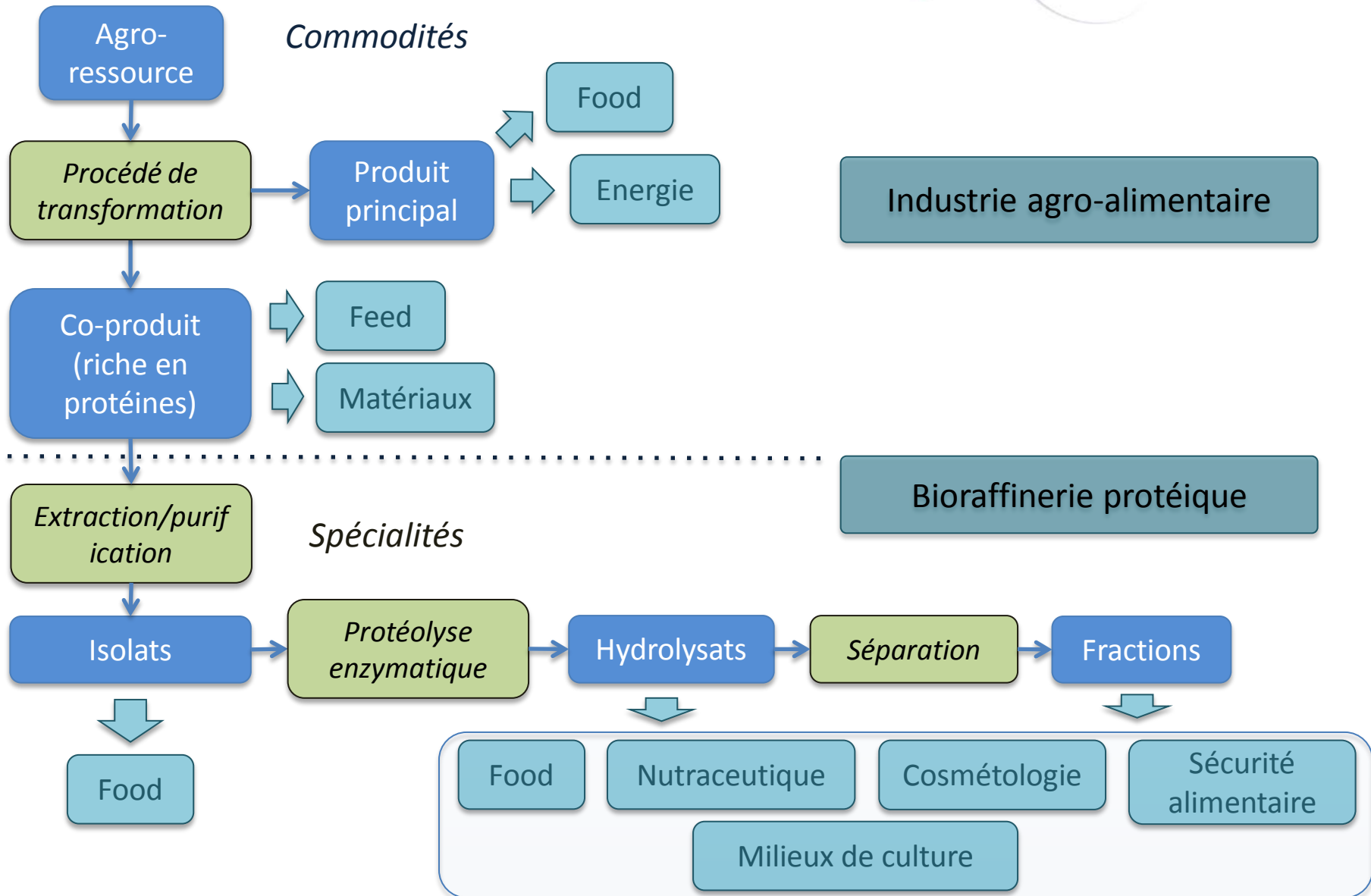
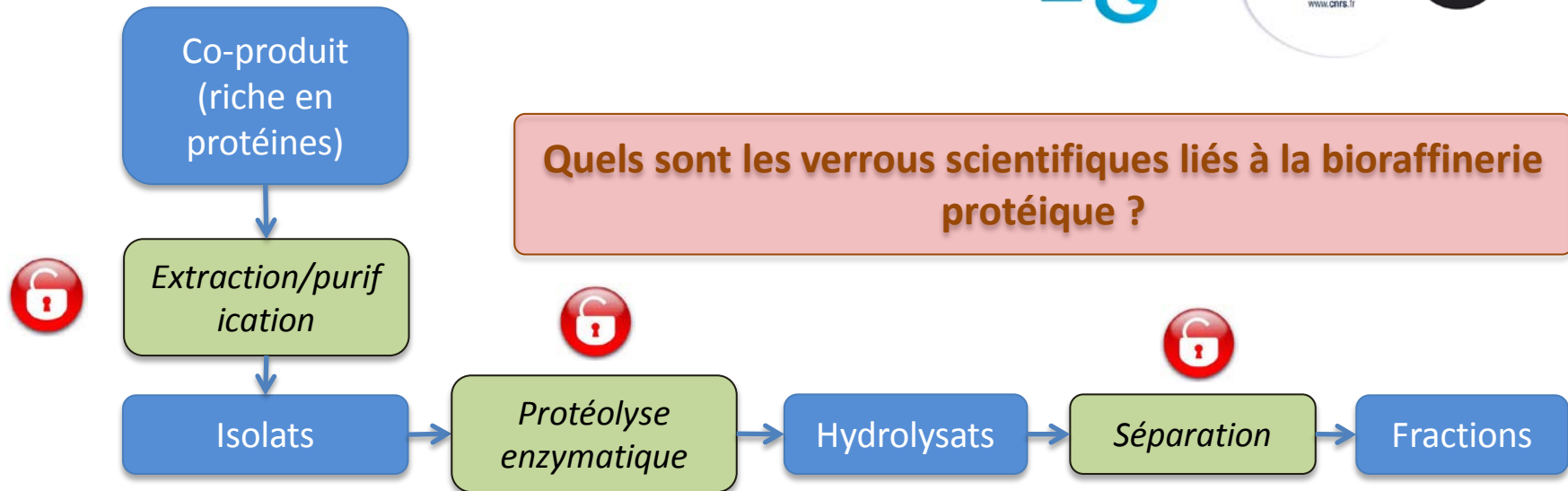


Apports du génie des procédés pour lever des verrous liés à l'extraction, purification et transformation des protéines d'agro-ressources végétales

Romain KAPEL

*L.R.G.P.- U.M.R. C.N.R.S. 7274
Université de Lorraine, Nancy*





Verrou scientifique sur l'extraction/purification :

Optimisation complexe en raison du nombre de conditions opératoires et de critères de performances important.

Verrous scientifiques sur la protéolyse enzymatique:

- la maîtrise de l'obtention des hydrolysats et peptides d'intérêts,
- La caractérisation des hydrolysats complexes.

Verrous scientifiques sur la séparation des hydrolysats complexes:

- Maîtrise des procédés de séparation,
- Développement de procédés innovants à sélectivité et productivité élevés.

Co-produit
(riche en
protéines)

Extraction/purification

Isolats

Protéolyse
enzymatique

Hydrolysats

Séparation

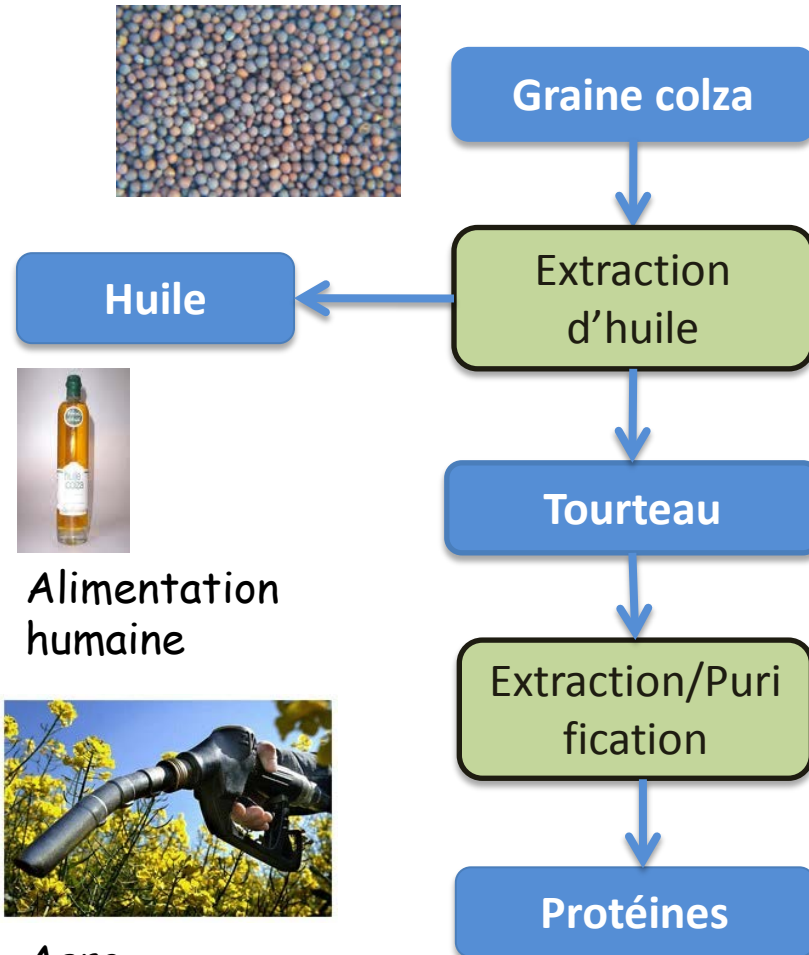
Fractions

LRGP travail au développement de méthodologies pour lever les verrous liés à la bioraffinerie protéique

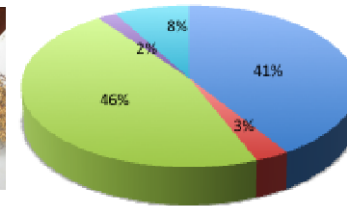
Méthodologie d'optimisation multicritère d'une extraction S/L des protéines (application à l'extraction des albumines de tourteau de colza)

Méthodologie de caractérisation rapide des hydrolysats protéiques complexes

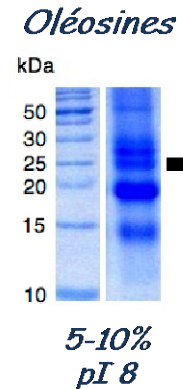
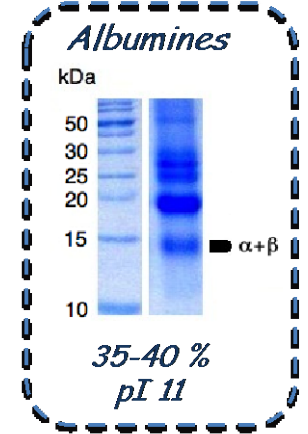
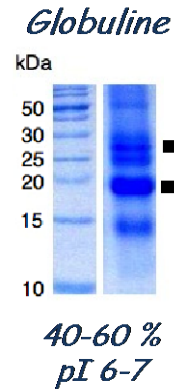
Méthodologie de prédiction des performances de l'UF pour l'enrichissement d'hydrolysats complexes en peptides d'intérêts



Filière Oléo-protéagineux (colza)



- Proteins
- Lipids
- total sugars
- polyphenols
- Ashes



Agro-carburants/chimie verte

- Tourteau de colza (2,5 M T/an) riche en protéines: ressource crédible de protéines végétales,
- Albumines présentent des propriétés très intéressantes.

En quoi consiste une extraction solide/liquide de protéines ?

Nombreux paramètres

- pH d'extraction
- Ratio S/L
- Force ionique
- Température
- ...



Nombreux critères...

- Rendement
- Pureté sur MS
- Concentration

- Structure
- Complex. phenol.
- Fonctionnalité

Quantitatifs

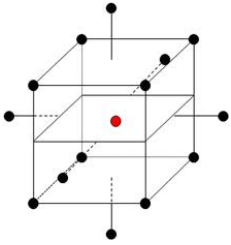
Qualitatifs

Le problème réside dans le caractère antagoniste des critères (la maximisation ou minimisation des uns est au détriment de la maximisation ou minimisation des autres)

Utilisation d'une méthodologie d'optimisation multicritère développée au LRGP



1- Criblage des facteurs les plus influents



2- Modélisation de l'influence des facteurs



3- Optimisation multicritère

Modèles issus de régressions Polynomiales (plan d'expériences)

Calcul et sélection des solutions acceptables pour des critères antagonistes (Pareto) par couplage des modèles à des algorithmes évolutionnaires

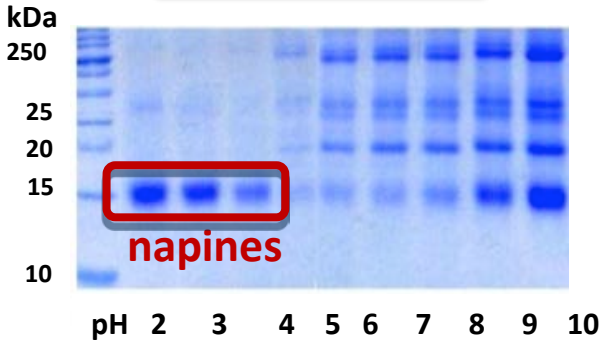
Intervention du décideur

Définition des règles de préférence en fonction des critères (Génie décisionnel)

Sélection d'une condition optimale

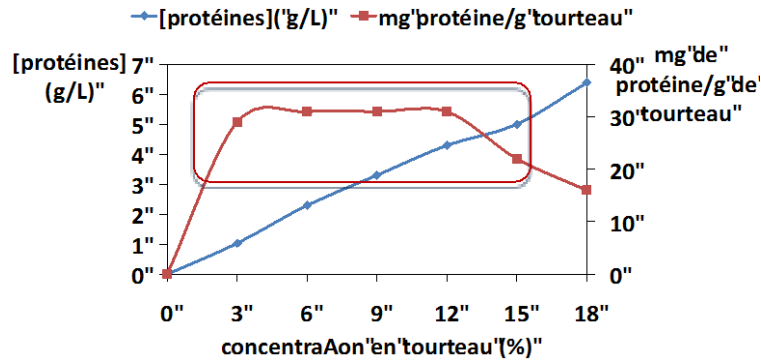
Application à l'extraction des albumines de colza (criblage des conditions opératoires)

pH



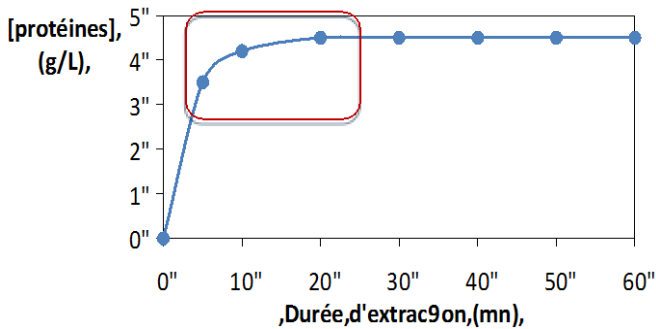
2 < pH < 4

ratio S/L



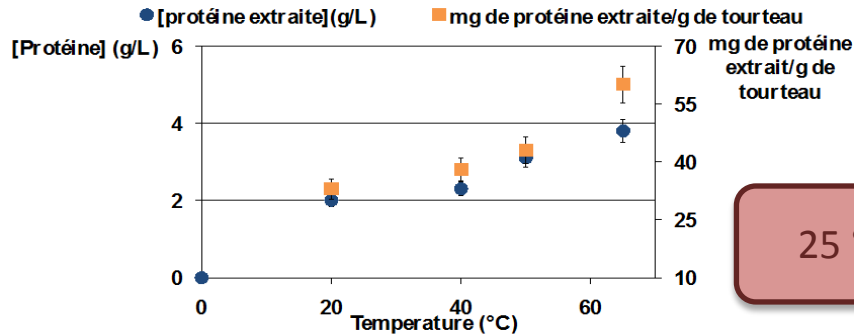
3 % < tourteau / eau < 15 %

Durée



10 mn < durée < 20 mn

Température



25 °C < T < 65 °C

Application à l'extraction des albumines de colza (modélisation polynomiale)

Construction de la matrice expérimentale

Facteurs	Niveau		
	(-1) faible	(0) centre	(+1) élevé
pH	2	3	4
Solide/liquide (%)	3	9	15
T (°C)	25	45	65
Durée (mn)	10	15	20

5 critères sont considérés

- Rendement (max), pureté (max), concentration (max)
- Consommation HCl (min)
- Association phenols-protéines (min)

Expérimentation (27 conditions opératoires)

Outil de régression polynomiale

Modèles

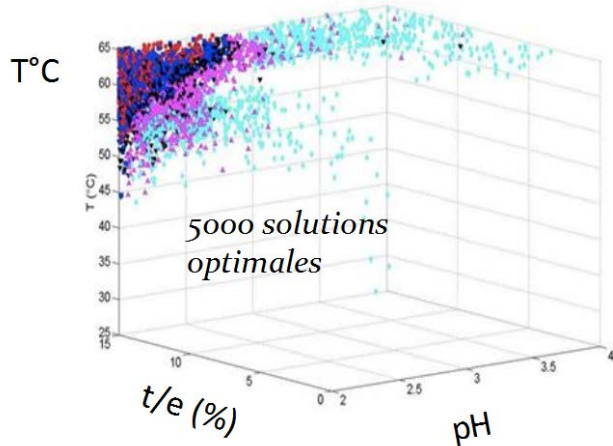
$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i X_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i,j=1 \\ j < i}}^n a_{ij} X_i X_j$$

Application à l'extraction des albumines de colza (optimisation multicritères)

Utilisation des modèles pour le calcul de combinaisons de performances



Identification des solutions « non dominées » (*Pareto*)



Ensemble des solutions non-dominées (*algorithme évolutionnaire*)

Définition des règles de préférence en fonction des critères (*Génie décisionnel*)

Classement parmi 5 combinaisons critères non dominées



Sélection des meilleurs compromis



Sélection de la solution optimale parmi les combinaisons de conditions sélectionnées

Conditions opératoires de la solution optimale

conditions opératoires	
pH	2
tourteau/eau (%)	13
T (°C)	57
Durée (mn)	15

Valeur des critères dans ces conditions

	[napines]g/L	Pureté (%)	Rendement	HCl (5N)
Théorique	2,1	8,2	9,9	8,6
Expérimental	2,5 ± 0,5	9,8 ± 0,65	11 ± 0,40	8,8 ± 0,21

Bonne adéquation calcul/expérience (du à la fiabilité de la modélisation polynomiale)

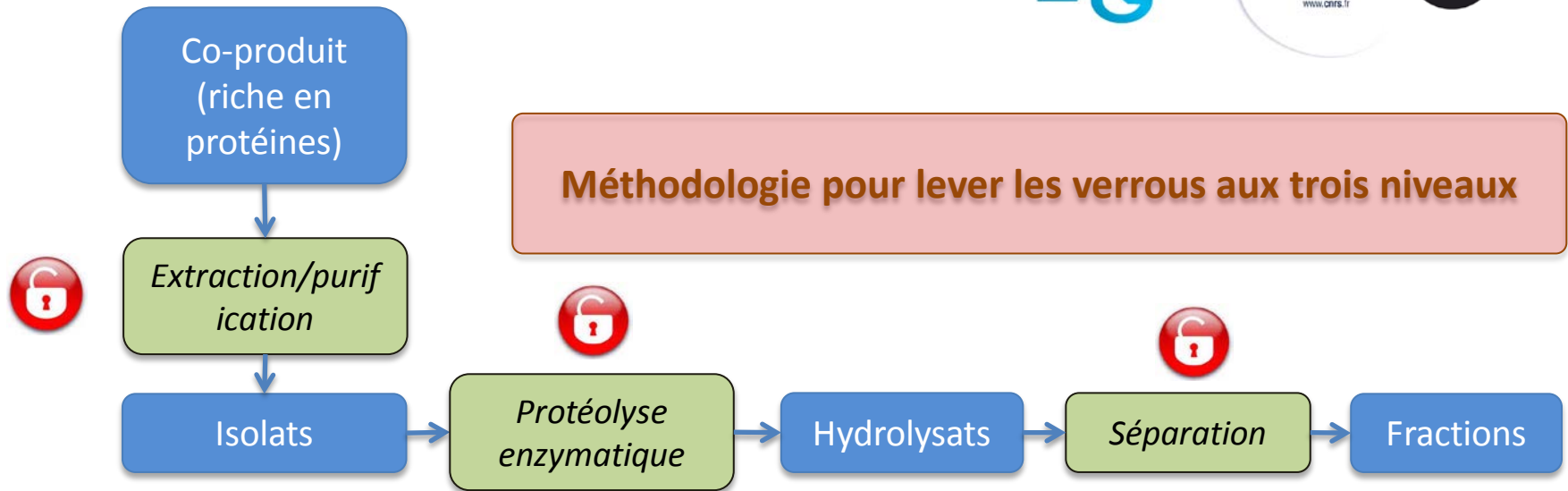
On dispose donc...

D'une méthodologie fiable (qui repose sur la qualité et représentativité des modèles générés)

D'une méthodologie générique à l'optimisation de l'extraction de n'importe quelle autre protéine à partir de n'importe quelle autre source

Perspective

Adaptation pour l'identification de conditions opératoires d'extraction permettant l'extraction de protéines cibles qui présentent des niveaux de fonctionnalité donnés (correspondant à des standards de protéines « concurrentes »)

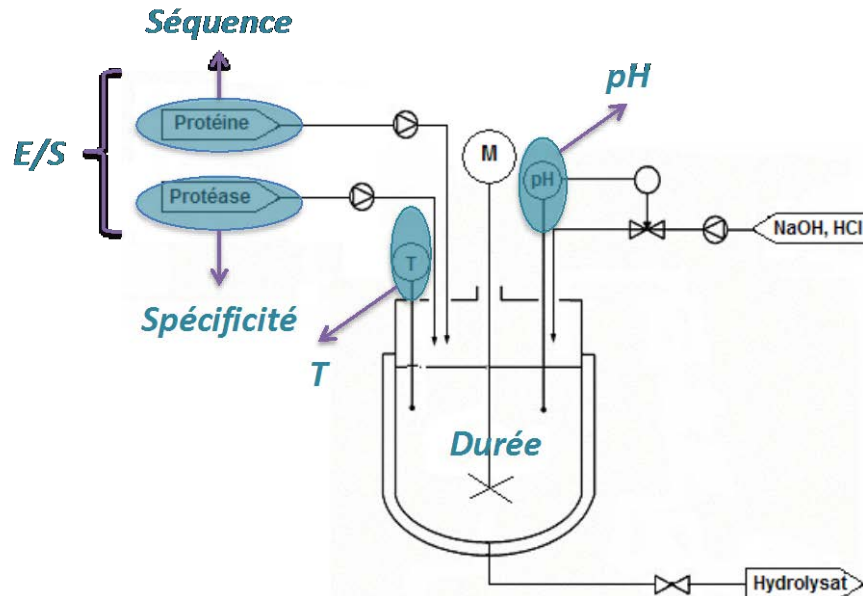


Méthodologie d'optimisation multicritères d'une extraction S/L des albumines de tourteau de colza

Méthodologie de caractérisation rapide des hydrolysats protéiques complexes

Méthodologie de prédiction des performances de l'UF pour l'enrichissement d'hydrolysats complexes en peptides d'intérêts

Hydrolyse des liaisons peptidiques entre certains acides aminés catalysée par des enzymes (protéases)



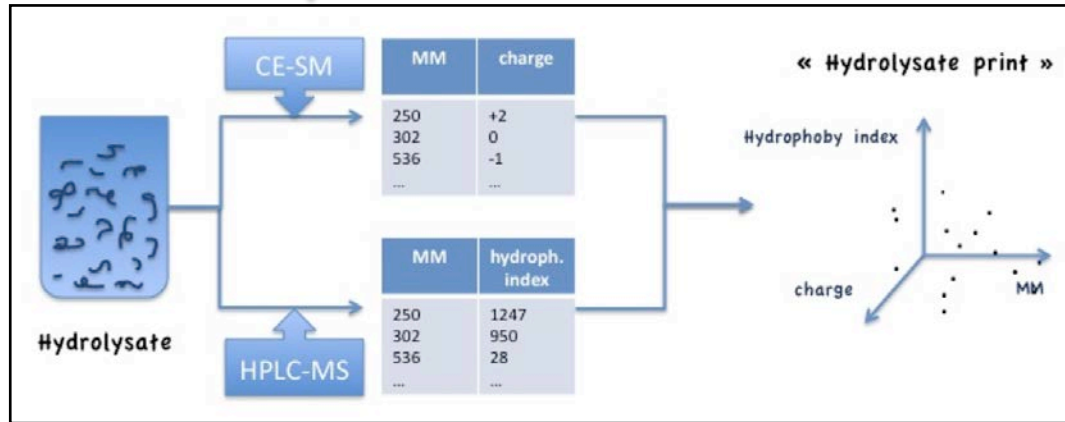
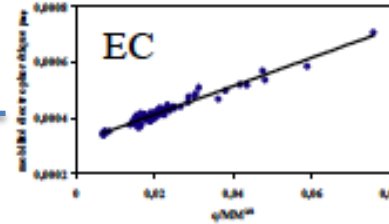
Obtention de mélanges peptidiques (fragments) complexes, fonction de:

- E/S,
- Séquence protéine,
- Spécificité de l'enzyme,
- pH,
- T
- Durée de la réaction

Les performances des hydrolysats sont liés aux propriétés des peptides qui le composent (MM, q, iH etc...), Comment caractériser les peptides qui composent le mélange (MM, q, iH etc.) ?

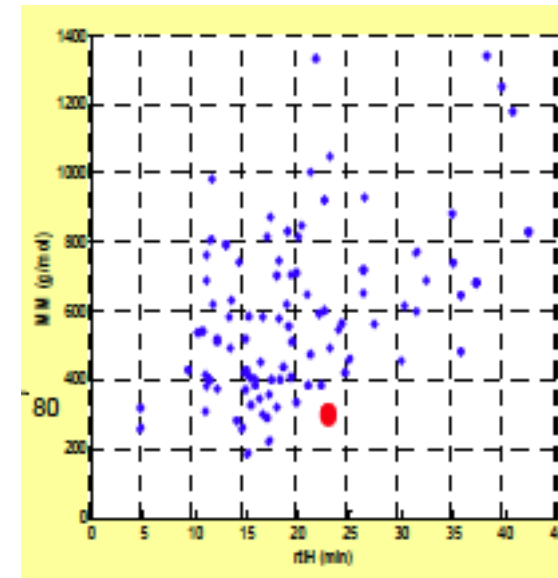
Electrophorèse capillaire

Modèle: $\mu = f(MW, q)$

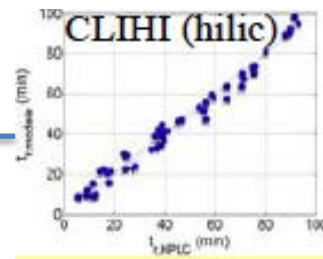


Exemple

Cartographie 2D d'un hydrolysate (RuBisCO)



Modèle: $TR = f(iH/ih)$



CLHP-PI, PN

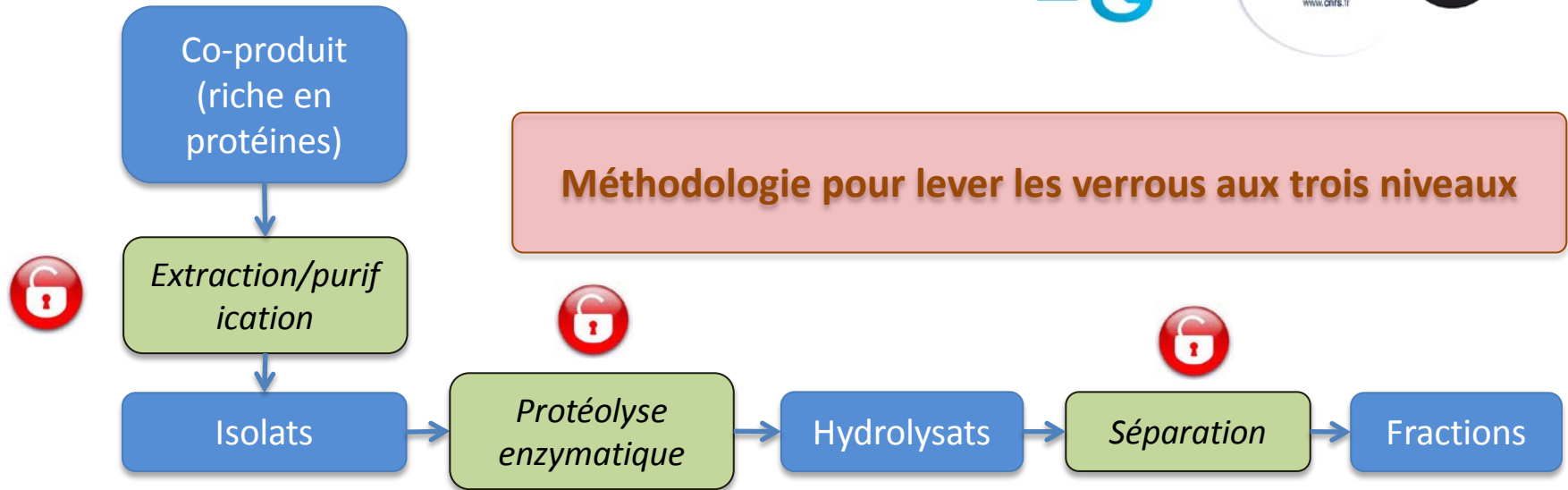
Utilité des cartographies à deux niveaux:

Choix des procédés de séparation appropriés pour l'enrichissement en un peptide cible

Outil d'identification de corrélations entre propriétés physico-chimiques et fonctionnalité des mélanges

Et aussi...

Elucidation rapide de la composition en acides aminés des peptides qui composent le mélange (outil d'identification de séquence)



Méthodologie d'optimisation multicritères d'une extraction S/L des albumines de tourteau de colza

Méthodologie de caractérisation rapide des hydrolysats protéiques complexes

Méthodologie de prédiction des performances de l'UF pour l'enrichissement d'hydrolysats complexes en peptides d'intérêts

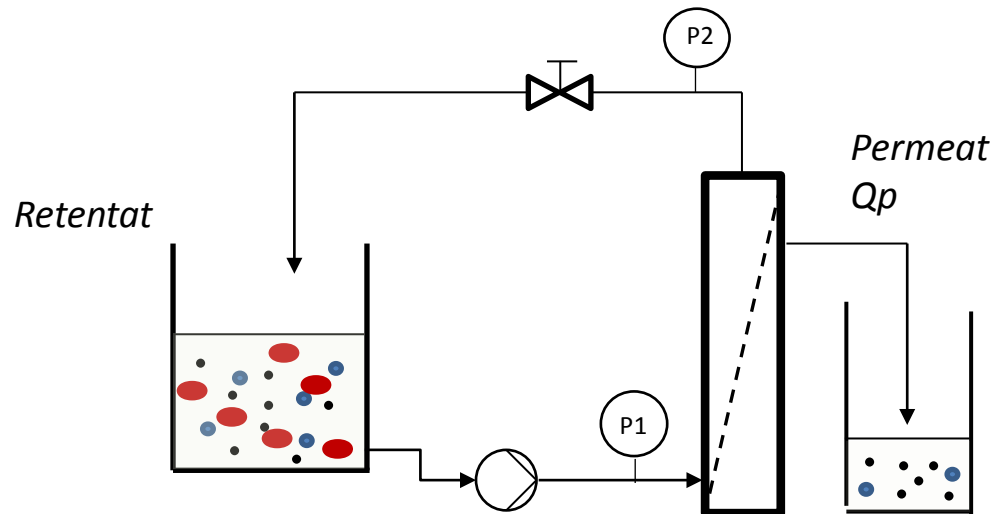
Productivité
élevée

Mise en œuvre et
extrapolation simple

Faible coût de mise
en oeuvre

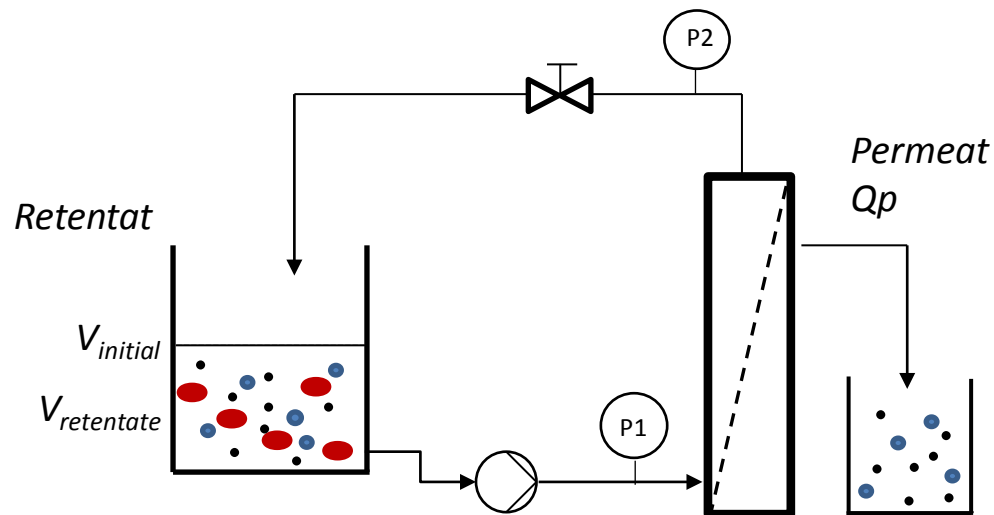
Pas de solvants

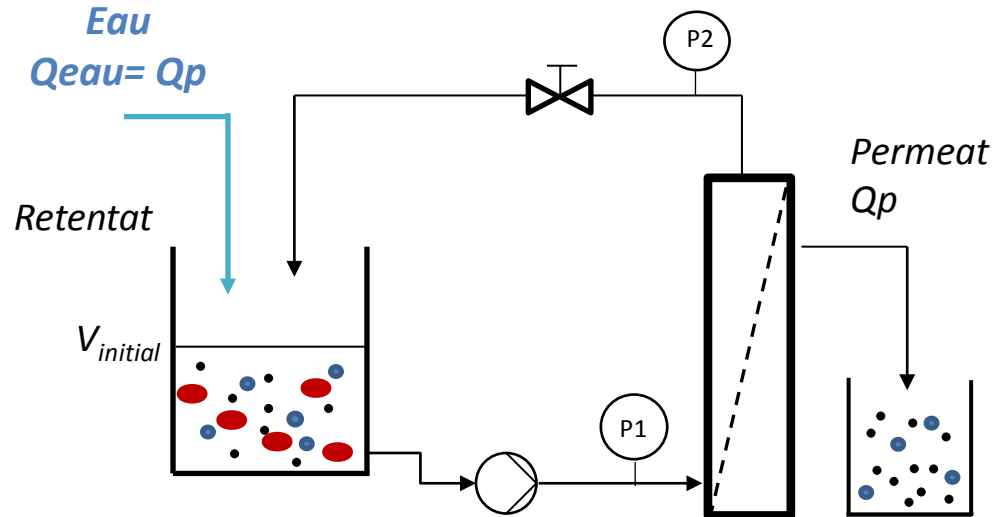
Deux types de mise en oeuvre



Deux types de mise en oeuvre

Batch (concentration)





Deux types de mise en œuvre :

Batch concentration

Diafiltration



Mise en œuvre
empirique

Développement d'une méthodologie de prédiction des performances de l'UF pour l'enrichissement en peptides cibles (rendement et enrichissement)

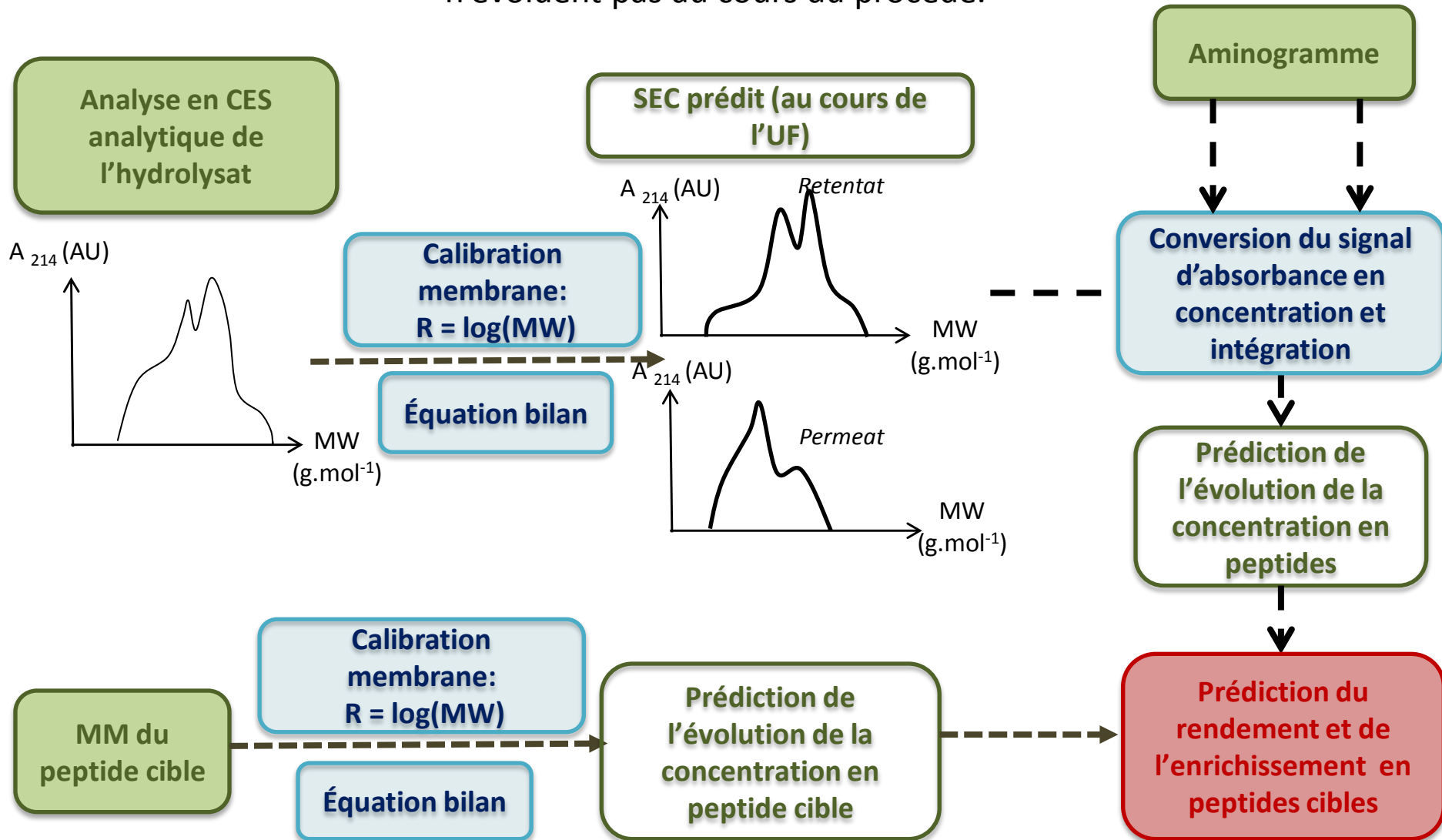
Equations bilan de matière en UF (simples)

		Yield (η_x)	Enrichment (τ_x)	Relative peptide concentration from mass balances [30] ($\frac{C_{p,x}}{C_{0,x}}$ or $\frac{C_{r,x}}{C_{0,x}}$ in permeate or retentate respectively)
Generic formula		$\frac{C_x V}{C_{0,x} V_0}$	$\frac{P_x}{P_{0,x}}$	
Batch concentration	Permeate	$\frac{C_{p,x}}{C_{0,x}} \left(1 - \frac{1}{VRF}\right)$	$\frac{C_{p,x}}{C_{0,x}} * \frac{\sum_i C_{0,i}}{\sum_i C_{p,i}}$	$\left(1 - \frac{k_x}{VRF}\right)^{-1}$
	Retentate	$\frac{C_{r,x}}{C_{0,x}} \left(\frac{1}{VRF}\right)$	$\frac{C_{r,x}}{C_{0,x}} * \frac{\sum_i C_{0,i}}{\sum_i C_{r,i}}$	$(1 - k_x) * \left(1 - \frac{k_x}{VRF}\right)^{-1}$
Continuous diafiltration	Permeate	$\frac{C_{p,x}}{C_{0,x}} * DV$	$\frac{C_{p,x}}{C_{0,x}} * \frac{\sum_i C_{0,i}}{\sum_i C_{p,i}}$	$1 - \frac{e^{(RR_x-1)+DV}}{DV}$
	Retentate	$\frac{C_{r,x}}{C_{0,x}}$	$\frac{C_{r,x}}{C_{0,x}} * \frac{\sum_i C_{0,i}}{\sum_i C_{r,i}}$	$\frac{e^{(RR_x-1)+DV}}{DV}$

Evolution de C dépend de l'avancement du système et d' une seule variable liée au transfert : rétention des peptides (R)

La difficulté réside dans le fait de devoir appliquer ces équations à tous les peptides du mélange !!

Hypothèses: Retention R des peptides ne dépendent que de leur masse molaire et n'évoluent pas au cours du procédé.



Validation de la méthodologie avec le Lactium®

- ▶ Hydrolysât commercial (Ingredia).
- ▶ Hydrolysât trypsique de caseines.
- ▶ Lactium contient un peptide bioactif (morphinomimétique “propriety relaxante”).

Sequence : YLGYLEQLLR

MW = 1267 g.mol⁻¹

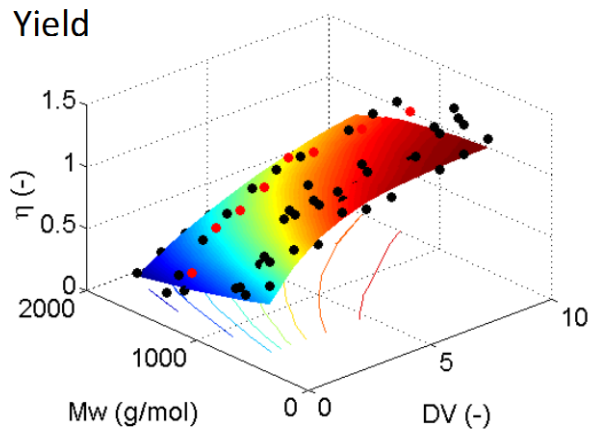
- ▶ Utilisé dans la formulation de produits nutraceutiques



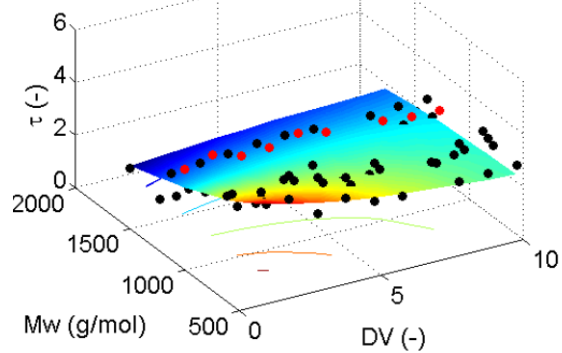
Validation en suivant 7 peptides (points noirs) incluant le peptide bioactif (point rouge).

Conditions opératoires: 3kDa NMWCO en mode diafiltration.

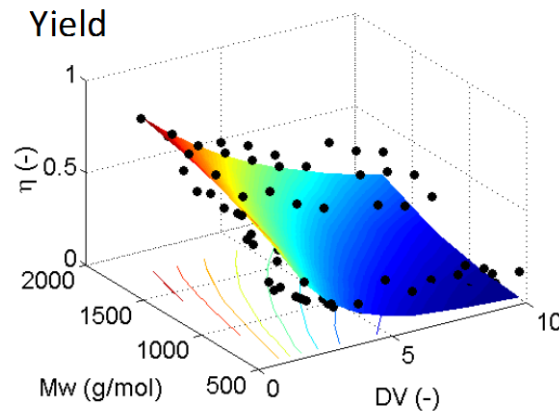
Permeate



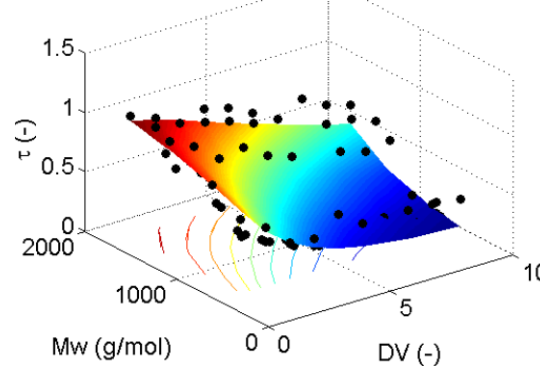
Enrichment



Retentate



Enrichment



Bonne correspondance
entre calcul (surface) et
expérience (points)

Résultat sur le peptide
bioactif :

Rendement de 95 %
et

Enrichissement de 2,5
après 10 DV

Conclusion

- ▶ Bonne capacité de prédiction de la méthodologie,
- ▶ Méthode fiable validée avec d'autres mélanges, d'autres seuils de coupures
- ▶ Permet un choix en amont des seuils de coupures, des modes de mise en œuvre appropriées et une identification des compartiments d'enrichissement

Perspectives

- ▶ Utilisation de la méthodologie pour l'optimisation multicritère du système (minimisation des durées de mise en œuvre et de consommation d'eau) pour des enrichissement et rendement donnés,
- ▶ Ce qui nécessite d'intégrer des notions d'évolution de flux de permeal au cours du procédé

Remerciements

- ▶ Frantz FOURNIER (optimisation multicritère),
- ▶ Christelle HARSCOAT-SHIAVO (analyse peptidique avancée),
- ▶ Xavier FRAMBOISIER (mise en œuvre des analyses),
- ▶ Arnaud AYMES (séparation préparative),
- ▶ Bertrand TESSIER, Claudia NIOI, Alice BODIN (thèse),
- ▶ Ivan MARC