelling and optimizing batch enzymatic proteolysis. *Chemical Engineering Journal* 405: 126871.
- Beaubier S., Framboisier X., Ioannou I., Galet O. & Kapel R. 2019a. Simultaneous quantification of the degree of hydrolysis, protein conversion rate and mean molar weight of peptides released in the course of enzymatic proteolysis. *Journal of Chromatography B* 1105: 1–9.
- Beaubier S., Framboisier X., Ioannou I., Galet O. & Kapel R. 2019b. Simultaneous quantification of the degree of hydrolysis, protein conversion rate and mean molar weight of peptides released in the course of enzymatic proteolysis. *Journal of Chromatography B* 1105: 1–9.
- Beaubier S., Pineda-Vadillo C., Mesieres O., Framboisier X., Galet O. & Kapel R. 2023. Improving the in vitro digestibility of rapeseed albumins resistant to gastrointestinal proteolysis while preserving the functional properties using enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry* 407: 135132.
- Beaubier S., Przybylski R., Bodin A., Nedjar N., Dhulster P. & Kapel R. 2021b. Ultrafiltration Fractionation of Bovine Hemoglobin Hydrolysates: Prediction of Separation Performances for Optimal Enrichment in Antimicrobial Peptide. *Membranes* 11: 73.
- Bechinger B. & Gorr S.-U. 2017. Antimicrobial Peptides. *Journal of Dental Research* 96: 254–260.
- Bélafi-Bakó K., Koutinas A., Nemestóthy N., Gubicza L. & Webb C. 2006. Continuous enzymatic cellulose hydrolysis in a tubular membrane bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 155–161.
- Belegundu A.D. & Chandrupatla T.R. 2019. *Optimization Concepts and Applications in Engineering*. Cambridge University Press.

- Belhocine D., Mokrane H., Grib H., Lounici H., Pauss A. & Mameri N. 2000. Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor. *Chemical Engineering Journal* 76: 189–196.
- Berends P., Appel D., Eisele T., Rabe S. & Fischer L. 2014. Performance of enzymatic wheat gluten hydrolysis in batch and continuous processes using Flavourzyme. *LWT - Food Science and Technology* 58: 534–540.
- Berends P., Merz M., Kranz B., Thaler T., Appel D., Rabe S., Blank I., Stressler T. & Fischer L. 2016. Optimization of an enzymatic wheat gluten hydrolysis process in an enzyme membrane reactor using a design of experiment approach. *European Food Research and Technology* 242: 1735–1746.
- Bhattacharjee C. & Bhattacharya P.K. 1992. Prediction of limiting flux in ultrafiltration of kraft black liquor. *Journal of Membrane Science* 72: 137–147.
- Bhattacharjee C. & Datta S. 1996. Analysis of mass transfer during ultrafiltration of PEG-6000 in a continuous stirred cell: effect of back transport. *Journal of Membrane Science* 119: 39–46.
- Bhattacharjee C. & Datta S. 1997. A mass transfer model for the prediction of rejection and flux during ultrafiltration of PEG-6000. *Journal of Membrane Science* 125: 303–310.
- Bhattacharjee S., Sharma A. & Bhattacharya P.K. 1996. A unified model for flux prediction during batch cell ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* 111: 243–258.
- Bhumiratana S., Hill Jr. C.G. & Amundson C.H. 1977. Enzymatic Solubilization of Fish Protein Concentrate in Membrane Reactors. *Journal of Food Science* 42: 1016–1021.
- Bisswanger H. 2011. *Practical enzymology*. Wiley-Blackwell, Weinheim.
- Bisswanger H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science* 1: 41–55.
- Blanco M., Vázquez J.A., Pérez-Martín R.I. & Sotelo C.G. 2017. Hydrolysates of Fish Skin Collagen: An Opportunity for Valorizing Fish Industry Byproducts. *Marine Drugs* 15: 131.
- Bodin A. 2016. Stratégie de modélisation et d'optimisation des performances de l'ultrafiltration pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques. Université de Lorraine, Nancy: 188.
- Bodin A., Framboisier X., Alonso D., Marc I. & Kapel R. 2015. Size-exclusion HPLC as a sensitive and calibrationless method for complex peptide mixtures quantification. *Journal of Chromatography B* 1006: 71–79.
- Bodmann K. & Marti R. 2015. 12. Freiburger Symposium 2015: Smart Solutions in the Chemical Process & Product Development – Case Studies from the Chemical Industry: Conference Report. *CHIMIA* 69: 698.
- Bordenave S., Sannier F., Piot J.M. & Ricart G. 1999. Continuous Hydrolysis of Goat Whey in an Ultrafiltration Reactor: Generation of Alpha-Lactorphin. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 29: 189–202.

- Borrajo P., Pateiro M., Gagaoua M., Franco D., Zhang W. & Lorenzo J.M. 2020. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Porcine Liver Protein Hydrolysates Obtained Using Alcalase, Bromelain, and Papain. *Applied Sciences* 10: 2290.
- Boudrant J. & Cheftel C. 1976. Continuous proteolysis with a stabilized protease. II. Continuous experiments. *Biotechnology and Bioengineering* 18: 1735–1749.
- Boudreau J.C. (ed.). 1979. Bitterness of Peptides: Amino Acid Composition and Chain Length. In: *Food Taste Chemistry*, American chemical society, Washington, D. C., pp. 149–17.
- Bouhallab S., Mollé D. & Léonil J. 1992. Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: Preparation of bioactive peptides. *Biotechnology Letters* 14: 805–810.
- Bouhallab S., Mollé D. & Léonil J. 1993. Continuous hydrolysis of beta-casein in a membrane reactor: Preparation of bioactive peptide. *Biotechnology Letters* 15: 7.
- Bouhallab S. & Touzé C. 1995. Continuous hydrolysis of caseinomacropeptide in a membrane reactor: kinetic study and gram-scale production of antithrombotic peptides. *Le Lait* 75: 251–258.
- Boukil A., Perreault V., Chamberland J., Mezdoor S., Pouliot Y. & Doyen A. 2020. High Hydrostatic Pressure-Assisted Enzymatic Hydrolysis Affect Mealworm Allergenic Proteins. *Molecules* 25: 2685.
- Bourseau P., Vandanjon L., Jaouen P., Chaplain-Derouiniot M., Massé A., Guérard F., Chabeaud A., Fouchereau-Péron M., Gal Y.L. & Ravallec-Plé R. 2009. Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *Desalination*: 18.
- Bradbury R.H. 1904. Fermentation without yeast cells: A résumé of Buchner's Work. *Journal of the Franklin Institute* 157: 41–52.
- Bressollier P., Petit J.M. & Julien R. 1988. Enzyme hydrolysis of plasma proteins in a CSTR ultrafiltration reactor: Performances and modeling. *Biotechnology and Bioengineering* 31: 650–658.
- Brião V.B. & Tavares C.R.G. 2012. Pore blocking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 29: 393–407.
- Brown É. & Biellmann J.-F. 1992. Catalyse enzymatique. *Techniques de l'Ingénieur* J1240 V1: 16.
- Butré C.I., Sforza S., Gruppen H. & Wierenga P.A. 2014. Introducing enzyme selectivity: a quantitative parameter to describe enzymatic protein hydrolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406: 5827–5841.
- Butré C.I., Wierenga P.A. & Gruppen H. 2012. Effects of Ionic Strength on the Enzymatic Hydrolysis of Diluted and Concentrated Whey Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 5644–5651.

- Caessens P.W.J.R. 1999. Enzymatic hydrolysis of [beta]-casein and [beta]-lactoglobulin: foam and emulsion properties of peptides in relation to their molecular structure. In: *Enzymatic hydrolysis of [beta]-casein and [beta]-lactoglobulin: foam and emulsion properties of peptides in relation to their molecular structure*, Wageningen, p. 133.
- Caetano-Silva M.E., Bertoldo-Pacheco M.T., Paes-Leme A.F. & Netto F.M. 2015. Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS. *Food Research International* 71: 132–139.
- Carić M.Đ., Milanović S.D., Krstić D.M. & Tekić M.N. 2000. Fouling of inorganic membranes by adsorption of whey proteins. *Journal of Membrane Science* 165: 83–88.
- Carrasco-Castilla J., Hernández-Álvarez A.J., Jiménez-Martínez C., Jacinto-Hernández C., Alaiz M., Girón-Calle J., Vioque J. & Dávila-Ortiz G. 2012. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chemistry* 135: 1789–1795.
- Carré P. & Pouzet A. 2014. Rapeseed market, worldwide and in Europe. *OCL* 21: D102.
- Carré P., Quinsac A., Citeau M. & Fine F. 2015. A re-examination of the technical feasibility and economic viability of rapeseed dehulling. *OCL* 22: D304.
- Castro R.J.S. de & Sato H.H. 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International* 74: 185–198.
- Causserand C. 2006. Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Caractérisation des membranes. *Techniques de l'Ingénieur J2792 V1*: 19.
- Cen Y.-K., Liu Y.-X., Xue Y.-P. & Zheng Y.-G. 2019. Immobilization of Enzymes in/on Membranes and their Applications. *Advanced Synthesis & Catalysis* 361: 5500–5515.
- Chabanon G., Chevalot I., Framboisier X., Chenu S. & Marc I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry* 42: 1419–1428.
- Chabeaud A., Dutournié P., Guérard F., Vandanjon L. & Bourseau P. 2009a. Application of Response Surface Methodology to Optimise the Antioxidant Activity of a Saithe (*Pollachius virens*) Hydrolysate. *Marine Biotechnology* 11: 445–455.
- Chabeaud A., Vandanjon L., Bourseau P., Jaouen P., Chaplain-Derouiniot M. & Guérard F. 2009b. Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and Purification Technology* 66: 463–471.
- Chabeaud A., Vandanjon L., Bourseau P., Jaouen P. & Guérard F. 2009c. Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolysate (*Pollachius virens*): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances. *Journal of Food Engineering* 91: 408–414.
- Chakrabarti S., Guha S. & Majumder K. 2018. Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients* 10: 1738.

- Chalamaiah M., Dinesh kumar B., Hemalatha R. & Jyothirmayi T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry* 135: 3020–3038.
- Chalhoub B., Denoeud F., Liu S., Parkin I.A.P., Tang H., Wang X., Chiquet J., Belcram H., Tong C., Samans B., Corréa M., Silva C.D., Just J., Falentin C., Koh C.S., Clainche I.L., Bernard M., Bento P., Noel B., Labadie K., Alberti A., Charles M., Arnaud D., Guo H., Daviaud C., Alamery S., Jabbari K., Zhao M., Edger P.P., Chelaifa H., Tack D., Lassalle G., Mestiri I., Schnel N., Paslier M.-C.L., Fan G., Renault V., Bayer P.E., Golicz A.A., Manoli S., Lee T.-H., Thi V.H.D., Chalabi S., Hu Q., Fan C., Tollenaere R., Lu Y., Battail C., Shen J., Sidebottom C.H.D., Wang X., Canaguier A., Chauveau A., Bérard A., Deniot G., Guan M., Liu Z., Sun F., Lim Y.P., Lyons E., Town C.D., Bancroft I., Wang X., Meng J., Ma J., Pires J.C., King G.J., Brunel D., Delourme R., Renard M., Aury J.-M., Adams K.L., Batley J., Snowdon R.J., Tost J., Edwards D., Zhou Y., Hua W., Sharpe A.G., Paterson A.H., Guan C. & Wincker P. 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345: 950–953.
- Charton M. & Charton B.I. 1982. The structural dependence of amino acid hydrophobicity parameters. *Journal of Theoretical Biology* 99: 629–644.
- Cheison S.C., Bor E.K., Faraj A.K. & Kulozik U. 2012. Selective hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin by Acid Protease A offers potential for  $\beta$ -lactoglobulin purification in whey proteins. *LWT* 49: 117–122.
- Cheison S.C., Leeb E., Toro-Sierra J. & Kulozik U. 2011. Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native alpha-lactalbumin. *International Dairy Journal* 21: 166–171.
- Cheison S.C., Wang Z. & Xu S.-Y. 2007a. Preparation of Whey Protein Hydrolysates Using a Single- and Two-Stage Enzymatic Membrane Reactor and Their Immunological and Antioxidant Properties: Characterization by Multivariate Data Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3896–3904.
- Cheison S.C., Wang Z. & Xu S.-Y. 2007b. Preparation of Whey Protein Hydrolysates Using a Single- and Two-Stage Enzymatic Membrane Reactor and Their Immunological and Antioxidant Properties: Characterization by Multivariate Data Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3896–3904.
- Cherkasov A.N. 1990. Selective ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* 50: 109–130.
- Cheryan M. 1977. Mass Transfer Characteristics of Hollow Fiber Ultrafiltration of Soy Protein Systems. *Journal of Food Process Engineering* 1: 269–287.
- Cheryan M. & Deeslie W.D. 1980. Production of Protein Hydrolyzates in Ultrafiltration-Enzyme Reactors. In: Cooper A.R. (ed.), *Ultrafiltration Membranes and Applications*, Springer US, Boston, MA, pp. 591–601.
- Cheryan M. & Deeslie D.W. 1983. Soy protein hydrolysis in membrane reactors. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 60: 1112–1115.

- Chi C.-F., Wang B., Wang Y.-M., Zhang B. & Deng S.-G. 2015. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of Functional Foods* 12: 1–10.
- Chiang W.-D., Cordle C.T. & Thomas R.L. 1995. Casein Hydrolysate Produced Using a Formed-in-Place Membrane Reactor. *Journal of Food Science* 60: 1349–1352.
- Chiang W.-D., Shih C.-J. & Chu Y.-H. 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chemistry* 65: 189–194.
- Chiang W.-D., Tsou M.-J., Tsai Z.-Y. & Tsai T.-C. 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. *Food Chemistry* 98: 725–732.
- Chobert J.M., Bertrand-Harb C. & Nicolas M.G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 883.
- Choi B., Rempala G.A. & Kim J.K. 2017. Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Scientific Reports* 7: 17018.
- Cian R.E., Garzón A.G., Ancona D.B., Guerrero L.C. & Drago S.R. 2016. Chelating Properties of Peptides from Red Seaweed *Pyropia columbina* and Its Effect on Iron Bio-Availability. *Plant Foods for Human Nutrition* 71: 96–101.
- Clementz A.L., Manuale D., Sanchez E., Vera C. & Yori J.C. 2019. Use of discards of bovine bone, yeast and carrots for producing second generation bio-ethanol. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 22: 101392.
- Cole K.P. & Johnson M.D. 2018. Continuous flow technology vs. the batch-by-batch approach to produce pharmaceutical compounds. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 11: 5–13.
- Combe C., Guizard C., Aimar P. & Sanchez V. 1997. Experimental determination of four characteristics used to predict the retention of a ceramic nanofiltration membrane. *Journal of Membrane Science* 129: 147–160.
- Contreras M. del M., Hernández-Ledesma B., Amigo L., Martín-Álvarez P.J. & Recio I. 2011. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* 44: 9–15.
- Corbatón-Báguena M.-J., Álvarez-Blanco S. & Vincent-Vela M.-C. 2015. Fouling mechanisms of ultrafiltration membranes fouled with whey model solutions. *Desalination* 360: 87–96.
- Cordle C.T., Mahmoud M.I. & Moore V. 1991. Immunogenicity Evaluation of Protein Hydrolysates for Hypoallergenic Infant Formulae. 13: 270–276.
- Cornish-Bowden A., Jamin M. & Saks V. 2005. *Cinétique enzymatique*. EDP Sciences.

- Costandy J.G., Edgar T.F. & Baldea M. 2019. Switching from Batch to Continuous Reactors Is a Trajectory Optimization Problem. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 58: 13718–13736.
- Cowan R. & Whittaker G. 1990. Hydrophobicity: Indices for Amino Acid Residues as Determined by High-Performance Liquid Chromatography. *Peptide Research* 3.
- Cui Z.F., Jiang Y. & Field R.W. 2010. Fundamentals of Pressure-Driven Membrane Separation Processes. In: *Membrane Technology*, Elsevier, pp. 1–18.
- Cui J., Kong X., Hua Y., Zhou H. & Liu Q. 2011. Continuous hydrolysis of modified wheat gluten in an enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 2799–2805.
- Dalgalarondo M., Robin J.-M. & Azanza J.-L. 1986. Subunit composition of the globulin fraction of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Science* 43: 115–124.
- Daliri E.B.-M., Oh D.H. & Lee B.H. 2017. Bioactive Peptides. *Foods* 6.
- Darby R. 2001. *Chemical Engineering Fluid Mechanics, Revised and Expanded*. Taylor & Francis.
- Das R., Ghosh S. & Bhattacharjee C. 2012. Enzyme membrane reactor in isolation of antioxidative peptides from oil industry waste: A comparison with non-peptidic antioxidants. *LWT* 47: 238–245.
- Das K.P. & Kinsella J.E. 1989. pH dependent emulsifying properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Dispersion Science and Technology* 10: 77–102.
- Debruyne I. 2001. Soja : transformation et aspects industriels. *Agroalimentaire*.
- Deeslie W.D. & Cheryan M. 1981a. A CSTR-hollow fiber system for continuous hydrolysis of proteins. Performance and kinetics. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 2257–2271.
- Deeslie W.D. & Cheryan M. 1981b. Continuous Enzymatic Modification of Proteins in an Ultrafiltration Reactor. *Journal of Food Science* 46: 1035–1042.
- Deeslie W.D. & Cheryan M. 1988. Functional properties of soy protein hydrolyzates from a continuous ultrafiltration reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 26–31.
- Defaix C., Aymes A., Albe Slabi S., Basselin M., Mathé C., Galet O. & Kapel R. 2019a. A new size-exclusion chromatography method for fast rapeseed albumin and globulin quantification. *Food Chemistry* 287: 151–159.
- Defaix C., Kapel R. & Galet O. 2019b. A Protein Isolate and Process for the Production Thereof. WO/2019/096862.
- Deng Y. 2018. Towards predicting enzymatic protein hydrolysis. Wageningen University, Wageningen: 203.

- Deng Y., Butré C.I. & Wierenga P.A. 2018. Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal* 86: 39–48.
- Deng Z., Mao J., Wang Y., Zou H. & Ye M. 2017. Enzyme Kinetics for Complex System Enables Accurate Determination of Specificity Constants of Numerous Substrates in a Mixture by Proteomics Platform. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 16: 135–145.
- Desprairies M. 2010. Des additifs pour texturer des aliments. In: *La chimie et l'alimentation - pour le bien-être de l'homme*, p. 242.
- Di Bella G. & Di Trapani D. 2019. A Brief Review on the Resistance-in-Series Model in Membrane Bioreactors (MBRs). *Membranes* 9: 24.
- Ding Y., Chen L., Shi Y., Akhtar M., Chen J. & Ettelaie R. 2021. Emulsifying and emulsion stabilizing properties of soy protein hydrolysates, covalently bonded to polysaccharides: The impact of enzyme choice and the degree of hydrolysis. *Food Hydrocolloids* 113: 106519.
- Diniz F.M. & Martin A.M. 1997. Effects of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on Functional Properties of Shark Protein Hydrolysate. *LWT - Food Science and Technology* 30: 266–272.
- Dizge N., Soydemir G., Karagunduz A. & Keskinler B. 2011. Influence of type and pore size of membranes on cross flow microfiltration of biological suspension. *Journal of Membrane Science* 366: 278–285.
- Docena G.H., Fernandez R., Chirido F.G. & Fossati C.A. 1996. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 51: 412–416.
- Doyen A., Husson E. & Bazinet L. 2013. Use of an electro-dialytic reactor for the simultaneous  $\beta$ -lactoglobulin enzymatic hydrolysis and fractionation of generated bioactive peptides. *Food Chemistry* 136: 1193–1202.
- Drioli E. & Giorno L. (eds.). 2010. *Comprehensive membrane science and engineering*. Elsevier, Acad. Press, Amsterdam.
- Du Y., Esfandi R., Willmore W.G. & Tsopmo A. 2016. Antioxidant Activity of Oat Proteins Derived Peptides in Stressed Hepatic HepG2 Cells. *Antioxidants* 5: 39.
- Du Y.-H., Wang M.-Y., Yang L.-H., Tong L.-L., Guo D.-S. & Ji X.-J. 2022. Optimization and Scale-Up of Fermentation Processes Driven by Models. *Bioengineering* 9: 473.
- Duggleby R.G. & Wood C. 1989. Analysis of progress curves for enzyme-catalysed reactions. 258.
- Durand E., Beaubier S., Fine F., Villeneuve P. & Kapel R. 2021a. High Metal Chelating Properties from Rapeseed Meal Proteins to Counteract Lipid Oxidation in Foods: Controlled Proteolysis and Characterization. *European Journal of Lipid Science and Technology* 123: 2000380.

- Durand E., Beaubier S., Ilic I., fine F., Kapel R. & Villeneuve P. 2021b. Production and antioxidant capacity of bioactive peptides from plant biomass to counteract lipid oxidation. *Current Research in Food Science* 4: 365–397.
- duVerle D.A. & Mamitsuka H. 2012. A review of statistical methods for prediction of proteolytic cleavage. *Briefings in Bioinformatics* 13: 337–349.
- Eisenberg D.S. (ed.). 1995. *Protein stability*. Academic Press, San Diego.
- Elias R.J., Kellerby S.S. & Decker E.A. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 430–441.
- Elmalimadi M.B., Jovanović J.R., Stefanović A.B., Tanasković S.J., Djurović S.B., Bugarski B.M. & Knežević-Jugović Z.D. 2017. Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten. *Industrial Crops and Products* 109: 548–557.
- Emadi Shaibani M., Heidari B., Khodabandeh S. & Shahangian S.S. 2021. Production and Fractionation of Rocky Shore Crab (*Grapsus albacarinos*) Protein Hydrolysate by Ultrafiltration Membrane: Assessment of Antioxidant and Cytotoxic Activities. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 30: 339–352.
- Ericson M.L., Rödin J., Lenman M., Glimelius K., Josefsson L.G. & Rask L. 1986. Structure of the rapeseed 1.7 S storage protein, napin, and its precursor. *Journal of Biological Chemistry* 261: 14576–14581.
- Esfahani M.R., Stretz H.A. & Wells M.J.M. 2015. Comparing humic acid and protein fouling on polysulfone ultrafiltration membranes: Adsorption and reversibility. *Journal of Water Process Engineering* 6: 83–92.
- Esfandi R., Walters M. & Tsopmo A. 2019. Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon* 5: e01538.
- Ewert J., Claaßen W., Stressler T. & Fischer L. 2019. An innovative two-step enzymatic membrane bioreactor approach for the continuous production of antioxidative casein hydrolysates with reduced bitterness. *Biochemical Engineering Journal* 150: 107261.
- Faber K., Fessner W.-D. & Turner N.J. (eds.). 2015. *Biocatalysis in Organic Synthesis 3*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Faivre R., Iooss B. & Mahévas S. 2013. *Analyse de sensibilité et exploration de modèles : Application aux sciences de la nature et de l'environnement*. Editions Quae.
- Fane A.G. & Fell C.J.D. 1987. A review of fouling and fouling control in ultrafiltration. *Desalination* 62: 117–136.
- Fernández A. & Riera F. 2013.  $\beta$ -Lactoglobulin tryptic digestion: A model approach for peptide release. *Biochemical Engineering Journal* 70: 88–96.
- Fernández A., Suárez A., Zhu Y., FitzGerald R.J. & Riera F.A. 2013. Membrane fractionation of a  $\beta$ -lactoglobulin tryptic digest: Effect of the pH. *Journal of Food Engineering* 114: 83–89.

- Ferry J.Douglass. 1936. Ultrafilter Membranes and Ultrafiltration. *Chemical Reviews* 18: 373–455.
- Field R.W., Bekassy-Molnar E., Lipnizki F. & Vatai G. (eds.). 2017. *Engineering aspects of membrane separation and application in food processing*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Fierens E., Brijs K. & Delcour J.A. 2016. Emulsifying and Foaming Properties of Okara Protein Hydrolysates. *Cereal Chemistry* 93: 71–76.
- Fluidics                      Analytics.                      Hydrodynamic                      Radius                      Converter.  
<https://www.fluidic.com/toolkit/hydrodynamic-radius-converter/>. *Fluidic Analytics*.
- Folawiyo Y.L. & Apenten R.K.O. 1996. Effect of pH and Ionic Strength on the Heat Stability of Rapeseed 12S Globulin (Cruciferin) by the ANS Fluorescence Method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70: 241–246.
- Fontanille P. & Larroche C. 2010. Production of Food Additives. In: *Comprehensive Food Fermentation and Biotechnology*, Asiatech Pub, p. 27.
- Fontanova E. & Drioli E. 2010. 3.05 Catalytic Membranes and Membrane Reactors. In: *Comprehensive Membrane Science and Engineering*, Elsevier Science B.V., p. 108.
- Fujimaki M., Yamashita M., Arai S., Kato H. & Gonda M. 1970. Enzymatic Modification of Proteins in Foodstuffs: Part I. Enzymatic Proteolysis and Plastein Synthesis Application for Preparing Bland Protein-like Substances Part II. Nutritive Properties of Soy Plastein and its Bio-utility Evaluation in Rats. *Agricultural and Biological Chemistry* 34: 1325–1337.
- Gallegos-Tintoré S., Torres-Fuentes C., Martínez-Ayala A.L., Solorza-Feria J., Alaiz M., Girón-Calle J. & Vioque J. 2011. Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 1618–1624.
- Ganapathy V. 2012. Protein Digestion and Absorption. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Elsevier, pp. 1595–1623.
- García Mollá V.M. 2017. Sensitivity Analysis for ODEs and DAEs. <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/1480-sensitivity-analysis-for-odes-and-daes>.
- García-García R. & Searle S.S. 2016. Preservatives: Food Use. In: *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier, pp. 505–509.
- Gassmann B. 1983. Preparation and application of vegetable proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach. *Food / Nahrung* 27: 351–369.
- Gauthier S.F. & Pouliot Y. 2003. Functional and Biological Properties of Peptides Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins 1. *Journal of Dairy Science* 86: E78–E87.
- GE Healthcare. 2008. Selection Handbook - Hollow fiber cartridges and systems for membrane separations.

- GE Healthcare. 2014. Cross Flow Filtration - Method Handbook.
- GE Healthcare, Life Sciences. 2011. Process Operating Considerations.
- GE Healthcare. *Operating Handbook - Hollow fiber cartridges for membrane separations*.
- Geiser M. 2003. The Wonders of Whey Protein. *NSCA's Performance Training Journal* 2.
- Gésan-Guiziou G. 2007. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Applications en agroalimentaire. *Techniques de l'Ingénieur* J2795 V1: 22.
- Ghosh R. & Cui Z.F. 2000. Purification of lysozyme using ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering* 68: 191–203.
- Ghosh R., Silva S.S. & Cui Z. 2000. Lysozyme separation by hollow-fibre ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal* 6: 19–24.
- Giancoli D.C. 2014. *Physics for scientists & engineers with modern physics*. Pearson, Harlow, Essex.
- Gibbs B.F., Zougman A., Masse R. & Mulligan C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Research International* 37: 123–131.
- Giorno L. & Drioli E. 2000. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends in Biotechnology* 18: 339–349.
- Girgih A.T., Udenigwe C.C. & Aluko R.E. 2011. In Vitro Antioxidant Properties of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88: 381–389.
- Girgih A.T., Udenigwe C.C., Hasan F.M., Gill T.A. & Aluko R.E. 2013. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Research International* 52: 315–322.
- Glyakina A.V. & Galzitskaya O.V. 2010. Influence of organization of native protein structure on its folding: Modeling of the folding of  $\alpha$ -helical proteins. *Biochemistry (Moscow)* 75: 995–1005.
- González A., Cruz M., Losoya C., Nobre C., Loredó A., Rodríguez R., Contreras J. & Belmares R. 2020. Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. *Food & Function* 11: 7400–7414.
- Görtler I., Urbanek R. & Forster J. 1995. Characterization of antigens and allergens in hypo-allergenic infant formulae. *European Journal of Pediatrics* 154: 289–294.
- Gould G.W. 1995. Biodeterioration of foods and an overview of preservation in the food and dairy industries. *International Biodeterioration & Biodegradation* 36: 267–277.
- Gourley L., Britten M., Gauthier S.F. & Pouliot Y. 1994. Characterization of adsorptive fouling on ultrafiltration membranes by peptides mixtures using contact angle measurements. *Journal of Membrane Science* 97: 283–289.

- Gourley L., Gauthie S.F., Pouliot Y., Mollé D., Léonil J. & Maubois J.-L. 1998. Identification of casein peptides interacting with polysulfone ultrafiltration membranes. *Le Lait* 78: 633–646.
- Gourley L., Gauthier S.F. & Pouliot Y. 1995. Separation of casein hydrolysates using polysulfone ultrafiltration membranes with pH and EDTA treatments applied. *Le Lait* 75: 259–269.
- Grazziotin A., Pimentel F.A., Sangali S., Jong E.V. de & Brandelli A. 2007. Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio* sp. kr2. *Bioresource Technology* 98: 3172–3175.
- Greenweez.com. 2022. Peptides bioactifs de collagène 300 g de poudre. <https://www.greenweez.com/produit/peptides-bioactifs-de-collagene-300-g-de-poudre/1TICO0001>. *Greenweez*.
- Grenier A. 2005. Méthodes pour l'identification et la caractérisation de mécanismes de colmatage en filtration frontale. Université Paul Sabatier, Toulouse: 236.
- Guadix A., Camacho F. & Guadix E.M. 2006. Production of whey protein hydrolysates with reduced allergenicity in a stable membrane reactor. *Journal of Food Engineering* 72: 398–405.
- Guerard F., Sumaya-Martinez M.T., Laroque D., Chabeaud A. & Dufossé L. 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry* 42: 1486–1491.
- Gülçin İ. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* 86: 345–391.
- Guo L., Harnedy P.A., O'Keeffe M.B., Zhang L., Li B., Hou H. & FitzGerald R.J. 2015. Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides. *Food Chemistry* 173: 536–542.
- Guo Y., Pan D. & Tanokura M. 2009. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology. *Food Chemistry* 114: 328–333.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 1–85.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. 2015. Free Radicals in Biology and Medicine. In: Oxford University Press.
- Hatzinikolaou D.G., Katsifas E., Mamma D., Karagouni A.D., Christakopoulos P. & Kekos D. 2005. Modeling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeate by a thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal* 24: 161–172.
- Hauser M., Roulias A., Ferreira F. & Egger M. 2010. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 6: 1.

- He R., Girgih A.T., Malomo S.A., Ju X. & Aluko R.E. 2013. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods* 5: 219–227.
- He R., Ju X., Yuan J., Wang L., Girgih A.T. & Aluko R.E. 2012. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Research International* 49: 432–438.
- Hedhili K., Dimitrov K., Vauchel P., Sila A., Chataigné G., Dhulster P. & Nedjar N. 2015. Valorization of cruor slaughterhouse by-product by enzymatic hydrolysis for the production of antibacterial peptides: focus on  $\alpha$  1–32 family peptides mechanism and kinetics modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38: 1867–1877.
- Helbig N.B., Ho L., Christy G.E. & Nakai S. 1980. Debittering of Skim Milk Hydrolysates by Adsorption for into into Acidic Beverages. *Journal of Food Science* 45: 331–335.
- Henchion M., Hayes M., Mullen A.M., Fenelon M. & Tiwari B. 2017a. Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods* 6.
- Henchion M., Hayes M., Mullen A., Fenelon M. & Tiwari B. 2017b. Future Protein Supply and Demand: Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods* 6: 53.
- Hill W.J. & Hunter W.G. 1966. A Review of Response Surface Methodology: A Literature Survey. *Technometrics* 8: 571.
- Hoffman J.R. & Falvo M.J. 2004. Protein – Which is Best? *Journal of Sports Science & Medicine* 3: 118–130.
- Huan Y., Kong Q., Mou H. & Yi H. 2020. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology* 11: 582779.
- Huang Y., Gilmour S.G., Mylona K. & Goos P. 2020a. Optimal Design of Experiments for Hybrid Nonlinear Models, with Applications to Extended Michaelis–Menten Kinetics. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* 25: 601–616.
- Huang S., Gong Y., Li Y., Ruan S., Roknul Azam S.M., Duan Y., Ye X. & Ma H. 2020b. Preparation of ACE-inhibitory peptides from milk protein in continuous enzyme membrane reactor with gradient dilution feeding substrate. *Process Biochemistry* 92: 130–137.
- Huang W.-H., Sun J., He H., Dong H.-W. & Li J.-T. 2011. Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 128: 968–973.
- Hurrell R. 2002. Bioavailability--a time for reflection. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition* 72: 5–6.
- Ida T., Ando M. & Toraya H. 2000. Extended pseudo-Voigt function for approximating the Voigt profile. *Journal of Applied Crystallography* 33: 1311–1316.

- iHerb.com. 2022. Life Extension, Peptides de lait bioactifs, 30 capsules végétariennes. <https://fr.iherb.com/pr/life-extension-bioactive-milk-peptides-30-vegetarian-capsules/37883>.
- Imarc Group. 2022. Animal Feed Market Share, Size, Growth and Forecast 2023-2028.
- Iojoiu E., Landrison E., Raeder H., Torp E.G., Miachon S. & Dalmon J. 2006. The “Watercatox” process: Wet air oxidation of industrial effluents in a catalytic membrane reactor: First report on contactor CMR up-scaling to pilot unit.
- Islam M.M., Kobayashi K., Kidokoro S.-I. & Kuroda Y. 2019. Hydrophobic surface residues can stabilize a protein through improved water–protein interactions. *The FEBS Journal* 286: 4122–4134.
- Ito K. & Matsuyama A. 2021. Koji Molds for Japanese Soy Sauce Brewing: Characteristics and Key Enzymes. *Journal of Fungi* 7: 658.
- Ivanova P., Chalova V., Uzunova G., Koleva L. & Manolov I. 2016. Biochemical Characterization of Industrially Produced Rapeseed Meal as a Protein Source in Food Industry. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 10: 55–62.
- Jaiswal A., Bajaj R., Mann B. & Lata K. 2015. Iron (II)-chelating activity of buffalo  $\alpha$ S-casein hydrolysed by corolase PP, alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Science and Technology* 52: 3911–3918.
- Jakovetić S., Luković N., Jugović B., Gvozdenović M., Grbavčić S., Jovanović J. & Knežević-Jugović Z. 2015. Production of Antioxidant Egg White Hydrolysates in a Continuous Stirred Tank Enzyme Reactor Coupled with Membrane Separation Unit. *Food and Bioprocess Technology* 8: 287–300.
- Jamdar S.N. & Harikumar P. 2005. Autolytic degradation of chicken intestinal proteins. *Bioresource Technology* 96: 1276–1284.
- Jayakumar R., Prabakaran M., Nair S.V. & Tamura H. 2010. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances* 28: 142–150.
- Jeon Y.-J. & Kim S.-K. 2000. Continuous production of chitoooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochemistry* 35: 623–632.
- Jiménez-Moreno N., Esparza I., Bimbela F., Gandía L.M. & Ancín-Azpilicueta C. 2020. Valorization of selected fruit and vegetable wastes as bioactive compounds: Opportunities and challenges. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 50: 2061–2108.
- Jin D., Liu X., Zheng X., Wang X. & He J. 2016. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry* 204: 427–436.
- Jo K., Hong K.-B. & Suh H.J. 2020. Effects of the Whey Protein Hydrolysates of Various Protein Enzymes on the Proliferation and Differentiation of 3T3-E1 Osteoblasts. *Preventive Nutrition and Food Science* 25: 71–77.

- Joehnke M.S., Lametsch R. & Sørensen J.C. 2019. Improved in vitro digestibility of rapeseed napin proteins in mixtures with bovine beta-lactoglobulin. *Food Research International (Ottawa, Ont.)* 123: 346–354.
- Jönsson A.-S. & Trägårdh G. 1990. Fundamental principles of ultrafiltration. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 27: 67–81.
- Josefsson L.G., Lenman M., Ericson M.L. & Rask L. 1987. Structure of a gene encoding the 1.7 S storage protein, napin, from *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry* 262: 12196–12201.
- Jyothi T.C., Singh S.A. & Rao A.G.A. 2007a. Conformation of Napin (*Brassica juncea*) in salts and monohydric alcohols: contribution of electrostatic and hydrophobic interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4229–4236.
- Jyothi T.C., Sinha S., Singh S.A., Surolia A. & Appu Rao A.G. 2007b. Napin from *Brassica juncea*: Thermodynamic and structural analysis of stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1774: 907–919.
- Kapel R., Chabeau A., Lesage J., Rivière G., Ravallec-Plé R., Lecouturier D., Wartelle M., Guillochon D. & Dhulster P. 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. *Food Chemistry* 98: 120–126.
- Kapel R., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Fertin-Bazus A., Dhulster P. & Guillochon D. 2003. Continuous production of a peptidic fraction containing the intermediate opioid peptide LVV-haemorphin-7 (LVVh-7) by peptic hydrolysis of bovine haemoglobin in a continuous membrane reactor. *Biotechnology and applied biochemistry* 37: 317–324.
- Kapel R., Klingenberg F., Framboisier X., Dhulster P. & Marc I. 2011. An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide. *Journal of Membrane Science* 383: 26–34.
- Karnjanapratum S., O'callaghan Y.C., Benjakul S., O'keeffe M.B., Fitzgerald R.J. & O'brien N.M. 2017. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Gelatin Hydrolysates of Unicorn Leatherjacket Skin. *Italian Journal of Food Science* 29: 158–170.
- Karplus P.A. 1997. Hydrophobicity regained. *Protein Science* 6: 1302–1307.
- Kate A., Sahu L.K., Pandey J., Mishra M. & Sharma P.K. 2022. Green catalysis for chemical transformation: The need for the sustainable development. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* 5: 100248.
- Kato A. & Nakai S. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 624: 13–20.

- Kawagoe S., Ishimori K. & Saio T. 2022. Structural and Kinetic Views of Molecular Chaperones in Multidomain Protein Folding. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 2485.
- Kayser H. & Meisel H. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters* 383: 18–20.
- Kędziora P., Le Thanh J., Lewandowicz G. & Prochaska K. 2006. An attempt to application of continuous recycle membrane reactor for hydrolysis of oxidised derivatives of potato starch. *Journal of Membrane Science* 282: 14–20.
- Kella N.K.D. & Kinsella J.E. 1985. A method for the controlled cleavage of disulfide bonds in proteins in the absence of denaturants. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 11: 251–263.
- Kim S.S., Ahn C.-B., Moon S.W. & Je J.-Y. 2018. Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (*Halocynthia roretzi*) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis. *Food Bioscience* 25: 128–133.
- Kim S.-Y., Je J.-Y. & Kim S.-K. 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18: 31–38.
- Kim J.M., Whang J.H. & Suh H.J. 2004. Enhancement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity and improvement of the emulsifying and foaming properties of corn gluten hydrolysate using ultrafiltration membranes. *European Food Research and Technology* 218: 133–138.
- Kinsella J. 1981. Functional properties of proteins: Possible relationships between structure and function in foams. *Food Chemistry* 7: 273–288.
- Kinsella J.E., Damodaran S. & German B. 1985. Physicochemical and Functional Properties of Oilseed Proteins with Emphasis on Soy Proteins. In: *New Protein Foods*, Elsevier, pp. 107–179.
- Kinsella J.E. & Melachouris N. 1976. Functional properties of proteins in foods: A survey. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 7: 219–280.
- Kitts D.D. & Weiler K. 2003a. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9: 1309–1323.
- Kitts D. & Weiler K. 2003b. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9: 1309–1323.
- Kong X., Zhou H. & Qian H. 2007. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry* 101: 615–620.
- Korhonen H. & Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16: 945–960.

- Korkmaz K. & Tokur B. 2022. Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish wastes using response surface methodology. *Food Bioscience* 45: 101312.
- Korobov V. & Ochkov V. 2011a. *Chemical Kinetics with Mathcad and Maple*. Springer Vienna, Vienna.
- Korobov V.I. & Ochkov V.F. 2011b. Multi-Step Reactions: The Methods for Analytical Solving the Direct Problem. In: *Chemical Kinetics with Mathcad and Maple*, Springer Vienna, Vienna, pp. 35–72.
- Koyama M., Naramoto K., Nakajima T., Aoyama T., Watanabe M. & Nakamura K. 2013. Purification and Identification of Antihypertensive Peptides from Fermented Buckwheat Sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 3013–3021.
- Krautgartner R., Lefebvre L., Rehder, L.E., Boshnakova M. & the group of FAS oilseeds specialists in the EU. 2018. Oilseeds and Products Report.
- Krippel M., Bofarull-Manzano I., Duerkop M. & Dürauer A. 2020. Hybrid Modeling for Simultaneous Prediction of Flux, Rejection Factor and Concentration in Two-Component Crossflow Ultrafiltration. *Processes* 8: 1625.
- Kristinsson H.G. & Rasco B.A. 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 43–81.
- Kuhn R.C., Maugeri Filho F., Silva V., Palacio L., Hernández A. & Prádanos P. 2010. Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration. *Journal of Membrane Science* 365: 356–365.
- Kuipers B.J.H. & Gruppen H. 2007. Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 5445–5451.
- Kumar D., Chatli M.K., Singh R., Mehta N. & Kumar P. 2016. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research* 139: 20–25.
- Kunst T. 2002. Protein Modification to Optimize Functionality Protein Hydrolysates. In: Whitaker J., Voragen A. & Wong D. (eds.), *Handbook of Food Enzymology*, CRC Press.
- Kuroiwa T., Izuta H., Nabetani H., Nakajima M., Sato S., Mukataka S. & Ichikawa S. 2009. Selective and stable production of physiologically active chitosan oligosaccharides using an enzymatic membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 44: 283–287.
- Lai Y.P., Mondor M., Moresoli C., Drolet H., Gros-Louis M., Ippersiel D., Lamarche F. & Arcand Y. 2013. Production of soy protein isolates with low phytic acid content by membrane technologies: Impact of the extraction and ultrafiltration/diafiltration conditions. *Journal of Food Engineering* 114: 221–227.

- Lamazière A., Burlina F., Wolf C., Chassaing G., Trugnan G. & Ayala-Sanmartin J. 2007. Non-Metabolic Membrane Tubulation and Permeability Induced by Bioactive Peptides. *PLoS ONE* 2: e201.
- Landers T.F., Cohen B., Wittum T.E. & Larson E.L. 2012. A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports* 127: 4–22.
- Langyan S., Yadava P., Khan F.N., Dar Z.A., Singh R. & Kumar A. 2022. Sustaining Protein Nutrition Through Plant-Based Foods. *Frontiers in Nutrition* 8.
- Lanoë J. & Dunnigan J. 1978. Improvements of the Anson assay for measuring proteolytic activities in acidic pH range. *Analytical Biochemistry* 89: 461–471.
- Laskowski M. & Scheraga H.A. 1954. Thermodynamic Considerations of Protein Reactions. <sup>1,2</sup> I. Modified Reactivity of Polar Groups. *Journal of the American Chemical Society* 76: 6305–6319.
- Leduc A., Fournier V. & Henry J. 2020. A standardized, innovative method to characterize the structure of aquatic protein hydrolysates. *Heliyon* 6: e04170.
- Leeb E., Götz A., Letzel T., Cheison S.C. & Kulozik U. 2015. Influence of denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin on its tryptic hydrolysis and the release of functional peptides. *Food Chemistry* 187: 545–554.
- Leskovac V. 2003. *Comprehensive enzyme kinetics*. Kluwer Academic/Plenum Pub, New York.
- Lester M.R. 1995. Sulfite sensitivity: significance in human health. *Journal of the American College of Nutrition* 14: 229–232.
- Li W., Chen W., Ma H., Wang J., Li Z., Wang Q., Zhang Z., Wu D., Zhang J. & Yang Y. 2022. Study on the relationship between structure and taste activity of the umami peptide of *Stropharia rugosoannulata* prepared by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* 90: 106206.
- Li Y.-M., Zhang X.-N., Luo J.-Y., Li Z.-K., Wang Z.-M. & Shen Z.-Y. 2020. Synthesis and microwave dielectric properties of 0.65CaTiO<sub>3</sub>–0.35LaAlO<sub>3</sub> by polymeric precursor method. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 31: 19437–19446.
- Liang N. & Kitts D. 2014. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules (Basel, Switzerland)* 19: 19180–19208.
- Linder M., Rozan P., El Kossori R.L., Fanni J., Villaume C., Mejean L. & Parmentier M. 1997. Nutritional Value of Veal Bone Hydrolysate. *Journal of Food Science* 62: 183–189.
- Linderstrom-Lang K. 1953. [The initial phases of the enzymatic degradation of proteins]. *Bulletin De La Societe De Chimie Biologique* 35: 100–116.
- Lisak Jakopović K., Cheison S.C., Kulozik U. & Božanić R. 2019. Comparison of selective hydrolysis of  $\alpha$ -lactalbumin by acid Protease A and Protease M as alternative to pepsin: potential for  $\beta$ -lactoglobulin purification in whey proteins. *Journal of Dairy Research* 86: 114–119.

- Lischeske J.J. & Stickel J.J. 2019. A two-phase substrate model for enzymatic hydrolysis of lignocellulose: application to batch and continuous reactors. *Biotechnology for Biofuels* 12: 299.
- Liu C., Bhattarai M., Mikkonen K.S. & Heinonen M. 2019. Effects of Enzymatic Hydrolysis of Fava Bean Protein Isolate by Alcalase on the Physical and Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67: 6625–6632.
- López-Morales C.A., Vázquez-Leyva S., Vallejo-Castillo L., Carballo-Uicab G., Muñoz-García L., Herbert-Pucheta J.E., Zepeda-Vallejo L.G., Velasco-Velázquez M., Pavón L., Pérez-Tapia S.M. & Medina-Rivero E. 2019. Determination of Peptide Profile Consistency and Safety of Collagen Hydrolysates as Quality Attributes. *Journal of Food Science* 84: 430–439.
- Mai V. & Nhan T. 2020. Numerical analysis of coupled systems of ODEs and applications to enzymatic competitive inhibition by product. *Advances in the Theory of Nonlinear Analysis and its Application*.
- Malabat C., nchez-Vioque R.I.S., Rabiller C. & Guen J.G. 2001. Emulsifying and foaming properties of native and chemically modified peptides from the 2S and 12S proteins of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 235–242.
- Mannheim A. & Cheryan M. 1990. Continuous Hydrolysis of Milk Protein in a Membrane Reactor. *Journal of Food Science* 55: 381–385.
- Marczak E.D., Usui H., Fujita H., Yang Y., Yokoo M., Lipkowski A.W. & Yoshikawa M. 2003. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 24: 791–798.
- Margot A., Flaschel E. & Renken A. 1998. Development of a continuously operated reactor for the limited hydrolysis of whey protein by trypsin. *Process Biochemistry* 33: 125–131.
- MarketsandMarkets. 2021. Functional Food Ingredients Market Size, Trends, Analysis by 2026. *MarketsandMarkets*.
- Márquez M.C. & Vázquez M.A. 1999. Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry* 35: 111–117.
- Marshall A.D., Munro P.A. & Trägårdh G. 1993. The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review. *Desalination* 91: 65–108.
- Martínez-Araiza G., Castaño-Tostado E., Amaya-Llano S., Regalado C., Martínez-C & Ozimek L. 2012. Modeling of Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. *Food and Bioprocess Technology* 5: 2596–2601.
- Martin-Orue C., Henry G. & Bouhallab S. 1999. Tryptic hydrolysis of k-caseinomacropeptide: Control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor. : 9.
- Mat D.J.L., Cattenoz T., Souchon I., Michon C. & Le Feunteun S. 2018. Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry* 239: 268–275.

- Matej M. 2022. Global pharmaceutical industry - statistics & facts. *Statista*.
- Maurel A. 1993. Techniques séparatives à membranes - Considérations théoriques. *Techniques de l'Ingénieur J2790 V2*: 26.
- MAYER J.M. 2011. Understanding Hydrogen Atom Transfer: from Bond Strengths to Marcus Theory. *Accounts of chemical research* 44: 36–46.
- Md Saleh N.I., Wan Ab Karim Ghani W.A., Mustapa Kamal S.M. & Harun R. 2021. Performance of Single and Two-Stage Cross-Flow Ultrafiltration Membrane in Fractionation of Peptide from Microalgae Protein Hydrolysate (*Nannochloropsis gaditana*). *Processes* 9: 610.
- Meena A., Eswari A. & Rajendran L. 2010. Mathematical modelling of enzyme kinetics reaction mechanisms and analytical solutions of non-linear reaction equations. *Journal of Mathematical Chemistry* 48: 179–186.
- Meireles M., Aimar P. & Sanchez V. 1991a. Albumin denaturation during ultrafiltration: Effects of operating conditions and consequences on membrane fouling. *Biotechnology and Bioengineering* 38: 528–534.
- Meireles M., Aimar P. & Sanchez V. 1991b. Effects of protein fouling on the apparent pore size distribution of sieving membranes. *Journal of Membrane Science* 56: 13–28.
- Mejrhit N., Azdad O., Chda A., El Kabbaoui M., Bousfiha A., Bencheikh R., Tazi A. & Aarab L. 2017. Evaluation of the sensitivity of Moroccans to shrimp tropomyosin and effect of heating and enzymatic treatments. *Food and Agricultural Immunology* 28: 969–980.
- Mellander O. 1950. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. Some aspects of the pathogenesis of rickets. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 55: 247–257.
- Merz M., Eisele T., Berends P., Appel D., Rabe S., Blank I., Stressler T. & Fischer L. 2015a. Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 5682–5693.
- Merz M., Eisele T., Claaßen W., Appel D., Rabe S., Stressler T. & Fischer L. 2015b. Continuous long-term hydrolysis of wheat gluten using a principally food-grade enzyme membrane reactor system. *Biochemical Engineering Journal* 99: 114–123.
- Mikut R., Ruden S., Reischl M., Breitling F., Volkmer R. & Hilpert K. 2016. Improving short antimicrobial peptides despite elusive rules for activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858: 1024–1033.
- Mišún D., Čurda L. & Jelen P. 2008. Batch and continuous hydrolysis of ovine whey proteins. *Small Ruminant Research* 79: 51–56.
- Moelbert S., Emberly E. & Tang C. 2004. Correlation between sequence hydrophobicity and surface-exposure pattern of database proteins. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 13: 752–762.

- Mordor Intelligence. 2022. Fertilizers Market Analysis - Industry Report - Trends, Size & Share.
- Moure A., Sineiro J., Domínguez H. & Parajó J.C. 2006. Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International* 39: 945–963.
- Mukhia S., Kumar A. & Kumar R. 2021. Generation of antioxidant peptides from soy protein isolate through psychrotrophic *Chryseobacterium* sp. derived alkaline broad temperature active protease. *LWT* 143: 111152.
- Mullally M.M., Meisel H. & FitzGerald R.J. 1997. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal* 7: 299–303.
- Mullally M.M., O’Callaghan D.M., FitzGerald R.J., Donnelly W.J. & Dalton J.P. 1994. Proteolytic and Peptidolytic Activities in Commercial Pancreatic Protease Preparations and Their Relationship to Some Whey Protein Hydrolyzate Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 2973–2981.
- Muller A., Chaufer B., Merin U. & Daufin G. 2003. Prepurification of  $\alpha$ -lactalbumin with ultrafiltration ceramic membranes from acid casein whey: study of operating conditions. *Le Lait* 83: 111–129.
- Muller A., Daufin G. & Chaufer B. 1999. Ultrafiltration modes of operation for the separation of  $\alpha$ -lactalbumin from acid casein whey. *Journal of Membrane Science* 153: 9–21.
- Muniglia L., Nandor Kiss L., Fonteix C. & Marc I. 2004. Multicriteria optimization of a single-cell oil production. *European Journal of Operational Research* 153: 360–369.
- Munoz-Tamayo R., Groot J. de, Wierenga P.A., Gruppen H., Zwietering M.H. & Sijtsma L. 2012. Modeling peptide formation during the hydrolysis of beta-casein by *Lactococcus lactis*. *Process Biochemistry* 47: 83–93.
- Muro C., Riera F. & Fernandez A. 2013. Advancements in the Fractionation of Milk Biopeptides by Means of Membrane Processes. In: Hernandez-Ledesma B. (ed.), *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, InTech.
- Nagaoka S., Futamura Y., Miwa K., Awano T., Yamauchi K., Kanamaru Y., Tadashi K. & Kuwata T. 2001. Identification of Novel Hypocholesterolemic Peptides Derived from Bovine Milk  $\beta$ -Lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 11–17.
- Nakajima M., Shoji T. & Nabetani H. 1992. Protease hydrolysis of water soluble fish proteins using a free enzyme membrane reactor. *Process Biochemistry* 27: 155–160.
- Nakao S.-I. & Kimura S. 1981. Analysis of solutes rejection in ultrafiltration. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 14: 32–37.
- Nasri M. 2017. Protein Hydrolysates and Biopeptides. In: *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier, pp. 109–159.

- Nath A., Kailo G.G., Mednyánszky Z., Kiskó G., Csehi B., Pásztorné-Huszár K., Gerencsér-Berta R., Galambos I., Pozsgai E., Bánvölgyi S. & Vatai G. 2020. Antioxidant and Antibacterial Peptides from Soybean Milk through Enzymatic- and Membrane-Based Technologies. *Bioengineering* 7: 5.
- Neklyudov A.D., Ivankin A.N. & Berdutina A.V. 1999. Properties and Uses of Protein Hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology* 36: 452–459.
- Ng C.Y., Mohammad A.W., Ng L.Y. & Jahim J.M. 2015. Sequential fractionation of value-added coconut products using membrane processes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 25: 162–167.
- Ngoh Y.-Y. & Gan C.-Y. 2016. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry* 190: 331–337.
- Nimalaratne C., Bandara N. & Wu J. 2015. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry* 188: 467–472.
- Nioi C., Kapel R., Rondags E. & Marc I. 2012. Selective extraction, structural characterisation and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal. *Food chemistry*.
- Noworyta A., Trusek A. & Wajsprych M. 2018. Membrane reactor for enzymatic depolymerization – a case study based on protein hydrolysis. *Polish Journal of Chemical Technology* 20: 44–48.
- Nwachukwu I.D. & Aluko R.E. 2018. Antioxidant Properties of Flaxseed Protein Hydrolysates: Influence of Hydrolytic Enzyme Concentration and Peptide Size. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 95: 1105–1118.
- Nwachukwu I.D. & Aluko R.E. 2019. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry* 43: e12761.
- Ohata M., Uchida S., Zhou L. & Arihara K. 2016. Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. *Food Chemistry* 194: 1034–1039.
- Ojha S., Bekhit A.E.-D., Grune T. & Schlüter O.K. 2021. Bioavailability of nutrients from edible insects. *Current Opinion in Food Science* 41: 240–248.
- Ortiz S.E.M. & An M.C. 2000. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77: 1293–1301.
- Otte J., Lomholt S.B., Ipsen R., Stapelfeldt H., Bukrinsky J.T. & Qvist K.B. 1997. Aggregate Formation during Hydrolysis of  $\beta$ -Lactoglobulin with a Glu and Asp Specific Protease from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4889–4896.

- Oueslati N., Leblanc P., Bodin A., Harscoat-Schiavo C., Rondags E., Meunier S., Marc I. & Kapel R. 2015. A simple methodology for predicting the performances of hyaluronic acid purification by diafiltration. *Journal of Membrane Science* 490.
- Pace C.N., Grimsley G.R. & Scholtz J.M. 2009. Protein Ionizable Groups: pK Values and Their Contribution to Protein Stability and Solubility. *Journal of Biological Chemistry* 284: 13285–13289.
- Paciorek-Sadowska J., Borowicz M., Isbrandt M., Czupryński B. & Apiecionek Ł. 2019. The Use of Waste from the Production of Rapeseed Oil for Obtaining of New Polyurethane Composites. *Polymers* 11: 1431.
- Panyam D. & Kilara A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology* 7: 120–125.
- Paolucci-Jeanjean D., Belleville M.-P. & Rios G.M. 2001. A comprehensive study of the loss of enzyme activity in a continuous membrane reactor – application to starch hydrolysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 76: 273–278.
- Paris C. 2021. Développement de nouvelles approches analytiques pour le criblage de peptides chélateurs de fer. Université de Lorraine, Nancy: 244.
- Park S.H. & Jo Y.-J. 2019. Static hydrothermal processing and fractionation for production of a collagen peptide with anti-oxidative and anti-aging properties. *Process Biochemistry* 83: 176–182.
- Pasupuleti V.K. & Demain A.L. (eds.). 2010. *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Paulen R., Foley G., Fikar M., Kovács Z. & Czermak P. 2011. Minimizing the process time for ultrafiltration/diafiltration under gel polarization conditions. *Journal of Membrane Science* 380: 148–154.
- Pearson R.G. 1969. Hard and Soft Acids and Bases. In: *Survey of Progress in Chemistry*, Elsevier, pp. 1–52.
- Peptide 2.0 Inc. 2022. Peptide Hydrophobicity/Hydrophilicity Analysis Tool. [https://www.peptide2.com/N\\_peptide\\_hydrophobicity\\_hydrophilicity.php](https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php).
- Perea A. & Ugalde U. 1996. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 29–34.
- Perera S.P., McIntosh T.C. & Wanasundara J.P.D. 2016. Structural Properties of Cruciferin and Napin of Brassica napus (Canola) Show Distinct Responses to Changes in pH and Temperature. *Plants* 5: 36.
- Perrin E., Mandrille A., Oumoun M., Fonteix C. & Marc I. 1997. Optimisation globale par stratégie d'évolution. *RAIRO - Operations Research* 31: 161–201.
- Persson K.M. & Nilsson J.L. 1991. Fouling resistance models in MF and UF. *Desalination* 80: 123–138.

- Phongthai S., D'Amico S., Schoenlechner R., Homthawornchoo W. & Rawdkuen S. 2018. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 240: 156–164.
- Picot L., Ravallec R., Fouchereau-Péron M., Vandanjon L., Jaouen P., Chaplain-Derouiniot M., Guérard F., Chabeaud A., LeGal Y., Alvarez O.M., Bergé J.-P., Piot J.-M., Batista I., Pires C., Thorkelsson G., Delannoy C., Jakobsen G., Johansson I. & Bourseau P. 2010. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1819–1826.
- Pihlanto A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal* 16: 1306–1314.
- Pihlanto A. & Mäkinen S. 2016. Rapeseed protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. In: *Rapeseed: Chemical Composition, Production and Health Benefits*, pp. 1–32.
- Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T. & Korhonen H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research* 67: 53–64.
- Pinto G.A., Giordano R.L.C. & Giordano R.C. 2007. Neural Network Inference of Molar Mass Distributions of Peptides during Tailor-Made Enzymatic Hydrolysis of Cheese Whey: Effects of pH and Temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 143: 142–152.
- Plumb K. 2005. Continuous Processing in the Pharmaceutical Industry: Changing the Mind Set. *Chemical Engineering Research and Design* 83: 730–738.
- Poddar A., Bhattacharjee C. & Datta S. 1999. Simulation of Unstirred Batch Ultrafiltration System Based on Analytical Solution of Boundary Layer Equation. *Separation Science and Technology* 34: 2485–2500.
- Polanco-Lugo E., Dávila-Ortiz G., Betancur-Ancona D.A. & Chel-Guerrero L.A. 2014. Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of Phaseolus lunatus protein isolate. *Food Science and Technology* 34: 441–448.
- Poore J. & Nemecek T. 2018. Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science (New York, N.Y.)* 360: 987–992.
- Pop A., Kiss B. & Loghin F. 2013. Endocrine disrupting effects of butylated hydroxyanisole (BHA - E320). *Clujul Medical* 86.
- Power O., Fernández A., Norris R., Riera F.A. & FitzGerald R.J. 2014. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Functional Foods* 9: 38–47.
- Powers J.-P.S. & Hancock R.E.W. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 24: 1681–1691.
- Prata-Vidal M., Bouhallab S., Henry G. & Aimar P. 2001. An experimental study of caseinomacropptide hydrolysis by trypsin in a continuous membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal* 8: 195–202.

- Prazeres D.M.F. & Cabral J.M.S. 1994. Enzymatic membrane bioreactors and their applications. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 738–750.
- Precedence Research. 2022a. Biopolymers Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2022-2030.
- Precedence Research. 2022b. Biofuels Market 2020 to 2030. *GlobeNewswire News Room*.
- Premnath S. & Agarwal G.P. 2017. Single stage ultrafiltration for enhanced reverse selectivity in a binary protein system. *Separation Science and Technology* 52: 2161–2172.
- Przybylski R., Bazinet L., Kouach M., Goossens J.-F., Dhulster P., Firdaous L. & Nedjar-Arroume N. 2021. Slaughterhouse By-Product Valorization: Hydrolysis Degree Modification for Higher Antimicrobial Recovery by Electroseparation. *Waste and Biomass Valorization* 12: 1977–1989.
- Pujar N.S. & Zydney A.L. 1998. Electrostatic effects on protein partitioning in size-exclusion chromatography and membrane ultrafiltration. *Journal of Chromatography A* 796: 229–238.
- Punekar N.S. 2018. *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Springer Singapore, Singapore.
- Purushothaman K., Bhat S.K., Singh S.A., Marathe G.K. & Appu Rao A.R.G. 2019. Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. *International Journal of Biological Macromolecules* 139: 199–212.
- Qi W. & He Z. 2006. Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China* 1: 308–314.
- Qi X.L., Holt C., McNulty D., Clarke D.T., Brownlow S. & Jones G.R. 1997. Effect of temperature on the secondary structure of  $\beta$ -lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochemical Journal* 324: 341–346.
- Qu W., Ma H., Zhao W. & Pan Z. 2013. ACE-inhibitory peptides production from defatted wheat germ protein by continuous coupling of enzymatic hydrolysis and membrane separation: Modeling and experimental studies. *Chemical Engineering Journal* 226: 139–145.
- Quezada C., Estay H., Cassano A., Troncoso E. & Ruby-Figueroa R. 2021. Prediction of Permeate Flux in Ultrafiltration Processes: A Review of Modeling Approaches. *Membranes* 11: 368.
- R P. 2023. Optimization of parameters of the sigmoid function. [https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/42641-sigm\\_fit](https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/42641-sigm_fit).
- Raab B., Leman H., Schwenke K.D. & Kozłowska H. 1992. Comparative study of the protein patterns of some rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties by means of polyacrylamide gel electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Food/Nahrung* 36: 239–247.

- Rabiller-Baudry M. 2009. Nettoyage et décolmatage des membranes de filtration. *Techniques de l'Ingénieur J2797 V1*: 20.
- Rahman M., Browne J.J., Van Crugten J., Hasan Md.F., Liu L. & Barkla B.J. 2020. In Silico, Molecular Docking and In Vitro Antimicrobial Activity of the Major Rapeseed Seed Storage Proteins. *Frontiers in Pharmacology* 11.
- Raksakulthai R. & Haard N.F. 2003. Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43: 401–445.
- Ratnikov B.I., Cieplak P., Remacle A.G., Nguyen E. & Smith J.W. 2021. Quantitative profiling of protease specificity. *PLOS Computational Biology* 17: e1008101.
- Reeves C.R. & Wright C.C. 1999. Genetic Algorithms and the Design of Experiments. In: Davis L.D., De Jong K., Vose M.D. & Whitley L.D. (eds.), *Evolutionary Algorithms*, Springer New York, New York, NY, pp. 207–226.
- Remigy J.-C. & Desclaux S. 2007. Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. *Techniques de l'Ingénieur J2791 V1*: 27.
- Ren J., Zheng X.-Q., Liu X.-L. & Liu H. 2010. Purification and Characterization of Antioxidant Peptide from Sunflower Protein Hydrolysate. *Food Technol. Biotechnol.* 48: 519–523.
- Ricke S. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science* 82: 632–639.
- Righetti P.G., Nembri F., Bossi A. & Mortarino M. 1997. Continuous Enzymatic Hydrolysis of  $\beta$ -Casein and Isoelectric Collection of Some of the Biologically Active Peptides in an Electric Field. *Biotechnology Progress* 13: 258–264.
- Rios G.M. 2012. Introduction aux enjeux des procédés membranaires. *Techniques de l'Ingénieur J2842 V1*: 12.
- Rios G.M., Belleville M.P., Paolucci D. & Sanchez J. 2004. Progress in enzymatic membrane reactors – a review. *Journal of Membrane Science* 242: 189–196.
- Rodrigues R.C., Ortiz C., Berenguer-Murcia Á., Torres R. & Fernández-Lafuente R. 2013. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* 42: 6290–6307.
- Roozen J.P. & Pilnik W. 1979. Enzymatic protein hydrolysis in a membrane reactor related to taste properties. *Enzyme and Microbial Technology* 1: 122–124.
- Rose G.D., Geselowitz A.R., Lesser G.J., Lee R.H. & Zehfus M.H. 1985. Hydrophobicity of Amino Acid Residues in Globular Proteins. *Science*.
- Rose G.D. & Wolfenden R. 1993. Hydrogen Bonding, Hydrophobicity, Packing, and Protein Folding. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 22: 381–415.
- Roudot-Algaron F. 1996. Le goût des acides aminés, des peptides et des protéines : exemple de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines. *Le Lait* 76: 313–348.

- Ruan Ch.-Q., Chi Y.-J. & Zhang R.-D. 2010. Kinetics of hydrolysis of egg white protein by pepsin. *Czech Journal of Food Sciences* 28: 355–363.
- Russell A.D. 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection* 43: S57–S68.
- Rutherford S.M. 2010. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC International* 93: 1515–1522.
- Rutherford S.M., Fanning A.C., Miller B.J. & Moughan P.J. 2015. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *The Journal of Nutrition* 145: 372–379.
- Sá A.G.A., Moreno Y.M.F. & Carciofi B.A.M. 2020. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60: 3367–3386.
- Saadi S., Saari N., Anwar F., Abdul Hamid A. & Ghazali H.M. 2015. Recent advances in food biopeptides: production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances* 33: 80–116.
- Sablani S.S., Datta A.K., Rahman M.S. & Mujumdar A.S. (eds.). 2006. *Handbook of Food and Bioprocess Modeling Techniques*. CRC Press, Boca Raton.
- Saha D. & Bhattacharya S. 2010. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of Food Science and Technology* 47: 587–597.
- Sanders N. & Hubble J. 1991. Concentration polarisation in a constant flux ultrafiltration rig: prediction of bulk protein concentrations using a lumped parameter model. *Journal of Membrane Science* 59: 277–292.
- Sannier F., Piot J.-M., Dhulster P. & Guillochon D. 1994. Stability of a mineral membrane ultrafiltration reactor for peptide hydrolysis of hemoglobin. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 61: 43–47.
- Saran S., Isar J. & Saxena R.K. 2007. Statistical optimization of conditions for protease production from *Bacillus* sp. and its scale-up in a bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 141: 229–239.
- Sarbatly R. & England R. 2004. Critical Review of Membrane Bioreactor System Used for Continuous Production of Hydrolyzed Starch. *Chem. Biochem. Eng. Q.*
- Sarkar D., Datta D., Sen D. & Bhattacharjee C. 2011. Simulation of continuous stirred rotating disk-membrane module: An approach based on surface renewal theory. *Chemical Engineering Science* 66: 2554–2567.
- Sarkar D. & Modak J.M. 2005. Pareto-optimal solutions for multi-objective optimization of fed-batch bioreactors using nondominated sorting genetic algorithm. *Chemical Engineering Science* 60: 481–492.

- Saunders T., Wu J., Williams R.C., Huang H. & Ponder M.A. 2018. Inactivation of Salmonella and Surrogate Bacteria on Cashews and Macadamia Nuts Exposed to Commercial Propylene Oxide Processing Conditions. *Journal of Food Protection* 81: 417–423.
- Schmidt I., Renard D., Rondeau D., Richomme P., Popineau Y. & Axelos M.A.-V. 2004. Detailed Physicochemical Characterization of the 2S Storage Protein from Rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5995–6001.
- Scocchi M., Mardirossian M., Runti G. & Benincasa M. 2015. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 16: 76–88.
- Seleme R.N. 2019. Modelling of Enzymatic Protein Hydrolysis. Faculty of Engineering at Stellenbosch University: 145.
- Seo H.-W., Jung E.-Y., Go G., Kim G.-D., Joo S.-T. & Yang H.-S. 2015. Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. *Food Chemistry* 185: 106–111.
- Seoud O.A.E., Baader W.J. & Bastos E.L. 2016. Practical Chemical Kinetics in Solution. In: *Encyclopedia of Physical Organic Chemistry*, American Cancer Society, pp. 1–68.
- Sharma R., Garg P., Kumar P., Bhatia S.K. & Kulshrestha S. 2020. Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Fermentation* 6: 106.
- Sharma A., Valo R., Kalúz M., Paulen R. & Fikar M. 2019. Implementation of optimal strategy to economically improve batch membrane separation. *Journal of Process Control* 76: 155–164.
- Shewry P.R., Napier J.A. & Tatham A.S. 1995. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *American Society of Plant Physiologists* 7: 945–956.
- Shi X., Tal G., Hankins N.P. & Gitis V. 2014. Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review. *Journal of Water Process Engineering* 1: 121–138.
- Siemensma A.D., Weijer W.J. & Bak H.J. 1993. The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends in Food Science & Technology* 4: 16–21.
- Silverstein T.P. 2011. Oxidation and Reduction: Too Many Definitions? *Journal of Chemical Education* 88: 279–281.
- Silvestre M.P.C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry* 60: 263–271.
- Sims K.A. & Cheryan M. 1992. Hydrolysis of liquefied corn starch in a membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 39: 960–967.
- Sitanggang A.B., Sumitra J. & Budijanto S. 2021. Continuous production of tempe-based bioactive peptides using an automated enzymatic membrane reactor. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 68: 102639.

- Skibsted L.H. 2010. Understanding oxidation processes in foods. In: *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*, Elsevier, pp. 3–35.
- Slizyte R., Rommi K., Mozuraityte R., Eck P., Five K. & Rustad T. 2016. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. *Biotechnology Reports* 11: 99–109.
- Song B., Zhang Y., Lu J., Pang X., Wei M., Zheng S., Zhang M., Zhang S. & Lv J. 2021. Effect of different diafiltration process on the protein fractionation of skim milk by cross flow microfiltration. *LWT* 152: 112330.
- Sousa R., Resende M.M., Giordano R.L.C. & Giordano R.C. 2003. Hybrid Model for an Enzymatic Reactor: Hydrolysis of Cheese Whey Proteins by Alcalase Immobilized in Agarose Gel Particles. In: Davison B.H., Lee J.W., Finkelstein M. & McMillan J.D. (eds.), *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 413–422.
- Souza T.G.F., Ciminelli V.S.T. & Mohallem N.D.S. 2016. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series* 733: 012039.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. & Isambert A. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87–96.
- Stade S., Kallioinen M., Tuuva T. & Mänttari M. 2015. Compaction and its effect on retention of ultrafiltration membranes at different temperatures. *Separation and Purification Technology* 151: 211–217.
- Stickel J.J., Adhikari B., Sievers D.A. & Pellegrino J. 2018. Continuous enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass in a membrane-reactor system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 93: 2181–2190.
- Su R.-X., Qi W. & He Z.-M. 2007. Time-dependent nature in peptic hydrolysis of native bovine hemoglobin. *European Food Research and Technology* 225: 637–647.
- Suárez-Jiménez G.M., Burgos-Hernández A., Torres-Arreola W., López-Saiz C.M., Velázquez Contreras C.A. & Ezquerra-Brauer J.M. 2019. Bioactive peptides from collagen hydrolysates from squid (*Dosidicus gigas*) by-products fractionated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science & Technology* 54: 1054–1061.
- Sulaiman Mohd.Z., Sulaiman N.M. & Abdellah B. 2001. Prediction of dynamic permeate flux during cross-flow ultrafiltration of polyethylene glycol using concentration polarization-gel layer model. *Journal of Membrane Science* 189: 151–165.
- SuperSmart.eu. 2022. Peptidea. <https://www.super-smart.eu/fr/boutique/stress-moral/peptidea-complement-0450>.
- Surówka K. & Fik M. 1996. Recovery of proteinaceous substances from chicken heads by proteolysis with trypsin. *Food / Nahrung* 40: 132–137.
- Swain S.D., Rohn T.T. & Quinn M.T. 2002. Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents. *Antioxidants & Redox Signaling* 4: 69–83.

- Tan S., Mailer R., Blanchard C., Agboola S. & Day L. 2014. Gelling properties of protein fractions and protein isolate extracted from Australian canola meal. *Food Research International* 62: 819–828.
- Tang N. & Zhuang H. 2014. Evaluation of Antioxidant Activities of Zein Protein Fractions. *Journal of Food Science* 79: C2174–C2184.
- Tauntong M., Sirinupong N. & Youravong W. 2014. Effect of Pre-Hydrolysis by Alcalase on Enzymatic Membrane Reactor Performance in Production of Low Molecular Weight Peptide from Nile Tilapia Skin Gelatin. *Agriculture and Natural Resources* 48: 929–941.
- Tayyib S. 2016. FAOSTAT, oilseed crop.
- Telford J.K. 2007. A Brief Introduction to Design of Experiments. *Johns Hopkins APL Technical Digest* 27: 9.
- Terre Univia. 2020. Colza - Les espèces cultivées - Cultures & utilisation - Terres Univia. <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/colza>.
- Tezera D. 1998. Improvement of pea protein quality by enzymatic modification. *Nahrung / Food*.
- The Dow Chemical Company. 2021. General concepts of the chemistry of chelation. [www.dow.com](http://www.dow.com).
- Theron L.W. & Divol B. 2014. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 8853–8868.
- Tilman D. & Clark M. 2014. Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature* 515: 518–522.
- Tolkach A. & Kulozik U. 2007. Reaction kinetic pathway of reversible and irreversible thermal denaturation of  $\beta$ -lactoglobulin. *Le Lait* 87: 301–315.
- Torres-Fuentes C., Alaiz M. & Vioque J. 2012. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry* 134: 1585–1588.
- Trusek-Holownia A. 2008. Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal* 39: 221–229.
- Trusek-Holownia A., Lech M. & Noworyta A. 2016. Protein enzymatic hydrolysis integrated with ultrafiltration: Thermolysin application in obtaining peptides. *Chemical Engineering Journal* 305: 61–68.
- Trusek-Holownia A. & Noworyta A. 2015. A model of kinetics of the enzymatic hydrolysis of biopolymers – a concept for determination of hydrolysate composition. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 89: 54–61.
- Tsibanov V., Loghinova T.A. & Nekludov A.D. 1985. Simulation of proteolysis in pH-controlled bioreactors. 1. Formulation of kinetic equations and determination of their parameters. 23: 10.

- Tsumura K., Kugimiya W., Bando N., Hiemori M. & Ogawa T. 1999. Preparation of Hypoallergenic Soybean Protein with Processing Functionality by Selective Enzymatic Hydrolysis. : 171–175.
- Udenigwe C.C. & Aluko R.E. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science* 77: R11–R24.
- University of Nebraska - Medical center. 2019. Antimicrobial Peptide Database. *APD3 - Antimicrobial Peptide Database*.
- Valencia P., Espinoza K., Ceballos A., Pinto M. & Almonacid S. 2015. Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry* 50: 589–597.
- Valencia P., Pinto M. & Almonacid S. 2014. Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry* 49: 258–264.
- Valta K., Damala P., Orli E., Papadaskalopoulou C., Moustakas K., Malamis D. & Loizidou M. 2015. Valorisation Opportunities Related to Wastewater and Animal By-Products Exploitation by the Greek Slaughtering Industry: Current Status and Future Potentials. *Waste and Biomass Valorization* 6: 927–945.
- Velasco L., Goffman F.D. & Becker H.C. 1998. Variability for the fatty acid composition of the seed oil in a germplasm collection of the genus Brassica. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 371–382.
- Vidal A.R., Ferreira T.E., Mello R. de O., Schmidt M.M., Kubota E.H., Demiate I.M., Zielinski A.A.F. & Dornelles R.C.P. 2018. Effects of enzymatic hydrolysis (Flavourzyme®) assisted by ultrasound in the structural and functional properties of hydrolyzates from different bovine collagens. *Food Science and Technology* 38: 103–108.
- Vioque J., Sánchez-Vioque R., Clemente A., Pedroche J., Yust M.M. & Millan F. 2001. Alcalase Rapeseed Inhibitors: Purification and Partial Characterization. *Journal of Enzyme Inhibition* 16: 81–87.
- Virdi A.S. & Singh N. 2017. Antimicrobial Peptides and Polyphenols: Implications in Food Safety and Preservation. In: Juneja V.K., Dwivedi H.P. & Sofos J.N. (eds.), *Microbial Control and Food Preservation*, Springer New York, New York, NY, pp. 117–152.
- Vizovišek M., Vidmar R., Drag M., Fonović M., Salvesen G.S. & Turk B. 2018. Protease Specificity: Towards In Vivo Imaging Applications and Biomarker Discovery. *Trends in Biochemical Sciences* 43: 829–844.
- Vorob'ev M.M. 1998. General kinetic model of proteolysis. *Nahrung / Food*: 173–174.
- Vorob'ev M.M., Paskonova E.A., Vitt S.V. & Belikov V.M. 1986. Kinetic description of proteolysis Part 2. Substrate regulation of peptide bond demasking and hydrolysis. Liquid chromatography of hydrolyzates. *Food / Nahrung* 30: 995–1001.
- Vorob'ev M.M., Vitt S.V. & Belikov V.M. 1987. Kinetic description of proteolysis. Part 3. Total kinetics of peptide bonds hydrolysis in peptide mixtures. *Die Nahrung* 31: 331–340.

- Vos H.J., Luyben K.Ch.A.M. & Westerterp K.R. 1993. Design strategy and process optimization for reactors with continuous transport of an immobilized enzyme. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal* 53: B1–B11.
- Wali A., Ma H., Rashid M.T. & Liang Q.F. 2017. Preparation of rapeseed protein hydrolysates with ACE inhibitory activity by optimization and molecular weight distribution of hydrolysates. *Turkish Journal of Biochemistry* 42.
- Wanasundara J.P.D. 2011. Proteins of Brassicaceae Oilseeds and their Potential as a Plant Protein Source. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51: 635–677.
- Wanasundara J.P.D., McIntosh T.C., Perera S.P., Withana-Gamage T.S. & Mitra P. 2016. Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *OCL* 23: D407.
- Wang Z., Cui Y., Wu W., Ji S., Yao J., Zhang H. & Zhao X. 2009. The convective model of flux prediction in a hollow-fiber module for a steady-state cross-flow microfiltration system. *Desalination* 238: 192–209.
- Wang L., Ding L., Wang Y., Zhang Y. & Liu J. 2015a. Isolation and Characterisation of in Vitro and Cellular Free Radical Scavenging Peptides from Corn Peptide Fractions. *Molecules* 20: 3221–3237.
- Wang L.-S., Huang J.-C., Chen Y.-L., Huang M. & Zhou G.-H. 2015b. Identification and Characterization of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Duck Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3437–3444.
- Wang C., Li B. & Ao J. 2012. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn<sup>2+</sup> and LC-MS/MS. *Food Chemistry* 134: 1231–1238.
- Wang J., Su Y., Jia F. & Jin H. 2013. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chemistry Central Journal* 7: 1–8.
- Wei J.-T. & Chiang B.-H. 2009. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 372–378.
- Whitaker J.R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences, Second Edition*. Marcel Dekker Inc.
- Whitehurst R.J. & Oort M. van (eds.). 2010. *Enzymes in food technology*. Wiley-Blackwell, Chichester, U.K. ; Ames, Iowa.
- Wilson S., Blaschek K. & Mejia E.G. de. 2005. Allergenic Proteins in Soybean: Processing and Reduction of P34 Allergenicity. *Nutrition Reviews* 63: 47–58.
- Wolff I.A. & Wasserman A.E. 1972. Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines. *Science* 177: 15–19.
- Woo G.-J. & McCord J.D. 1994. Bioconversion of starches into maltotetraose using *Pseudomonas stutzeri* maltotetraohydrolase in a membrane recycle bioreactor: Effect of multiple enzyme systems and mass balance study. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 1016–1020.

- Wu S., Qi W., Li T., Lu D., Su R. & He Z. 2013. Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chemistry* 141: 2944–2951.
- www.uniprot.org - UniProtKB/Swiss-Prot.
- Wyatt Technology. Understanding Dynamic Light Scattering. <https://www.wyatt.com/library/theory/dynamic-light-scattering-theory.html>.
- Xue Z., Yu W., Liu Z., Wu M., Kou X. & Wang J. 2009a. Preparation and Antioxidative Properties of a Rapeseed (*Brassica napus*) Protein Hydrolysate and Three Peptide Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5287–5293.
- Xue Z., Yu W., Wu M. & Wang J. 2009b. *In Vivo* Antitumor and Antioxidative Effects of a Rapeseed Meal Protein Hydrolysate on an S180 Tumor-Bearing Murine Model. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 2412–2415.
- Yamanishi R., Tsuji H., Bando N., Yamada Y., Nadaoka Y., Huang T., Nishikawa K., Emoto S. & Ogawa T. 1996. Reduction of the Allergenicity of Soybean by Treatment with Proteases. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 42: 581–587.
- Yan F., Cui H., Zhang Q., Hayat K., Yu J., Hussain S., Tahir M.U., Zhang X. & Ho C.T. 2021. Small Peptides Hydrolyzed from Pea Protein and Their Maillard Reaction Products as Taste Modifiers: Saltiness, Umami, and Kokumi Enhancement. *Food and Bioprocess Technology* 14: 1132–1141.
- Yan Q.-J., Huang L.-H., Sun Q., Jiang Z.-Q. & Wu X. 2015. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. *Food Chemistry* 179: 290–295.
- Yao K.Z., Shaw B.M., Kou B., McAuley K.B. & Bacon D.W. 2003. Modeling Ethylene/Butene Copolymerization with Multi-site Catalysts: Parameter Estimability and Experimental Design. *Polymer Reaction Engineering* 11: 563–588.
- Yeh H.M., Chen H.Y. & Chen K.T. 2000. Membrane ultrafiltration in a tubular module with a steel rod inserted concentrically for improved performance. *Journal of Membrane Science* 168: 121–133.
- Yeh H.M., Cheng T.W. & Wu H.H. 1998. Membrane ultrafiltration in hollow-fiber module with the consideration of pressure declination along the fibers. *Separation and Purification Technology* 13: 171–180.
- Yeh H.M., Wu H.P. & Dong J.F. 2003. Effects of design and operating parameters on the declination of permeate flux for membrane ultrafiltration along hollow-fiber modules. *Journal of Membrane Science* 213: 33–44.
- Yin L.-J., Hsu T.-H. & Jiang S.-T. 2013. Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 662–666.
- Ylitalo R., Lehtinen S., Wuolijoki E., Ylitalo P. & Lehtimäki T. 2002. Cholesterol-lowering Properties and Safety of Chitosan. *Arzneimittelforschung* 52: 1–7.

- Yoshie-Stark Y., Wada Y. & Wäsche A. 2008. Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry* 107: 32–39.
- Yu W., Gao J., Xue Z., Kou X., Wang Y. & Zhai L. 2013. Radical-scavenging activity, ACE-inhibiting capability and identification of rapeseed albumin hydrolysate. *Food Science and Human Wellness* 2: 93–98.
- Zapata-Montoya J.E., Giraldo-Rios D.E., Baéz-Suarez A.J., Zapata-Montoya J.E., Giraldo-Rios D.E. & Baéz-Suarez A.J. 2018. Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of proteins of visceras from Red Tilapia (*oreochromis* sp.): Effect of substrate and enzyme concentration. *Vitae* 25: 17–25.
- Zarei M., Ghanbari R., Tajabadi N., Abdul-Hamid A., Bakar F.A. & Saari N. 2016. Generation, Fractionation, and Characterization of Iron-Chelating Protein Hydrolysate from Palm Kernel Cake Proteins. *Journal of Food Science* 81: C341–C347.
- Zaslhoff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389–395.
- Zeng Y., Chen E., Zhang X., Li D., Wang Q. & Sun Y. 2022. Nutritional Value and Physicochemical Characteristics of Alternative Protein for Meat and Dairy—A Review. *Foods* 11: 3326.
- Zhang L., Li J. & Zhou K. 2010. Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource Technology* 101: 2084–2089.
- Zhang J. & Tao A. 2015. Antigenicity, Immunogenicity, Allergenicity. In: Tao A. & Raz E. (eds.), *Allergy Bioinformatics*, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 175–186.
- Zhang N., Zhang C., Chen Y. & Zheng B. 2016. Purification and Characterization of Antioxidant Peptides of *Pseudosciaena crocea* Protein Hydrolysates. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 22: 57.
- Zhao X. & Hou Y. Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates. *African Journal of Biotechnology* 8: 3314–3319.
- Zheng Y., Zhang W., Tang B., Ding J., Zheng Y. & Zhang Z. 2018. Membrane fouling mechanism of biofilm-membrane bioreactor (BF-MBR): Pore blocking model and membrane cleaning. *Bioresource Technology* 250: 398–405.
- Zhou C. 2016. Hydrolysis of rapeseed meal protein under simulated duodenum digestion: Kinetic modeling and antioxidant activity. *Food Science and Technology* 68: 523–531.
- Zio E., Baraldi P. & Pedroni N. 2009. Optimal power system generation scheduling by multi-objective genetic algorithms with preferences. *Reliability Engineering & System Safety* 24: 432–444.
- Zydney A.L. 1997. Stagnant film model for concentration polarization in membrane systems. *Journal of Membrane Science* 130: 275–281.

Масленникова (RU) Е.В., Масленникова Е.В., Черевач (RU) Е.И., Черевач Е.И., Юдина (RU) Т.П., Юдина Т.П., Цыбулько (RU) Е.И., Цыбулько Е.И., Мясоденкова (RU) Т.С., Мясоденкова Т.С., Бабин (RU) Ю.В. & Бабин Ю.В. 2009. Mayonnaise and protein sauce preparation method. RU 2372797 C1.

## Résumé

La protéolyse enzymatique est un procédé couramment utilisé pour améliorer les propriétés technico-fonctionnelles des protéines. Or, l'utilisation des enzymes et le mode de mise en œuvre en *batch* rend le coût de production élevé, ce qui est répercuté sur le prix des produits. L'implémentation continue par le couplage de réaction de protéolyse et la séparation membranaire au sein de « Réacteurs Enzymatiques à Membrane » (REM) permet de limiter sensiblement ce coût par le recyclage du catalyseur. Cependant, leur développement pose également des problématiques techniques, qui augmentent leur coût et ainsi limitent leur généralisation. Pour réduire les coûts liés au développement des REM, les présents travaux ont permis de développer une méthodologie et un outil de simulation de REM, basés sur la modélisation de production d'un hydrolysate d'intérêt et de criblages de conditions optimales de séparation. Pour ce faire, dans un premier temps, une modélisation hybride – qui relie les conditions opératoires aux paramètres cinétiques – a été réalisée pour optimiser la production en *batch* d'un hydrolysate d'intérêt avec une double valorisation possible. Puis, la mise en œuvre en ultrafiltration de cet hydrolysate optimal a été étudiée afin de déterminer les meilleurs paramètres de séparation pour atteindre les objectifs de purification protéique et rendement peptidique, qui étaient repris pour l'implémentation en mode continu. Enfin, la modélisation par bilan de matière de l'ultrafiltration pour chaque composant a été combinée à la modélisation du taux de réaction de chaque composant de la protéolyse. La modélisation a permis de simuler avec succès le fonctionnement d'un REM dans différentes configurations, et a été validée avec une mise en œuvre expérimentale. L'outil de simulation permet de déterminer les paramètres et les conditions opératoires d'une mise en œuvre continue avec un minimum de manipulations expérimentales simples.

**Mots-clefs :** Réacteur enzymatique à membrane, hydrolysats, protéolyse enzymatique, ultrafiltration, modélisation, simulation.

## Abstract

Enzymatic proteolysis is a frequently used process to improve the technical-functional protein's properties. However, enzymes use and batch process mean that production costs are high, which has an impact on product price. Continuous implementation of a coupled proteolysis reaction with membrane separation in "Enzymatic Membrane Reactors" (EMR) allows decreasing significantly this cost by recycling the catalyst. However, their development also encounters technical problems which increase costs and thus their use is limited. To reduce the costs related to the EMR development, the present research has developed a methodology and a simulation tool for modeling EMR, based on the hydrolysate of interest production modeling and screening of optimal separation conditions. To do so, a hybrid modeling – which allows correlating operating conditions to kinetic parameters – was carried out to optimize batch production of a hydrolysate of interest, with the aim of a double valorisation. Then, the ultrafiltration implementation of this optimal hydrolysate was studied to determine the best separation parameters to meet the expected levels of protein purification and peptide yield, which were taken further for continuous mode implementation. Finally, ultrafiltration mass balance modeling for each component was combined with reaction rate modeling of each proteolysis component. The modeling successfully simulated EMR process in different configurations, and was validated with an experimental implementation. The simulation tool determines the best parameters and operating conditions for a continuous implementation with a minimum of elementary experimental manipulations.

**Keywords :** Enzymatic membrane reactor, hydrolysates, enzymatic proteolysis, ultrafiltration, modeling, simulation.