

Procédés d'obtention et de séparation de protéines et de peptides bioactifs résultants

Rénato FROIDEVAUX

Journée Promotion Procédés Produits - Nancy le 9 juillet 2015

Institut régional de recherche en agroalimentaire et biotechnologie



Institut
Charles
Viollette

1- Adaptation aux Stress et Qualité des végétaux (ASQV) USC INRA

(35 permanents: 4PR, 14 MCF, 1CR INRA,

3IR dont 1 INRA, 1IE, 2 AI, 2 Tech, 6 agents, 2 secrétaires)

J.L. HILBERT

Mécanismes d'adaptation des plantes et des bio-agresseurs en interactions avec l'environnement

Identification et production de métabolites d'intérêt

2- Qualité et sécurité des aliments (QSA) USC ANSES

(17 permanents: 2PR, 12 MCF, 2 IGE, 1Tech)

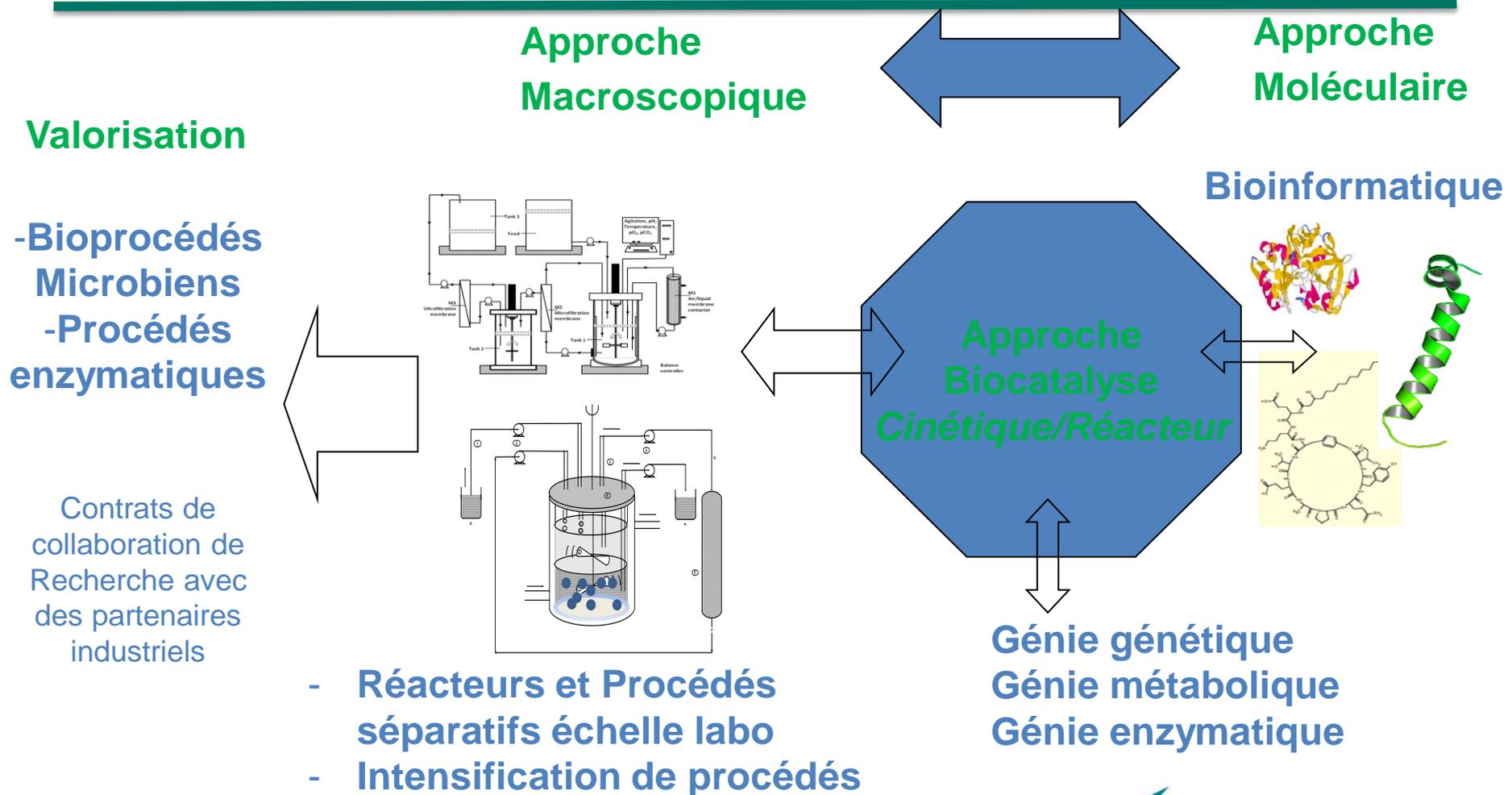
D. DRIDER

Développement de méthodes et de concepts pour la maîtrise de la qualité et de la sécurité des aliments

1- ProBioGEM (29 permanents: 5 PR, 19 MCF, 2 IGR, 2 Tech., 1 Secrétaire)

P. DHULSTER

Equipe ProBioGEM: Notre stratégie de Recherche



Contexte

Protéines agroalimentaires issues de la luzerne, du lactosérum, du sang (cruor), produits de la pêche...

⇒ Hydrolyse enzymatique

⇒ Trypsine, chymotrypsine, pepsine, Delvolase...

Recherche de séquences peptidiques actives à partir de l'hydrolyse *in vitro* ou *in vivo* de protéines

↓
Peptides antihypertensifs, satiants, opioïdes, antimicrobiens...

Conditions de génération de peptides actifs en réacteurs de type « batch » et « ouverts »

Propriétés physico-chimiques peptides → Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs

↓ ↓
Conception et mise en œuvre de procédés couplés

Protéines agroalimentaires issues de la luzerne, du lactosérum, du sang (cruor), produits de la pêche...

⇒ Hydrolyse enzymatique

⇒ Trypsine, chymotrypsine, pepsine...

Recherche de séquences peptidiques actives à partir de l'hydrolyse *in vitro* ou *in vivo* de protéines

Peptides antihypertensifs, satiants, opioïdes, antimicrobiens...

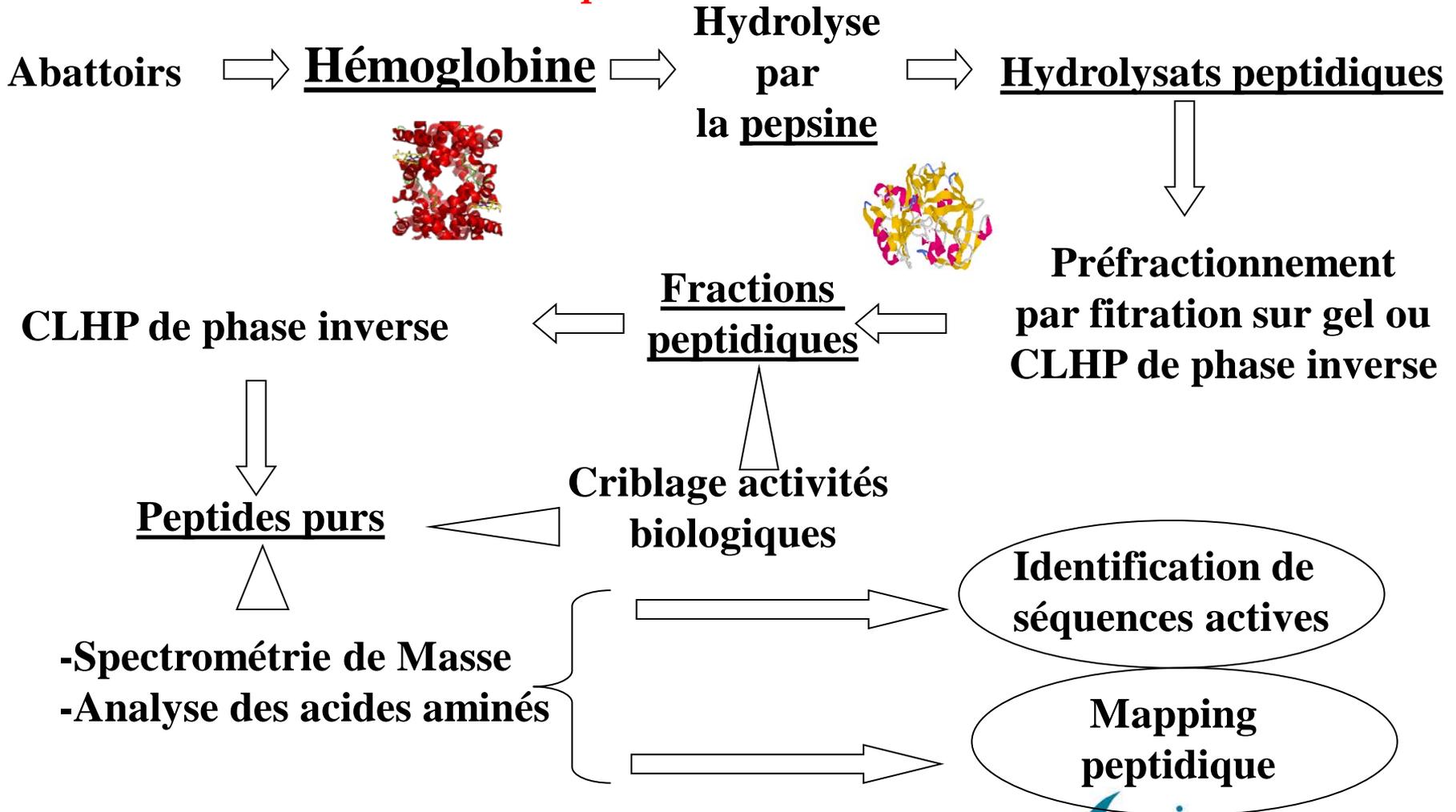
Conditions de génération de peptides actifs en réacteurs de type « batch » et « ouverts »

Propriétés physico-chimiques peptides → Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs

Conception et mise en œuvre de procédés couplés

Conditions de génération de peptides actifs (1/5)

Isolement de peptides actifs par hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine co-produit de l'industrie de la viande



Peptides à activités biologiques isolés au laboratoire

⇒ Trois peptides morphinomimétiques (opioïdes):

LVV-hémorphine-7 -----β 31-40

VV-hémorphine-7 -----β 32-40

VV-hémorphine-4 -----β 32-27

⇒ Quarantaine de peptides antibactériens-----α 1-23

⇒ Un peptide analgésique: La néokyotorphine -----α 137-141

⇒ Deux peptides hématopoïétiques: -----α 76-82 et β 94-100

⇒ Un peptide potentialisateur de la bradykinine-----α 129-134

⇒ Un peptide transporteur de la protoporphyrine IX--α 110-125

⇒ Un peptide transporteur de l'hème-----β 1-30

PEPTIDES 29 (2008) 969-977



available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides



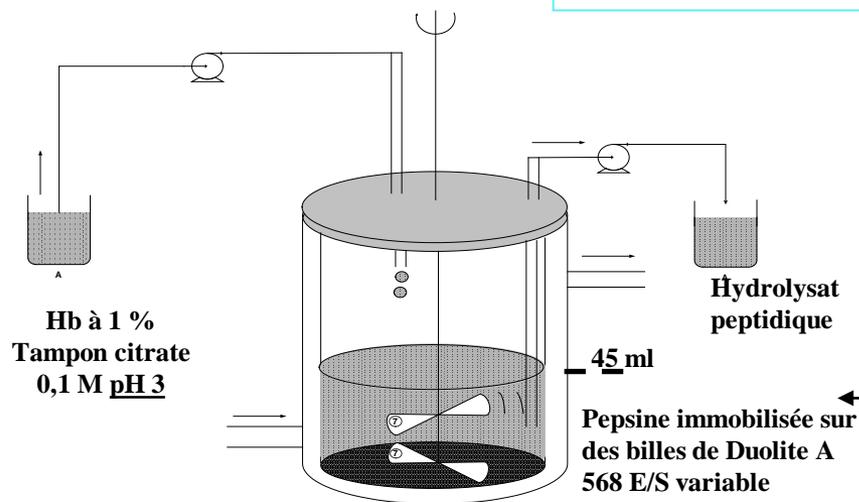
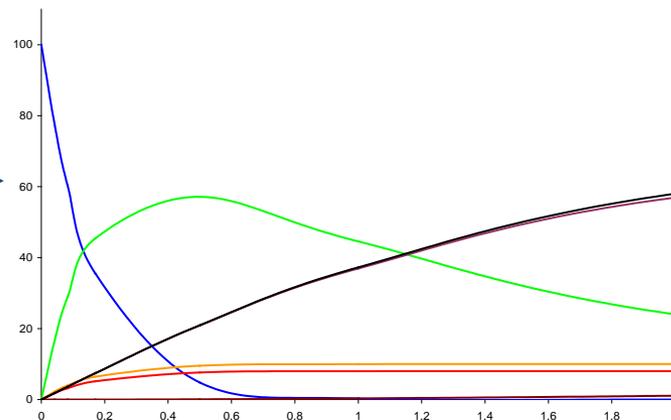
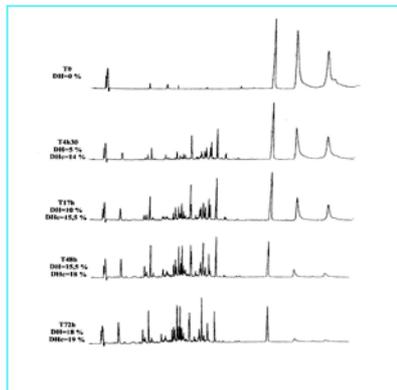
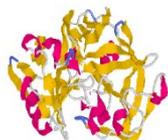
Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides

Naïma Nedjar-Arroume^{a,*}, *Véronique Dubois-Delval*^a, *Estelle Yaba Adje*^a,
Jonathan Traisnel^a, *François Krier*^a, *Patrice Mary*^a, *Mostafa Kouach*^b,
Gilbert Briand^b, *Didier Guillochon*^a

Conditions de génération de peptides actifs (3/5)



Pepsine



IMMOBILISATION ENZYME

Profils cinétiques peptides bioactifs Peptides intermédiaires et finaux



Process Biochemistry 40 (2005) 2841–2848

PROCESS BIOCHEMISTRY

www.elsevier.com/locate/probio

Mechanism and kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of α 1-32 antibacterial peptide



Use of a protease-modified-alumina complex to design a continuous stirred tank reactor for producing bioactive hydrolysates

Elena-Loredana Ticu^b, Dominique Vercaigne-Marko^{a,b}, Renato Froidevaux^a, Anca Huma^b, Vlad Artenie^b, Didier Guillochon^a

^aLaboratoire de Technologie des Substances Naturelles, Institut Universitaire de Technologie «A» - Polytech'ULB, USTL - Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

^bLaboratorul de Biotehnologie, Facultatea de Biologie, Universitatea "Al.I. Cuza" Iași, România

Received 28 September 2004; received in revised form 20 December 2004

Hedhili K.^{a,b}, Vauchel P.^a, Dimitrov K.^a, Kriaa K.^c, Chataigne G.^a, Hami K.^b, Dhulster P.^a,

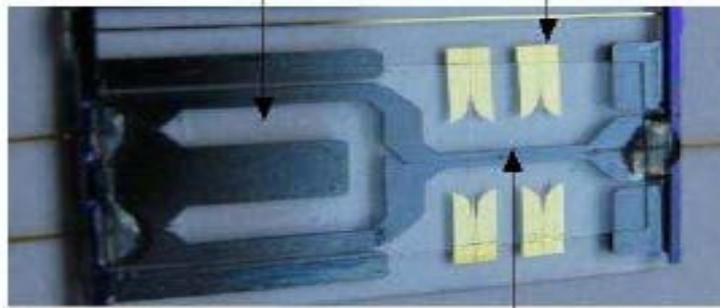
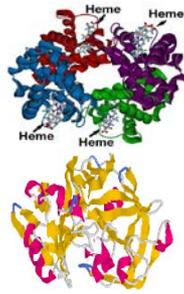
Nedjar-Arroume N.^a

Institut régional de recherche en agroalimentaire et biotechnologie



Institut Charles Viollette

Conditions de génération de peptides actifs (4/5)



RP-HPLC
LC-MS

Profils
peptidiques et
de MM

- Modélisation de l'hydrolyse de l'Hb et des cinétiques d'obtention des peptides en modes "batch" et "microfluidique"

- Digestion de l'Hb par la pepsine
- Analyses des populations peptidiques par LC/MS
- Comparaison avec les profils de digestion en mode "batch"
- Conditions pH3, T=25°C, Temps de réaction 15 et 30sec

RSC Advances

RSC Publishing

PAPER



Cite this: DOI: 10.1039/c3ra46095c



Diffusion based kinetic selectivity modulation of enzymatic proteolysis in a microfluidic reactor: experimental analysis and stochastic modeling

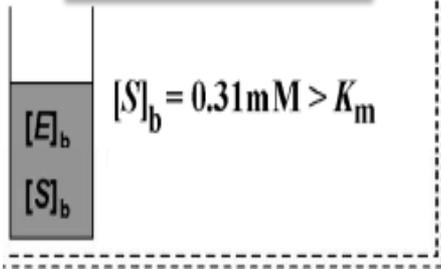
Adil Elagli,^{a,b} Simon Laurette,^b Anthony Treizebre,^b Bertrand Bocquet^b and Renato Froildevaux^{a*}



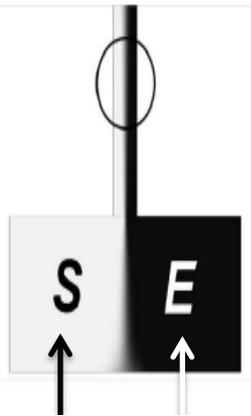
Conditions de génération de peptides actifs (5/5)

Hémoglobine non hydrolysée

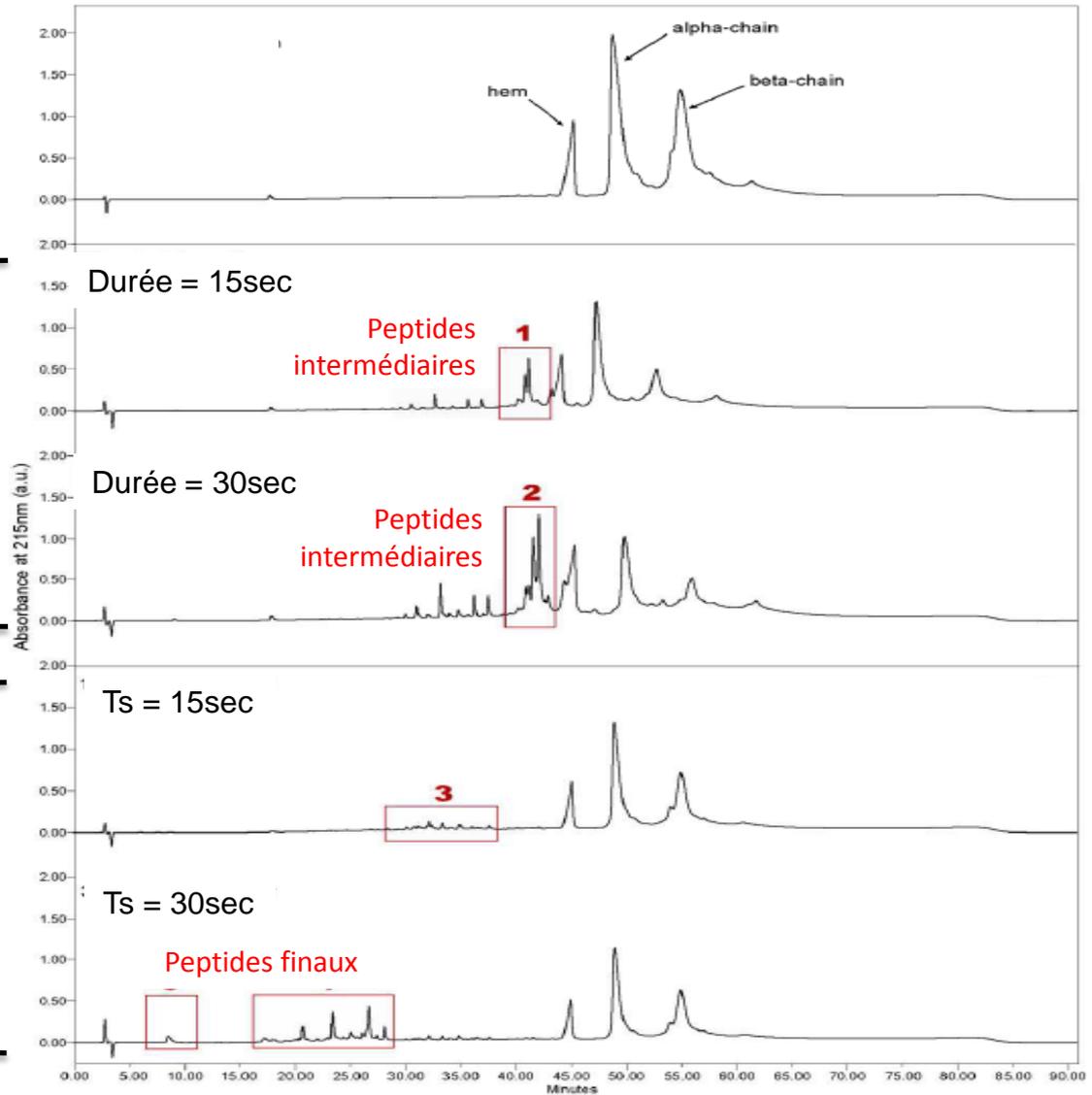
Mode Batch



Mode Micro



Sens Ecoulement





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molcatb



Facile immobilization of enzyme by entrapment using a plasma-deposited organosilicon thin film

Adil Elagli^{a,b,1}, Kalim Belhacene^{a,b,1}, Céline Vivien^a, Pascal Dhulster^b, Renato Froidevaux^b, Philippe Supiot^{a,*}

^a Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) – UMR-CNRS 8520, Université Lille Nord de France – Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

^b Institut Charles Viollette (ProBioJEM team) – EA 1026, Université Lille Nord de France – Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France



Contents lists available at ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios



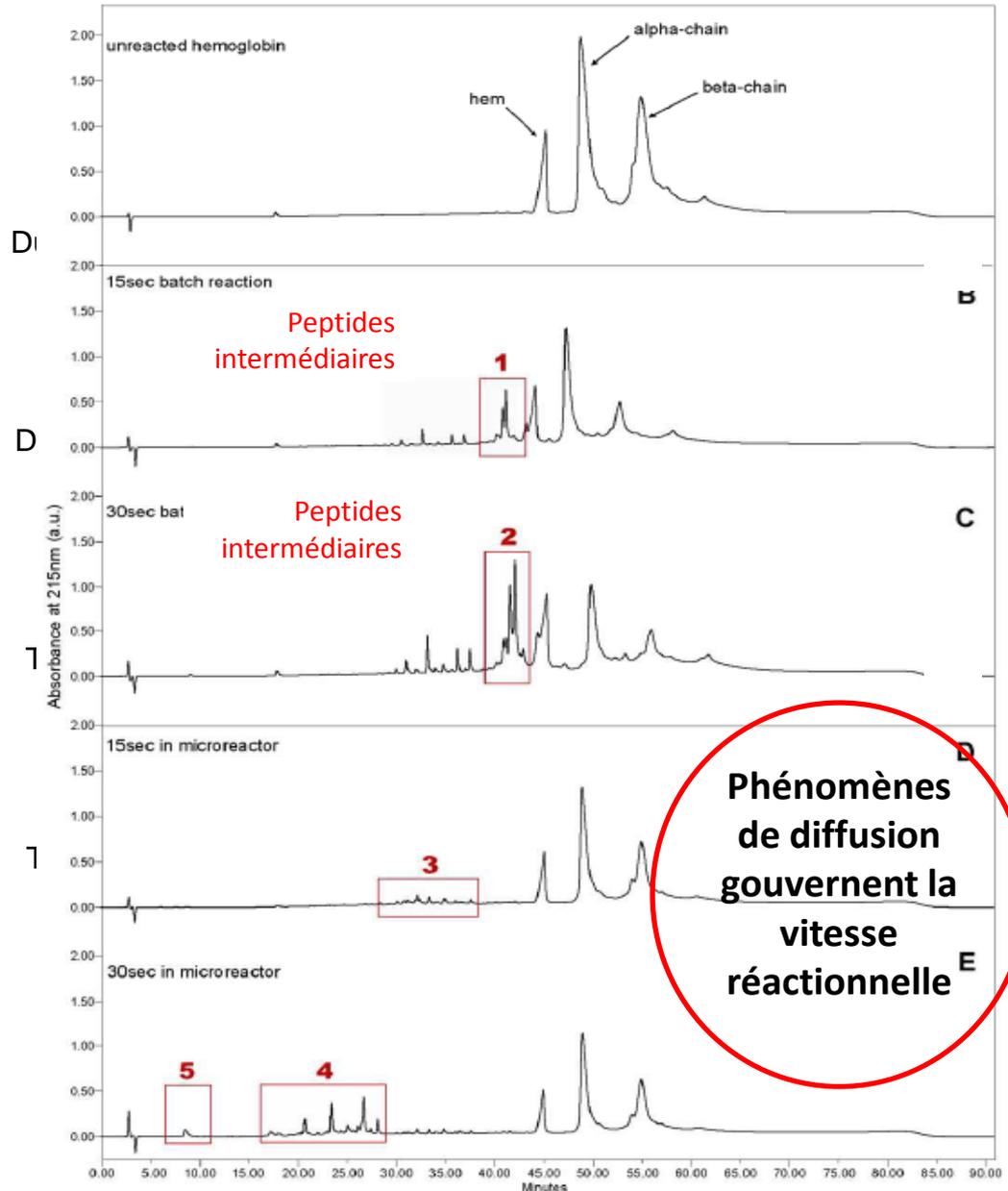
Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis

Abdenour Abbas^{a,b,c}, Anthony Treizebre^a, Philippe Supiot^b, Nour-Eddine Bourzgui^a, Didier Guillochon^c, Dominique Vercaigne-Marko^c, Bertrand Bocquet^{a,*}

^a Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnology (UMR-CNRS 8520), University of Lille, F59655 Villeneuve d'Ascq, France

^b Laboratory of Process Engineering of Reactive Fluids-to-Materials Interactions (EA 3571), University of Lille, F59655 Villeneuve d'Ascq, France

^c Laboratory of Biological Processes, Enzymatic and Microbial Engineering (EA 1026), University of Lille, F59655 Villeneuve d'Ascq, France



Protéines agroalimentaires issues de la luzerne, du lactosérum, du sang (cruor), produits de la pêche...

⇒ Hydrolyse enzymatique

⇒ Trypsine, chymotrypsine, pepsine...

Recherche de séquences peptidiques actives à partir de l'hydrolyse *in vitro* ou *in vivo* de protéines

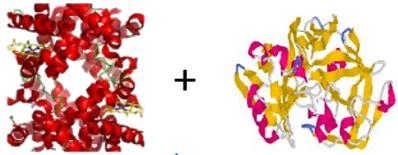
Peptides antihypertensifs, satiants, opioïdes, antimicrobiens...

Conditions de génération de peptides actifs en réacteurs de type « batch » et « ouverts »

Propriétés physico-chimiques peptides → Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs

Conception et mise en œuvre de procédés couplés

Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs (1/8)



P
E
P
T
I
D
E
S

Amphiphiles et chargés

Extraction assistée
par paires d'ions

Surfactives

Moussage-
drainage

Taille et charge

EDUF

Preuve de concept
Maîtrise et optimisation

Extraction assistée par paires d'ions

pH, force ionique, nature contre ion,
nature solvant organiques

Peptides antimicrobiens

Moussage-drainage

pH, force ionique, température,
débit d'air

Peptides antimicrobiens

EDUF

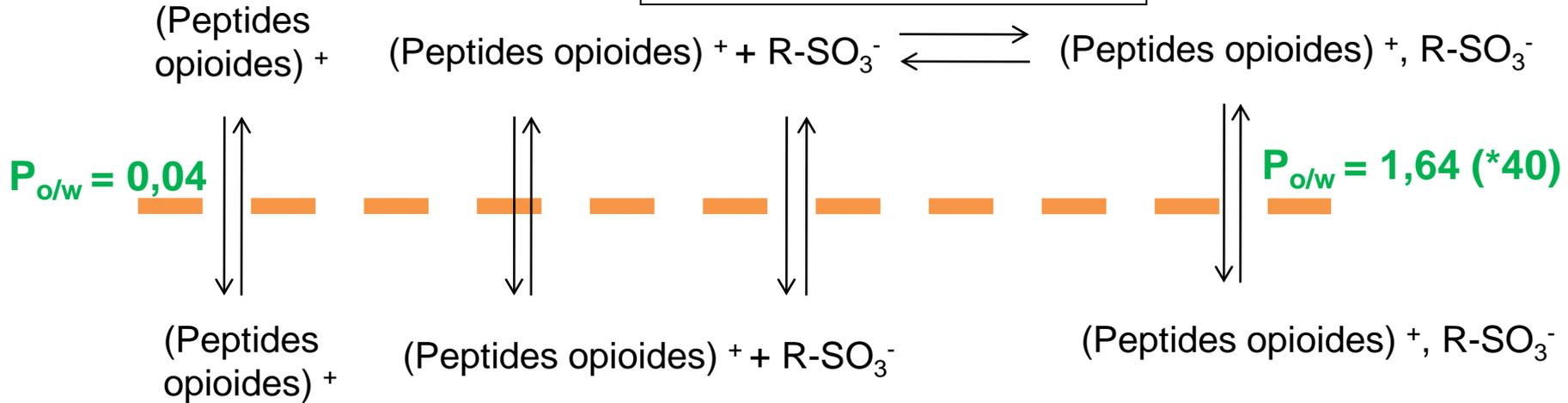
- Choix de la membrane
- Conditions opératoires: intensité du courant, force ionique, concentration

Peptide
antihypertenseur

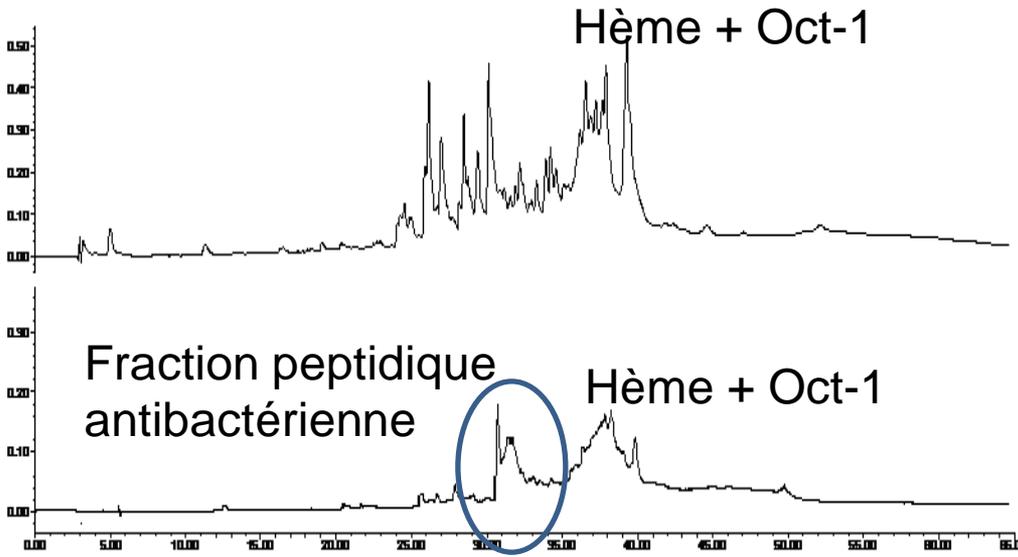
Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs (2/8)

Séparation par extraction assistée par paires d'ions

Phase aqueuse liquide



Phase organique liquide
(octan-1-ol)



Journal of Chromatography B, 877 (2009) 1683–1688

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

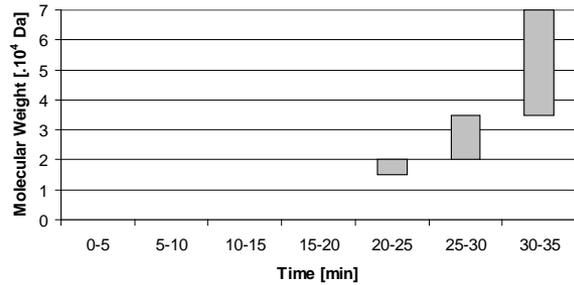
Ion-pairing separation of bioactive peptides using an aqueous/octan-1-ol micro-extraction system from bovine haemoglobin complex hydrolysates

Mathieu Vanhoute, Renato Froidevaux*, Aurelien Vanvlassenbroeck, Didier Lecouturier, Pascal Dhulster, Didier Guillochon

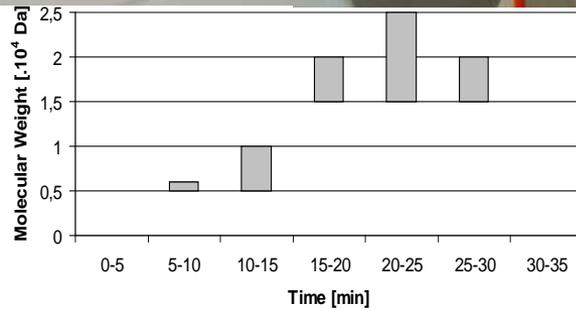
Laboratoire de Procédés Biologiques en génie Enzymatique et Microbien, France

Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs (3/8)

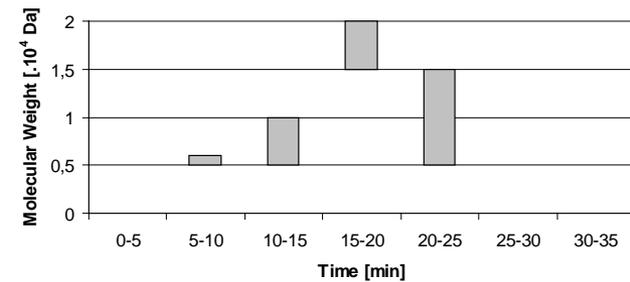
Séparation par moussage-drainage



Hydrolysat DH3%



Hydrolysat DH15%

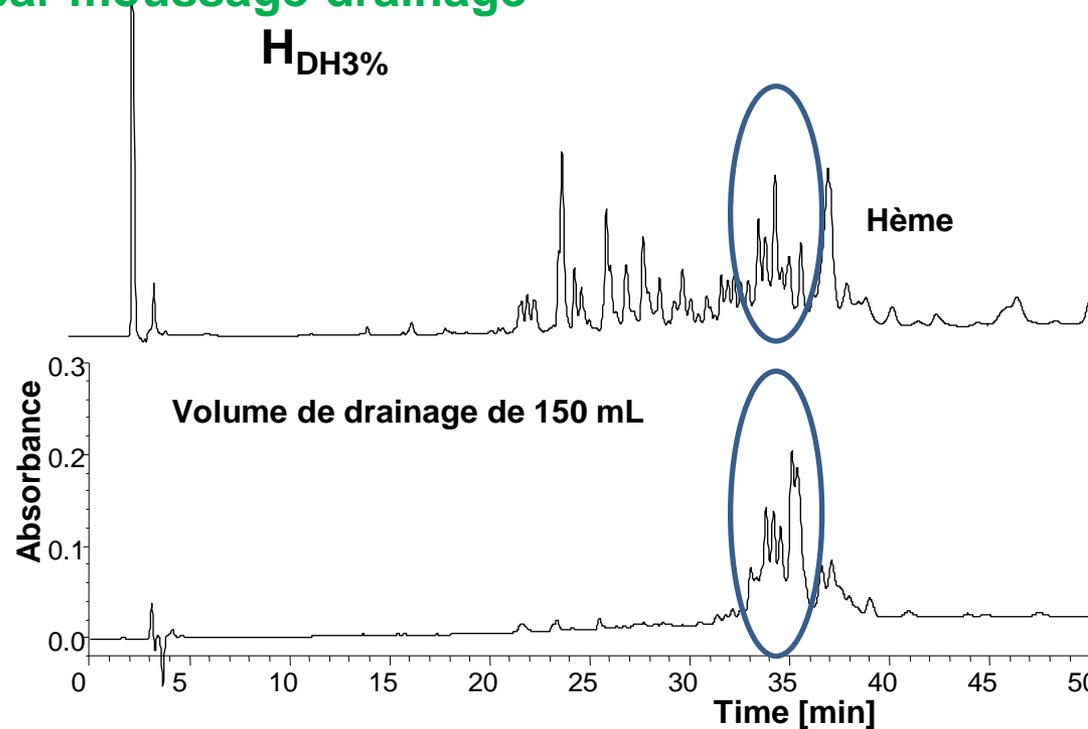
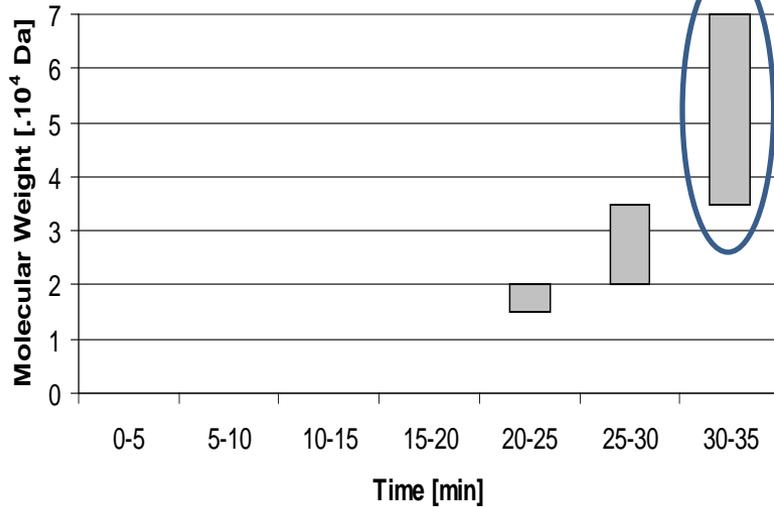


Hydrolysat DH23%

Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs (4/8)

Séparation par moussage-drainage

Hydrolysat DH3%

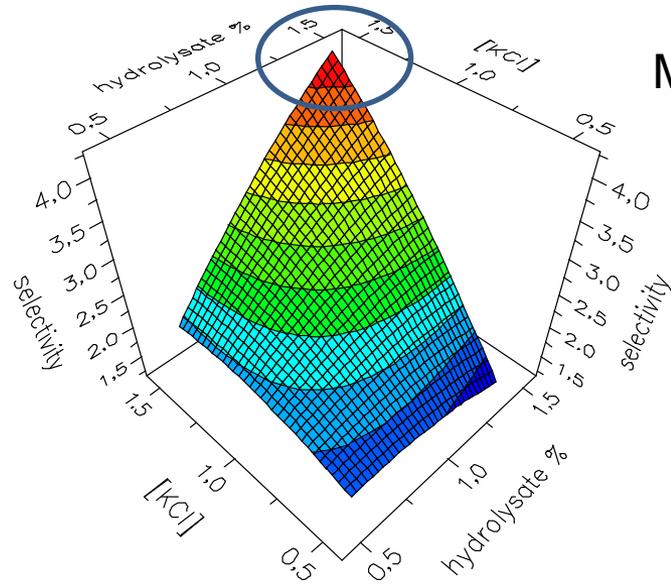


↪ Fraction peptidique (**3500Da <MM< 7000 Da**) est séparée → **Antibactérienne**

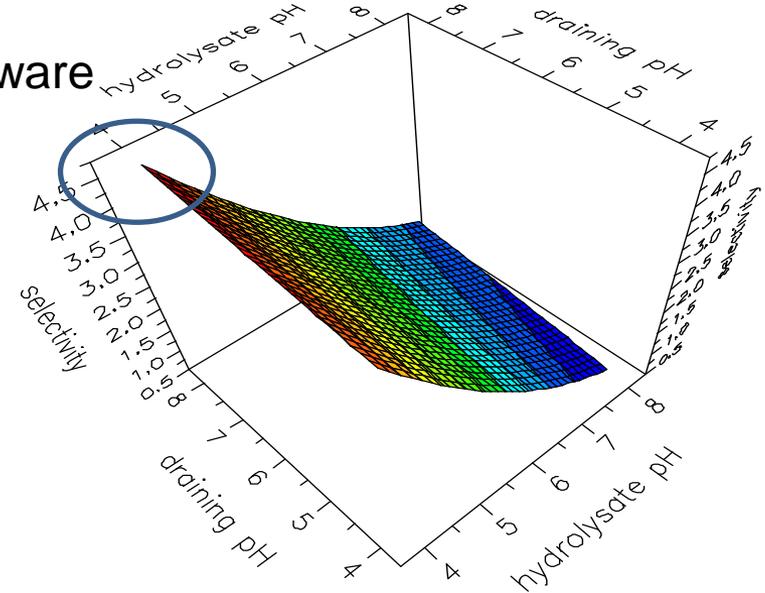
↪ Fractions peptidiques avec **MM< 3500 Da** sont désorbées de la mousse

Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs (5/8)

Séparation par moussage-drainage



MODDE software



- ⇒ Concentrations de l'hydrolysate (1.45%)
- ⇒ KCl (1.5 M)
- ⇒ pH de la solution de drainage = 8
- ⇒ pH de la solution d'hydrolysate = 4

Conclusion : Préparation d'une fraction de peptides antibactériens $\approx 10\%$ (w/w) par moussage-drainage

Separation and Purification Technology 63 (2008) 460–465



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Separation and Purification Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/seppur



Advancement of foam separation of bioactive peptides using an aeration column with a bubbling-draining method

M. Vanhoute^a, R. Froidevaux^{a,*}, C. Pierlot^b, F. Krier^a, J.M. Aubry^b, D. Guillochon^a

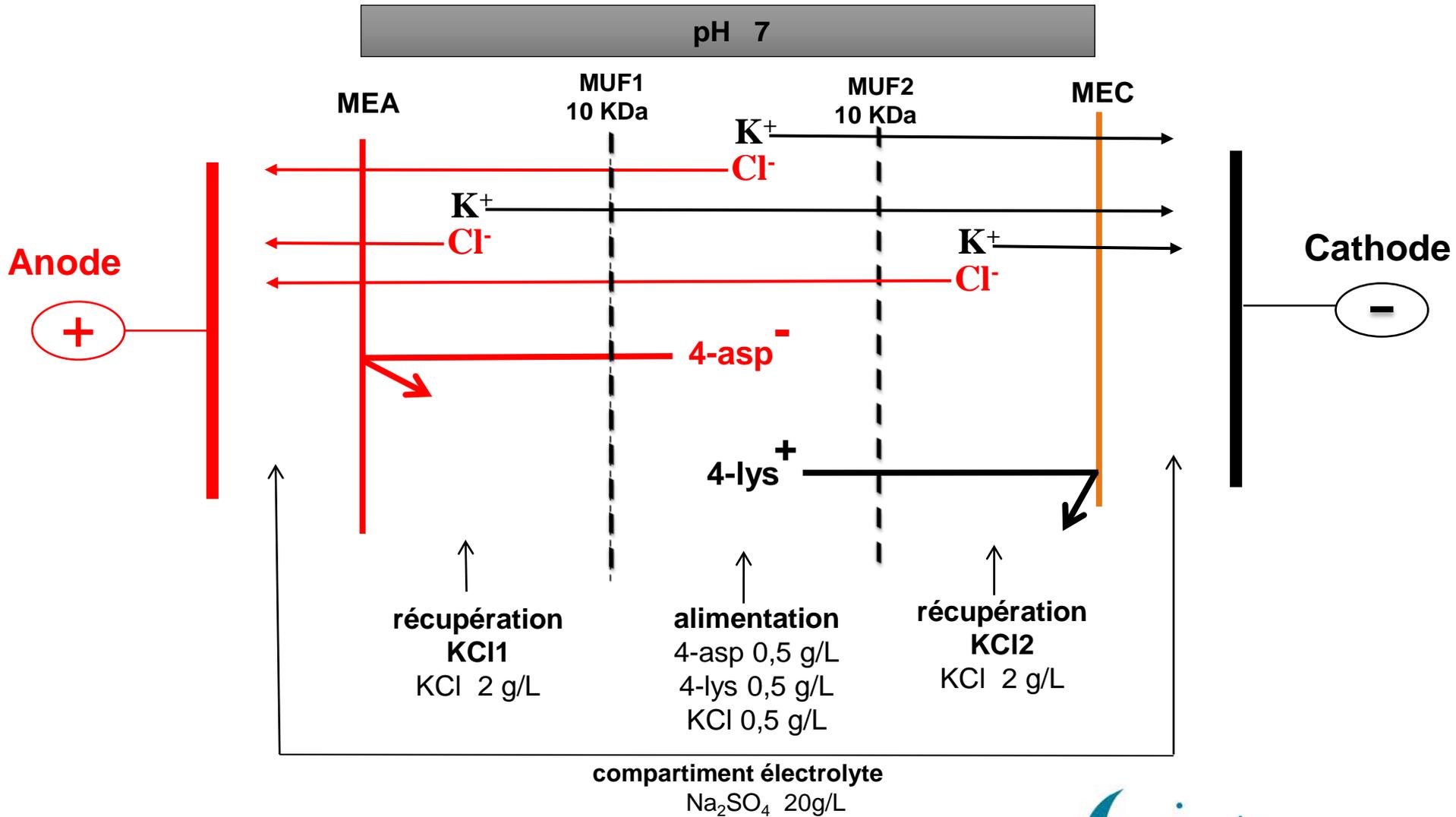
^a ProBioGEM, Equipe "Génie de la Protéolyse et de la Séparation", Polytech Lille, Bd Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

^b LCOM, Equipe "Oxydation et Formulation", UMR CNRS 8009, ENSCL, BP 90 108, F-59652 Villeneuve d'Ascq Cedex, France



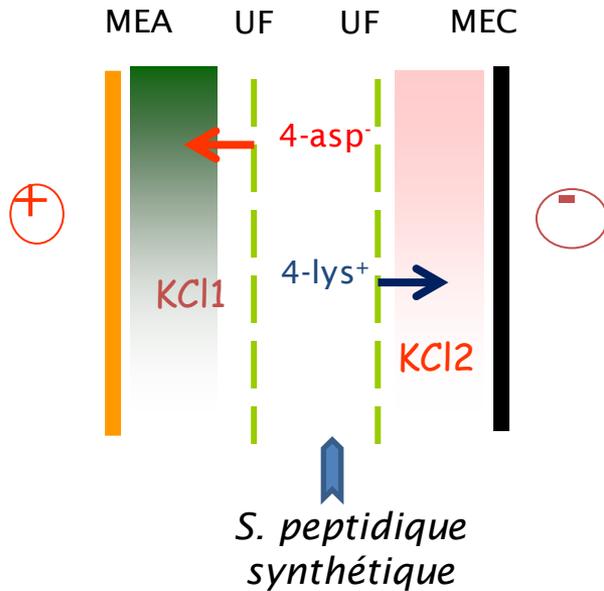
Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs (6/8)

Séparation par EDUF



Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs (7/8)

Séparation par EDUF



- Fractionnement de peptides synthétiques dans des mélanges modèles
- Identification des phénomènes de transfert de matière

Paramètres étudiés:

1. Migration des peptides
2. Colmatage membranaire
3. Intensité du courant électrique
4. Migration des ions K^+ et Cl^-

Journal of Membrane Science 365 (2010) 16–24



Effect of haem on the fractionation of bovine haemoglobin peptic hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes

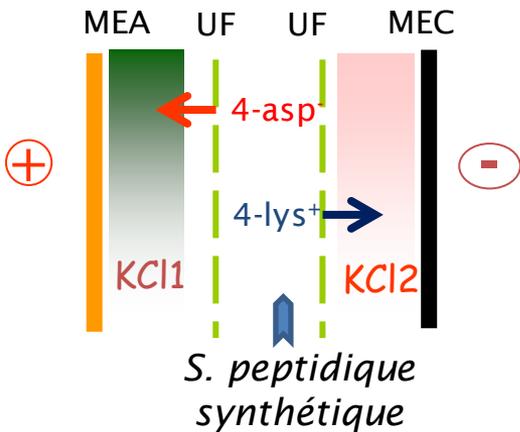
M. Vanhoute^{a,b}, L. Firdaous^{a,b}, L. Bazinet^{b,*}, R. Froidevaux^a,
D. Lecouturier^a, D. Guillochon^a, P. Dhulster^a

^a ProBioGEM, Polytech Lille, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX, France

^b Institut des Nutroceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Centre de Recherche en Science et Technologies du Lait (STELA),
Département des sciences des aliments et de nutrition, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6

Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs (8/8)

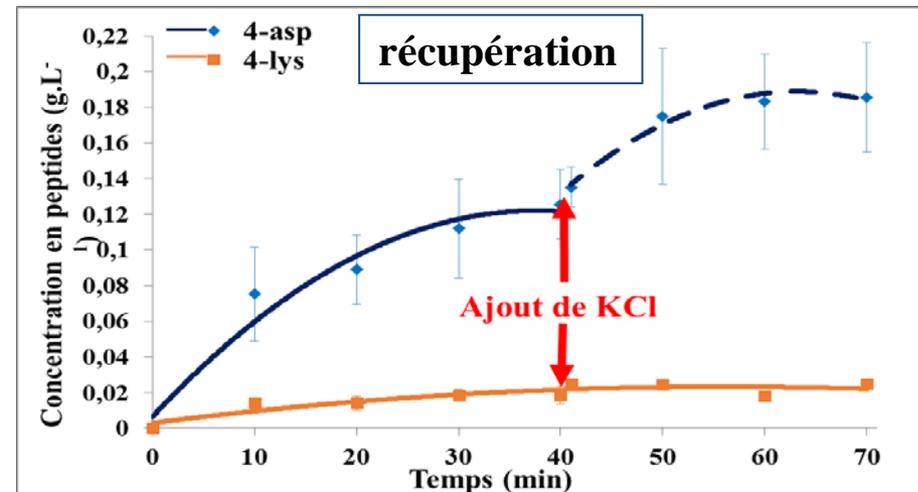
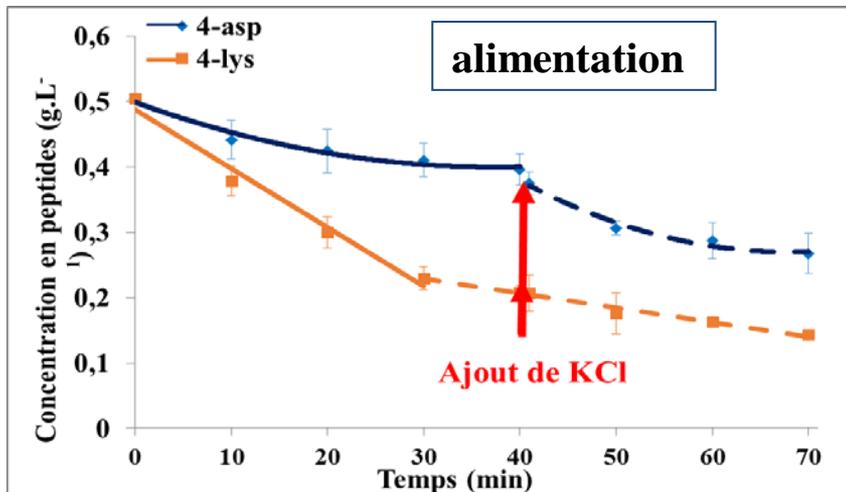
Séparation par EDUF



Interactions peptide – peptide \Leftrightarrow influence sur flux peptidiques

Transport compétitif \Leftrightarrow ajout de KCl augmente le flux des peptides anioniques / peptides cationiques

Modèle de transfert de matière \Leftrightarrow Migration des peptides est gouvernée par électromigration



Travaux de thèse actuels sur la préparation d'un petit peptide analgésique à partir d'hydrolysats peptidiques complexes d'Hb bovine

Protéines agroalimentaires issues de la luzerne, du lactosérum, du sang (cruor), produits de la pêche...

⇒ Hydrolyse enzymatique

⇒ Trypsine, chymotrypsine, pepsine...

Recherche de séquences peptidiques actives à partir de l'hydrolyse *in vitro* ou *in vivo* de protéines

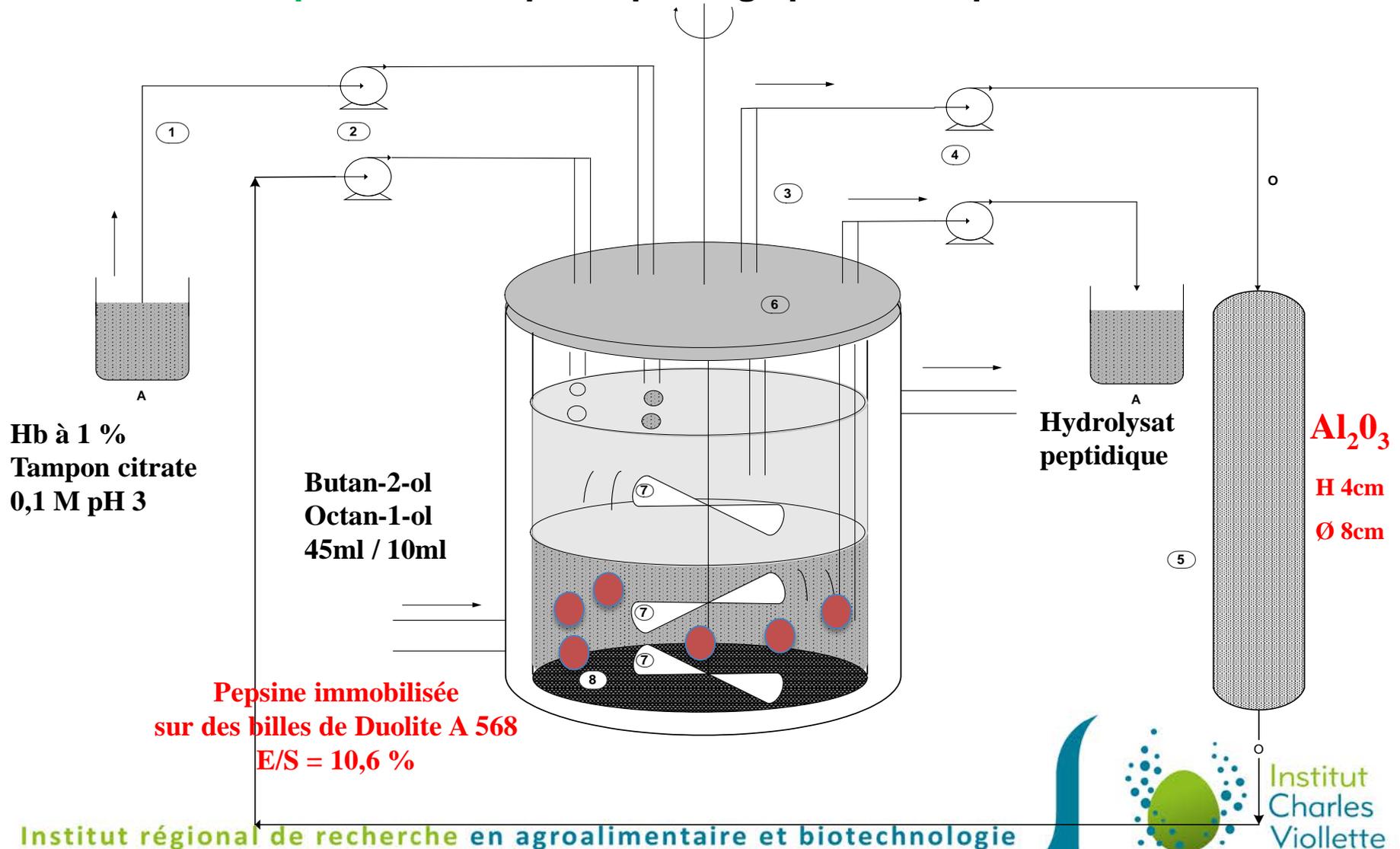
Peptides antihypertensifs, satiants, opioïdes, antimicrobiens...

Conditions de génération de peptides actifs en réacteurs de type « batch » et « ouverts »

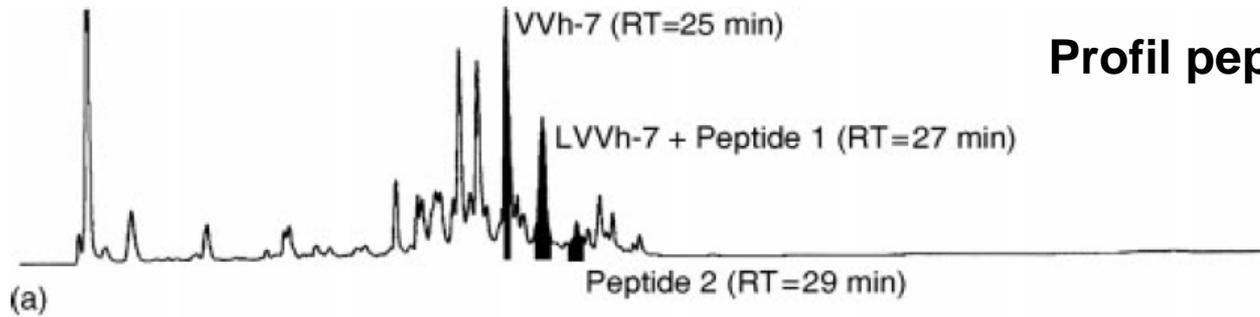
Propriétés physico-chimiques peptides → Mise en œuvre de procédés de séparation sélectifs

Conception et mise en œuvre de procédés couplés

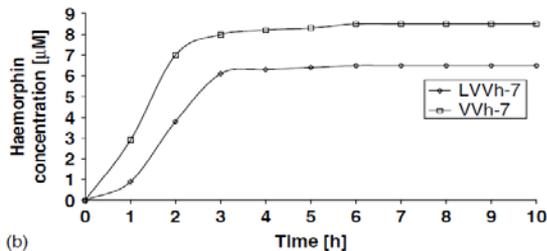
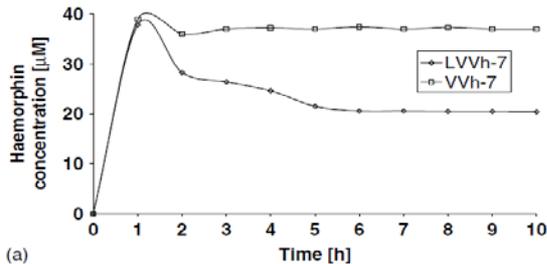
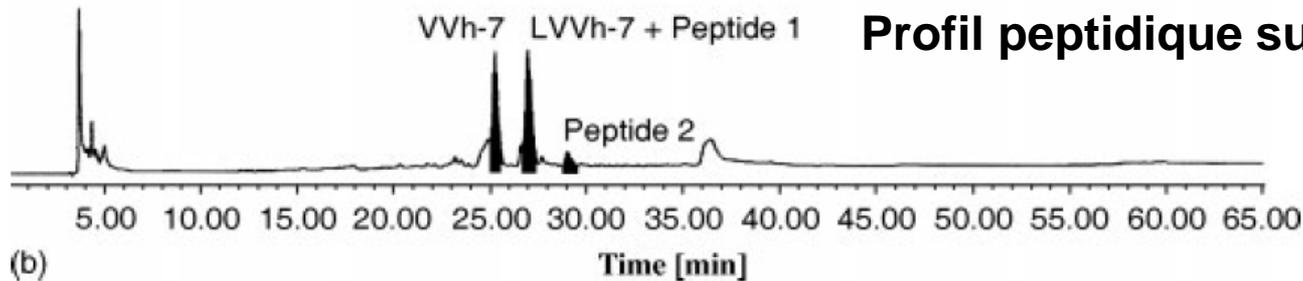
Mise en œuvre d'un réacteur triphasique avec l'extraction en continu d'hémorphines - Temps de passage pour les 2 phases: 1 heure



Profil peptidique phase aqueuse



Profil peptidique sur colonne d'alumine



Process Biochemistry 43 (2008) 431–437

Process
Biochemistry

www.elsevier.com/locate/procbio

Continuous preparation of two opioid peptides and recycling of organic solvent using liquid/liquid extraction coupled with aluminium oxide column during haemoglobin hydrolysis by immobilized pepsin

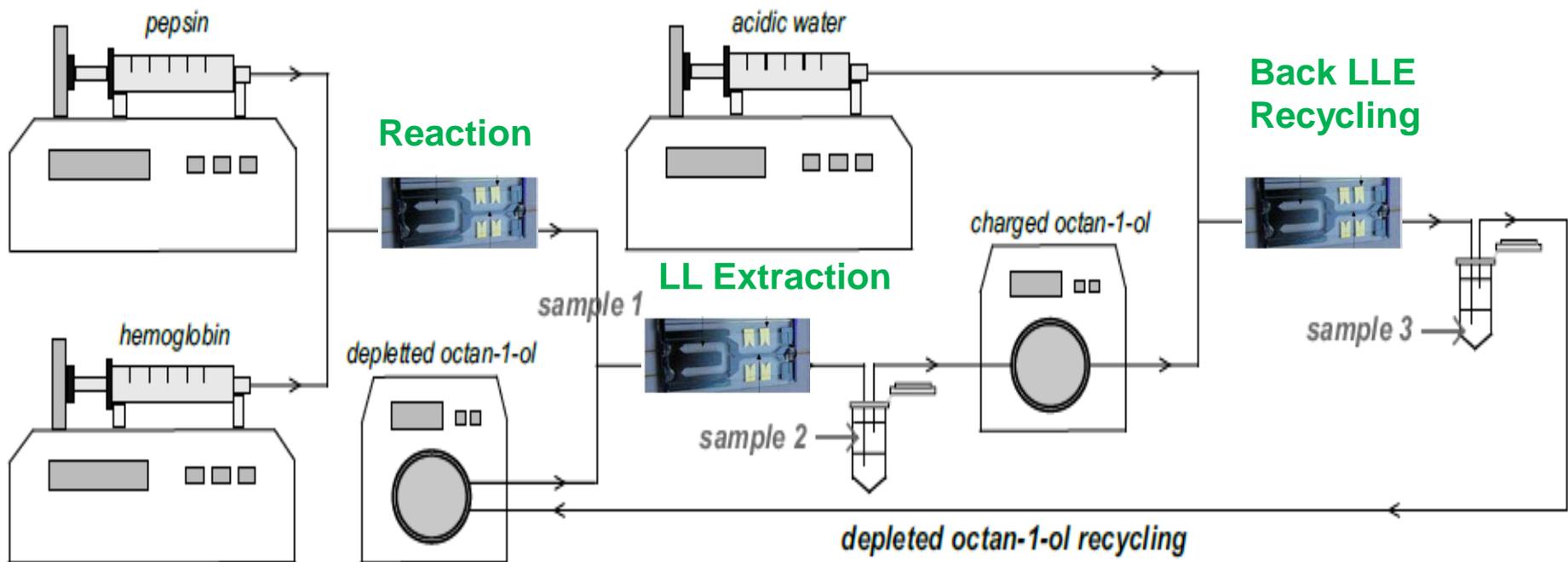
Renato Froidevaux^{*}, Mathieu Vanhoute, Didier Lecouturier, Pascal Dhulster, Didier Guillochon

Laboratoire de Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien IUT-Polytech'Lille-USTL Boulevard Paul Langevin - Cité Scientifique
59 655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

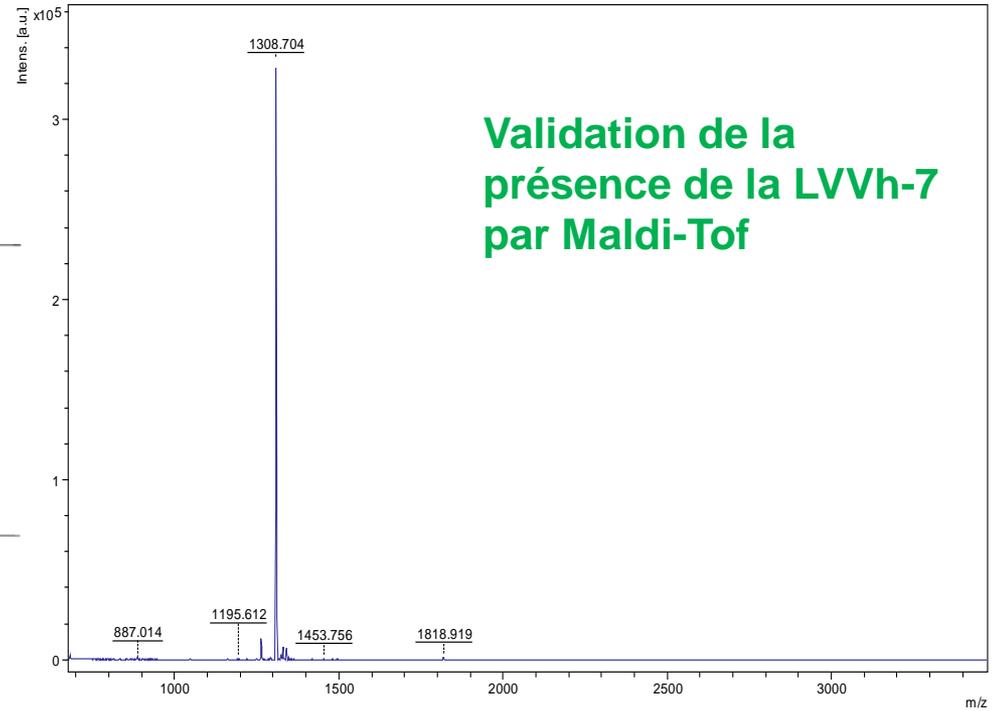
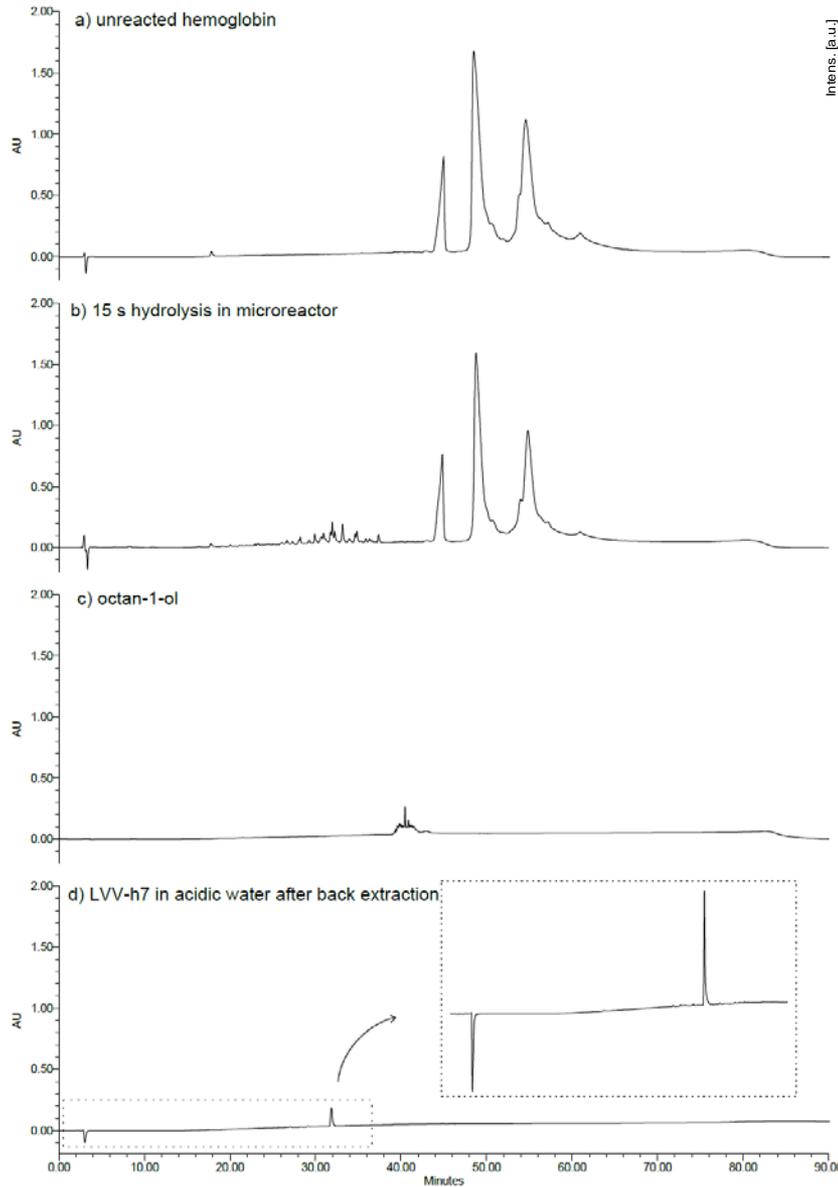
Received 18 September 2007; received in revised form 23 November 2007; accepted 9 January 2008

Conception et mise en œuvre de procédés couplés (3/4)

Préparation en continu d'un peptide opioïde (LVVh-7) à partir de l'hydrolyse de l'Hb par la pepsine dans un **microréacteur enzymatique couplé à un système d'extraction liquide/liquide** (eau/octanol-1) avec recyclage de l'octanol-1

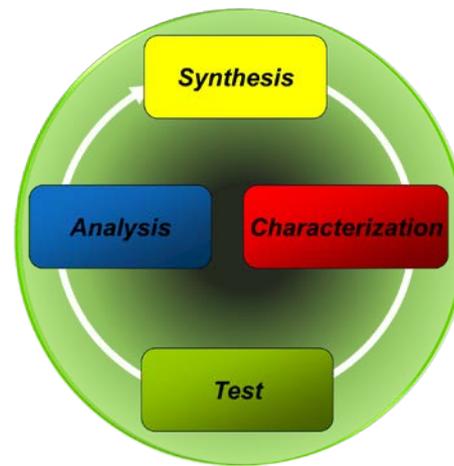


Conception et mise en œuvre de procédés couplés (4/4)



Validation de la présence de la LVVh-7 par Maldi-Tof

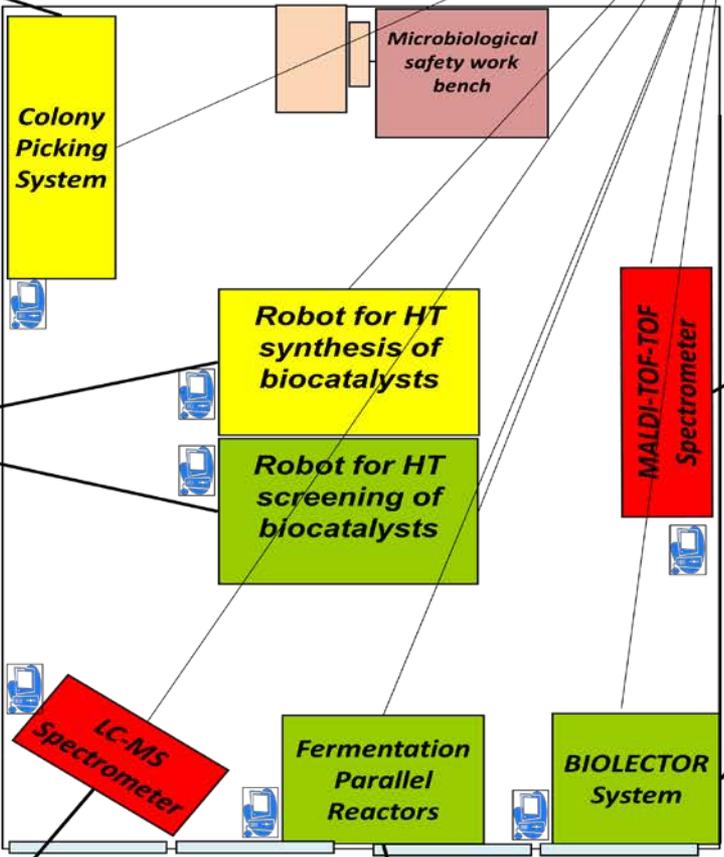
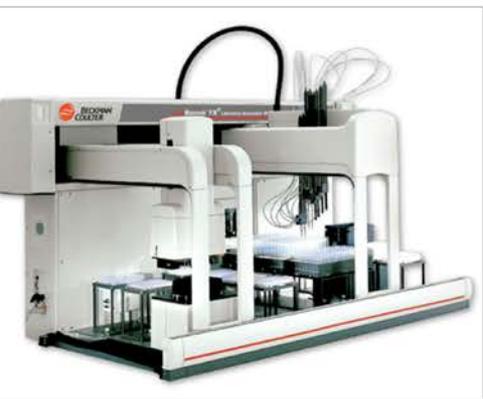
Submitted in Process Biochemistry



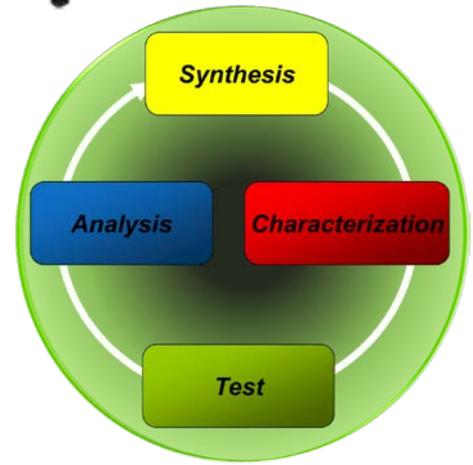
- PIA EQUIPEX – Budget 8,7 M€
- Plate-forme intégrée appliquée au criblage haut débit de (bio)catalyseurs pour les bioraffineries
- Synthèse et criblage à haut débit de (bio)catalyseurs homogènes et hétérogènes
- Mise en oeuvre de catalyses chimiques et enzymatiques et HYBRIDES – Homogènes et hétérogènes – pour l'obtention d'intermédiaires chimiques biosourcés



QPix 460



Data Treatment



Procédés d'obtention et de séparation de protéines et de peptides bioactifs résultants

Rénato FROIDEVAUX

Merci de votre attention

Journée Promotion Procédés Produits - Nancy le 9 juillet 2015

Institut régional de recherche en agroalimentaire et biotechnologie



Institut
Charles
Viollette