



Université
de Toulouse

THESE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE**

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Syrine KERFAI

le 18 Mars 2011

Titre :

Etude d'un procédé chromatographique d'échange d'ions pour la séparation de la Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase Oxygénase (RuBisCO) dans le cadre de la valorisation d'un sous produit agricole

JURY

Laurence MUHR, *Maître de conférences HDR, ENSIC-LRGP, Nancy (France)*

Maria Aurora FERNANDEZ, *Professeur, INSA-LISBP, Toulouse (France)*

Marie Laure LAMELOISE, *Professeur AgroParisTech, Massy (France)*

Mario DIAZ, *Professeur Universidad de Oviedo, Oviedo (Espagne)*

Pierre Yves PONTALIER, *Maître de conférences HDR, ENSIACET-LCA, Toulouse (France)*

Sandrine ALFENORE, *Maître de conférences, INSA-LISBP, Toulouse (France)*

Stéphane MATHE, *Professeur Agrégé, INSA-LISBP, Toulouse (France)*

Ecole doctorale : Mécanique, Energétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche : LISBP

Directeur(s) de thèse : Maria Aurora FERNANDEZ et Stéphane MATHE

Rapporteurs : Laurence MUHR et Mario DIAZ

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP), au sein de l'équipe de recherche Séparation Oxydation et Procédés Hybrides de l'Environnement (SOPHYE), sous la direction du Professeur Maria Aurora FERNANDEZ et du Docteur Stéphane MATHE. Ce travail s'intègre dans le cadre du projet ANR PRODULUZ. Je remercie donc les différents partenaires de ce projet pour leurs collaborations.

Je tiens beaucoup à exprimer toute ma gratitude à Maria et Stéphane de m'avoir accueillie au sein de leur équipe de travail, et pour avoir dirigé cette thèse dans de très bonnes conditions. Merci d'avoir eu confiance en moi et de n'avoir jamais douté de mes capacités. Merci pour les énormes encouragements ainsi que le soutien qu'ils m'ont toujours apportés durant ces années de thèse. J'ai apprécié leur investissement émotionnel dans l'avancement des travaux, que se soit dans des moments de satisfaction ou de difficulté. Je les remercie pour m'avoir poussée au meilleur quand tout ne marchait pas comme on voulait.

Maria, tu es bien plus qu'une directrice de thèse pour moi, j'ai beaucoup appris de toi tant sur le plan professionnel que personnel. Tu as toujours représenté un exemple de réussite à mes yeux et tu m'as toujours poussée à me surpasser et à être à la hauteur de la confiance que tu m'as accordée. Merci encore une fois pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je tiens également à remercier tous les membres du jury pour l'attention qu'ils ont bien voulu porter à mon travail ainsi que pour les remarques enrichissantes soulevées durant la discussion. Je souhaite particulièrement exprimer ma gratitude au professeur Mario DIAZ et au docteur Laurence MUHR pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je remercie le professeur Marie Laure LAMELOISE d'avoir présidé le jury. Merci à Pierre Yves PONTALIER pour l'intérêt porté sur mes travaux et pour la qualité de ses remarques. Je remercie également Sandrine ALFENORE d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse mais surtout pour son soutien pendant ces trois dernières années. Tu as toujours su trouvé les bons mots qui me touchent et m'encouragent à aller de l'avant.

Un grand merci à tous les doctorants avec qui j'ai pu partager de bons moments au laboratoire ou à l'extérieur. Je commencerai par Latifa qui fut ma première vraie amie à Toulouse. Je remercie également Adil, Zhu et Damien. Votre présence m'a beaucoup aidé à surmonter des moments difficiles durant ces années. Merci Laurence de m'avoir écouté quand j'avais besoin de parler aussi bien de sciences que de conneries... Merci Mandy, tu es arrivée au moment où j'avais le plus besoin de toi et tu as su me booster pour la fin. Je remercie également Jean Pierre, Mathieu, Charlotte, Sébastien pour toutes les discussions qu'on a eu.

Je ne peux finir ces remerciements sans citer les êtres les plus chers à mon cœur, ceux qui ont toujours cru en moi. Merci à mes très chères sœurs Nejla et Haifa et mon petit neveu Zouzou pour leur soutien. Vos encouragements ont traversé la méditerranée pour arriver droit à mon cœur. Merci aussi à ma chère cousine Rim qui m'a beaucoup supportée pendant les derniers mois de rédaction. Un très grand merci à mon chéri et désormais époux Hédi. Ta présence est juste indispensable pour moi. Tu me rends la vie tellement plus belle.

Enfin, merci à mes parents, j'espère pouvoir un jour vous rendre un peu de tout ce que vous m'avez apporté. Merci de m'avoir toujours laissée libre de mes choix et de m'avoir soutenue jusqu'au bout, c'est grâce à vous que je suis arrivée à être ce que je suis aujourd'hui.

TABLE DES MATIERES

NOMENCLATURE	7
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	17
INTRODUCTION GENERALE	21
CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	29
I. Les protéines	33
I.1. Structure moléculaire	33
I.2. Propriétés générales	34
I.2.1. Masse molaire	34
I.2.2. Charge d'une protéine	34
I.2.3. Solubilité	37
I.3. La protéine dans son milieu	37
II. Les protéines foliaires de luzerne	38
II.1. Classification des protéines de luzerne	38
II.1.1. Protéines insolubles ou hydrophobes	39
II.1.2. Protéines solubles ou hydrophiles	40
II.2. Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase ou Rubisco	40
II.2.1. Structure tridimensionnelle	40
II.2.2. Point isoélectrique de la Rubisco	41
II.2.3. Température de dénaturation	42
II.2.4. Activité enzymatique	42
II.2.5. Propriétés fonctionnelles	43
II.2.6. Traitement industriel des jus de luzerne pour la récupération des protéines	43
III. Procédés conventionnels de séparation des protéines	45
III.1. Techniques de séparation chromatographiques	47
III.2. La chromatographie d'échange d'ions	48
III.2.1. Les matériaux échangeurs d'ions	50
III.2.2. Nature de la matrice	50
III.2.3. Nature des groupes fonctionnels	51
IV. Purification primaire des milieux bruts	52
IV.1. Chromatographie en réacteur agité	53
IV.2. Chromatographie en lit fluidisé	53

IV.3. Chromatographie en lit expansé	54
IV.3.1. Mise en œuvre des procédés chromatographiques en lit expansé	56
IV.3.2. Aspects hydrodynamiques	57
IV.3.2.1 <i>Fluidisation du support solide</i>	57
IV.3.2.2 <i>Classification</i>	60
IV.3.2.3 <i>Dispersion en phase liquide</i>	61
IV.3.3. Support solide	63
IV.3.4. Applications de la chromatographie en lit expansé	65
V. Conclusion	67
CHAPITRE II. METHODES ANALYTIQUES POUR LA CARACTERISATION DES JUS ISSUS DE BIOMASSE VEGETALE	69
I. Introduction générale	73
II. Publication: Production of green juice with an intensive thermo- mechanical fractionation process. Part II: Effect of processing conditions on the liquid fraction properties	75
II.1. Introduction	76
II.2. Material and methods	79
II.2.1. Vegetable material	79
II.2.2. Biomolecules	80
II.2.3. Conventional methods	81
II.2.3.1 <i>Nitrogen content</i>	81
II.2.3.2 <i>Protein fractionation</i>	81
II.2.3.3 <i>SDS PAGE electrophoresis</i>	82
II.2.4. Rubisco analysis method	83
II.3. Results and discussion	88
II.3.1. Biomass pre-treatment effect	89
II.3.2. Temperature effect	90
II.4. Conclusion	94
III. Bilan général	96
IV. Conclusion générale	98
CHAPITRE III. PROCEDE DE SEPARATION DE LA RUBISCO	101
I. Introduction	105

II. Matériel et méthodes	107
II.1. Matériel	107
II.1.1. Supports chromatographiques	107
II.1.2. Jus vert	108
II.2. Analyse qualitative et quantitative de la Rubisco dans le jus	110
III. Essais préliminaires de rétention de Rubisco sur le support	111
III.1. Protocole expérimental	112
III.2. Résultats	112
IV. Etude de la rétention de Rubisco par échange d'ions	114
IV.1. Colonnes de chromatographie d'échange d'ions	114
IV.1.1. Colonne en lit fixe	114
IV.1.2. Colonne en lit expansé	115
IV.2. Protocole expérimental	115
IV.3. Comportement hydrodynamique des colonnes	116
IV.3.1. Protocole expérimental	116
IV.3.2. Ecoulement dans la colonne en lit fixe	117
IV.3.3. Ecoulement dans la colonne en lit expansé	118
IV.4. Courbes de percée	119
IV.4.1. Principe	119
IV.4.2. Profil de la courbe	120
IV.4.3. Capacité dynamique à 10%	121
IV.5. Rétention de Rubisco à partir des jus reconstitués centrifugés	121
IV.5.1. Courbes de percée expérimentales	122
<i>IV.5.1.1 Colonne en lit fixe</i>	<i>123</i>
<i>IV.5.1.2 Colonne en lit expansé</i>	<i>127</i>
IV.5.2. Evaluation de la capacité dynamique	128
IV.6. Elution	131
IV.6.1. Conditions d'élution dans la colonne en lit fixe	131
IV.6.2. Conditions d'élution dans la colonne en lit expansé	131
IV.6.3. Analyse quantitative	132
<i>IV.6.3.1 Colonne en lit fixe</i>	<i>132</i>
<i>IV.6.3.2 Colonne en lit expansé</i>	<i>134</i>
IV.6.4. Analyse qualitative	137
<i>IV.6.4.1 Colonne en lit fixe</i>	<i>137</i>
<i>IV.6.4.2 Colonne en lit expansé</i>	<i>138</i>
V. Conclusion	140

CHAPITRE IV. ASPECTS FONDAMENTAUX DE LA RETENTION DE RUBISCO	143
I. Aspects théoriques de la séparation chromatographique	147
I.1. Equilibre d'adsorption	150
I.1.1. Isotherme de Langmuir	151
I.1.2. Loi d'action de masse	152
I.2. Aspects cinétiques de l'échange d'ions	155
I.3. Théorie de l'équilibre	156
II. Isotherme d'échange d'ions de Rubisco dans le support QHyperZ	159
II.1. Protocole expérimental	159
II.2. Résultats	160
II.3. Application de la théorie de l'équilibre aux courbes de percée	163
II.3.1. Lit fixe	164
II.3.2. Lit expansé	166
II.4. Conclusion	168
III. Cinétique de rétention	169
III.1. Principe de détermination des constantes cinétiques	169
III.1.1. Bilans	170
III.1.2. Nombre de Sherwood	172
III.1.3. Coefficient de diffusion de la Rubisco en solution à dilution infinie	173
III.2. Protocole expérimental	173
III.3. Résultats	174
III.3.1. Observations générales	174
III.3.2. Estimation de k_f et D_s	175
IV Conclusions	176
CONCLUSION GENERALE	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187
ANNEXES	203

NOMENCLATURE

Lettres latines

C	concentration de la protéine en solution	g.L^{-1}
C_0	concentration initiale de la protéine en solution	g.L^{-1}
C_i	concentration de la protéine dans la solution à l'interface liquide-solide	g.L^{-1}
C_f	concentration finale de la protéine	g.L^{-1}
\bar{C}	concentration de la protéine dans la phase solide notée aussi q	g.L^{-1}
d_p	diamètre des particules	m
D	coefficient de diffusion moléculaire	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
D_{axL}	coefficient de dispersion axiale de la phase liquide	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
D_{axp}	coefficient de dispersion axiale des particules solides	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
D_s	coefficient effectif de diffusion de la protéine dans la particule	$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
H	hauteur finale du lit	m
H_0	hauteur du lit sédimenté	m
k_f	coefficient de transfert massique externe	m.s^{-1}
$K_{\text{A/B}}$	constante d'équilibre définie comme le coefficient de sélectivité	
K_a	constante d'acidité	
K_L	paramètre du modèle de Langmuir	L.g^{-1}
n	indice de l'expansion	
pI	pH isoélectrique d'une protéine	
q	concentration de la protéine dans le support solide	g.L^{-1}
Q	capacité maximale d'adsorption à l'équilibre	g.L^{-1}
$Q_{10\%}$	Capacité dynamique de rétention à 10%	g.L^{-1}
q_s	capacité du support en équivalent ion	g.L^{-1}
q_z	paramètre de la loi d'action de masse	g.L^{-1}
\bar{q}	concentration moyenne de protéine dans la particule	g.L^{-1}
R_p	rayon de la particule	m
S	section de la colonne	m^2
t_s	temps de séjour	s
u	vitesse interstitielle de la phase liquide	m.s^{-1}
u_c	vitesse de front d'une concentration constante	m.s^{-1}
U	vitesse superficielle de la phase liquide	m.s^{-1}
U_{min}	vitesse minimale de fluidisation	m.s^{-1}
U_{ter}	vitesse terminale de fluidisation	m.s^{-1}
$V_{10\%}$	volume passé dans la colonne lorsque la concentration en sortie est égale à 10% de C_0	L
V_L	volume de la phase liquide	L
V_R	volume de la résine	L
V_s	volume stœchiométrique	L
V_p	volume poreux du lit	L

x_A	fraction molaire de l'espèce A en solution
y_A	fraction molaire de l'espèce A sur le support
z_A	Charge effective de l'espèce A

Lettres grecques

ε	porosité finale du lit	
ε_0	porosité finale du lit sédimenté	
$\bar{\varepsilon}$	puissance de l'agitation par unité de masse du liquide	cm^2 / s^3
η_l	viscosité dynamique du liquide	Pa.s
ρ_l	masse volumique du liquide	g / cm^3
ρ_p	masse volumique de la particule	g / cm^3
σ^2	Variance	s^2

Nombres adimensionnels

Bo	nombre de Bodenstein
N	nombre de mélangeurs
Pe _p	nombre de Peclet particulaire
Re _{ter}	nombre de Reynolds terminal
Sc	nombre de Schmidt
Sh	nombre de Sherwood

Abréviations

A	Aire de la Rubisco du pic sur le chromatogramme
A ₂₈₀	Absorbance à 280 nm
CLE	Chromatographie en lit expansé
DMAT	Déshydratation mécanique assistée thermiquement
HPLC SEC	Chromatographie liquide à haute performance d'exclusion stérique
LS	Grande sous-unité de la Rubisco
MW	Molecular weight
Rubisco	Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase
SDS PAGE	Electrophorèse en conditions dénaturantes : Soduim Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SS	Petite sous-unité de la Rubisco

LISTE DES FIGURES

Figure I-1. Formule générale d'un acide aminé.

Figure I-2. Représentation des domaines de prédominance des différentes formes ionisées d'un acide aminé en fonction du pH avec $pK_{a1} = 2$ et $pK_{a2} = 9$.

Figure I-3. Organisation générale d'une cellule végétale (de blé) [Poux, 1962].

Figure I-4. Représentations schématiques de la structure spatiale de la Rubisco L8S8, (A) selon Costes (1981) ; (B) selon Knight et al., (1990).

Figure I-5. Production de concentré de protéines hydrophiles (PX), procédé de France Luzerne [Gastineau and De Mathan 1981].

Figure I-6. Schéma du procédé industriel de production de Rubisco à partir des jus de luzerne, élaboré à partir du brevet de Levesque et Rambourg (2002).

Figure I-7. Schéma général des étapes de purification d'une protéine à partir d'un milieu biologique brut [Amersham Biosciences].

Figure I-8. Phénomènes mis en jeu lors de la chromatographie d'échange d'ions : G^- groupements ionisés, A^+ : contre ions, B^+ et C^- ions présents dans la solution à traiter et D^+ et E^- ions présents dans l'éluant.

Figure I-9. Les différents modes d'adsorption de protéines (de droite à gauche) : chromatographie en lit fixe, en lit expansé, en lit fluidisé et en colonne agitée.

Figure I-10. Représentation des étapes d'un procédé d'adsorption en lit expansé : (1) Lit sédimenté, (2) Equilibration, (3) Charge, (4) Lavage, (5a) Elution en lit fixe, (b) Elution en lit expansé, (6a) Nettoyage et régénération en lit fixe, (6b) en lit expansé.

Figure I-11. Détermination de la vitesse minimale de fluidisation (U_{min}) à partir de la relation entre la perte de charge dans un lit de particules et la vitesse superficielle du liquide (U) [Anspash 1999].

Figure II-1. Global layout of spinach fractionation and physico-chemical characterisation steps.

Figure II-2. Calibration curve of HPLC SEC column (Protein KW804 column, Shodex) carried out with proteins markers: Aprotinin, Ribonuclease A, Ovalbumin, Conalbumin, Aldolase, Catalase, Ferritin, Thyroglobulin. Rubisco molecular weight as a function of its elution volume is shown.

Figure II-3. HPLC SEC chromatogram obtained for spinach Rubisco solution at 1 g.L^{-1} . Sample volume is 0.1 mL, PBS eluent with a flow rate of 1 ml/min. F1 is the fraction having a MW close to 570 kDa and F2 fraction of MW between 60 and 6 kDa.

Figure II-4. Rubisco fractions analysis on SDS-PAGE 15%. From left to right: lane 1 BSA, lane 2 Lysozyme migration, lane 3 commercialised spinach Rubisco, lane 4 F1 , lane 5 F2. LSR: large subunit of Rubisco; SSR: small subunit of Rubisco.

Figure II-5. HPLC SEC chromatograms obtained for spinach Rubisco solutions. Sample volume is 0.1 ml, concentrations in Rubisco vary from 0.1 to 2 g.L⁻¹, PBS eluent with a flow rate of 1 ml/min.

Figure II-6. Calibration curve: Rubisco peak area versus theoretical Rubisco content (from 0.1 to 2 g.L⁻¹).

Figure II-7. HPLC SEC chromatograms of juice samples produced at 50°C from spinach leaves with three cutting levels: B1: none, B2: coarse and B3: fine.

Figure II-8. HPLC SEC chromatograms obtained for spinach juice samples produced by the TAMD at different wall temperatures (30, 50, 70 and 90°C).

Figure II-9. Spinach juice proteins analysis on SDS-PAGE 15%. From right to left: lane 1 molecular weight marker, lane 2 spinach Rubisco migration, lane 3 spinach juice produced at 90°C, lane 4 spinach juice produced at 30°C, lane 5 spinach juice produced at 50°C, lane 6 spinach juice produced at 70°C. LSR: large subunit of Rubisco; SSR: small subunit of Rubisco.

Figure III-1. Chromatogramme obtenu par analyse HPLC SEC d'un échantillon de jus de luzerne reconstitué centrifugé et dilué 10 fois. Volume injecté 0,1 mL, élution au tampon phosphate à 1 mL/min. (a) chromatogramme entier, (b) pic de la Rubisco.

Figure III-2. Analyse par SDS-PAGE 15% des supports Hyper Z et des échantillons du jus après contact des supports. Voie G : marqueurs de poids moléculaire, F : CM Hyper Z après 4 heures de contact avec le jus de luzerne, E Q Hyper Z après 4 heures de contact avec le jus de luzerne, D : jus de luzerne après 4 heures de contact avec CM Hyper Z, C : jus de luzerne après 4 heures de contact avec Q Hyper Z, B : éluat du support CM Hyper Z et A : éluat du support Q Hyper Z.

Figure III-3. Schéma général du dispositif expérimental pour l'étude de la rétention de Rubisco par échange d'ions.

Figure III-4. (a) Réponse à une stimulation échelon de la colonne en lit fixe $F(\theta)$, (b) Courbe de la distribution des temps de séjour $E(\theta)$: distribution expérimentale (◆), distribution suivant le modèle de mélangeurs en cascade ($N=33$) (ligne discontinue), distribution suivant le modèle de convection-dispersion ($Pe = 70$) (ligne continue).

Figure III-5. (a) Réponse à une stimulation échelon de la colonne en lit expansé $F(\theta)$, (b) Courbe de la distribution des temps de séjour $E(\theta)$: distribution expérimentale (◆), distribution suivant le modèle de mélangeurs en cascade ($N=30$) (ligne discontinue), distribution suivant le modèle de convection-dispersion ($Pe = 61$) (ligne continue).

Figure III-6. Courbe de percée expérimentale de la Rubisco déterminée par traitement d'un jus reconstitué centrifugé de luzerne, dilué 6 fois (concentration initiale en Rubisco 2,10 g.L⁻¹) dans une colonne en lit fixe du support Q Hyper Z.

Figure III-7. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC SEC des fractions issues de la charge de la colonne en lit fixe avec un jus de luzerne à une concentration en Rubisco de $2,1 \text{ g.L}^{-1}$. (a) Chromatogrammes entiers, (b) pics de la Rubisco, (c) pics de composés de faible masse moléculaire.

Figure III-8. Courbes de percée de la Rubisco déterminées expérimentalement par traitement des jus reconstitués centrifugés de luzerne, dilués de 6, 10, 20, 40 et 100 fois, dans une colonne en lit fixe du support Q Hyper Z.

Figure III-9. Courbes de percée de la Rubisco déterminées expérimentalement par traitement des jus reconstitués centrifugés de luzerne, dilués de 1, 6, 8, et 10 fois, dans une colonne en lit expansé du support Q Hyper Z.

Figure III-10. Comparaison des $Q_{10\%}$ pour la Rubisco sur Q Hyper Z obtenues avec deux modes de contact différents : en lit fixe (gris) et en lit expansé (blanc) pour deux concentrations d'alimentation différentes.

Figure III-11. Courbe d'élution de la Rubisco chargée sur le support Q Hyper Z en colonne lit fixe à partir d'un jus de luzerne à une concentration initiale de Rubisco de $2,1 \text{ g.L}^{-1}$.

Figure III-12. Courbe d'élution de la Rubisco chargée en mode lit expansé (expérience 1). Elution en mode lit expansé avec $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et vitesse superficielle de $2,65 \text{ cm.min}^{-1}$.

Figure III-13. Courbe d'élution de la Rubisco chargée en mode lit expansé (expérience 2). Elution en mode lit fixe avec $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et vitesse superficielle de $0,65 \text{ cm.min}^{-1}$.

Figure III-14. Courbe d'élution de la Rubisco chargée en mode lit expansé (expérience 3). Elution en mode lit fixe avec $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et vitesse superficielle de $0,40 \text{ cm.min}^{-1}$.

Figure III-15. Courbe d'élution de la Rubisco chargée en mode lit expansé (expérience 4). Elution en mode lit fixe avec $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et vitesse superficielle de $0,40 \text{ cm.min}^{-1}$.

Figure III-16. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC SEC des fractions éluées de la colonne en lit fixe (expérience 5). (a) Chromatogramme complet, (b) pic de la Rubisco.

Figure III-17. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC SEC des fractions éluées de la colonne en lit expansé (expérience 3). (a) Chromatogramme complet, (b) pic de la Rubisco.

Figure III-18. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC SEC d'une solution de Rubisco d'épinard commerciale à 2 g.L^{-1} (en vert) et de la fraction obtenue à 19,5 min par élution en lit fixe de la résine charge lors de l'expérience 3 en lit expansé (en rouge).

Figure IV-1. Effet du coefficient de sélectivité $K_{A/B}$ sur la forme de l'isotherme d'échange d'ions.

Figure IV-2. Représentation schématique des particules disposées en colonne chromatographique montrant les différents mécanismes de transport et leur zone de localisation : (1) diffusion à travers les pores, (2) diffusion dans la phase solide, (3) réactivité chimique sur les sites de la phase solide, (4) transfert de matière externe et (5) zone de mélange liquide-liquide.

Figure IV-3. Schéma de propagation d'une onde lors de l'étape de charge d'une colonne chromatographique : Représentation du profil de concentration à deux instants successifs t_1 et $t_2 > t_1$, en fonction du profil de l'isotherme d'adsorption [Helfferich, 1993].

Figure IV-4. Isotherme d'adsorption de la Rubisco de luzerne pure sur l'échangeur anionique Q Hyper Z. Détermination en batch à partir d'une solution de Rubisco pure à $C_0 = 2,2 \text{ g.L}^{-1}$ et une concentration en NaCl $0,016 \text{ mol.L}^{-1}$ (conductivité de $1,02 \text{ mS.cm}^{-1}$) à température ambiante et à pH 6.

Figure IV-5. Courbe représentant la masse de Rubisco fixée dans la résine en fonction de la concentration de Rubisco en sortie de colonne. La masse fixée est déterminée à partir des courbes de percée expérimentales en lit fixe lorsque la concentration de Rubisco en sortie de colonne atteint 75% de la concentration d'alimentation.

Figure IV-6. Courbes de percée de Rubisco expérimentales, déterminées avec des jus de luzerne reconstitués centrifugés à différentes dilutions sur une colonne de Q Hyper Z en lit fixe. En ligne continue : temps de percée théoriques déterminés avec l'isotherme d'équilibre ; en ligne discontinue : temps de percée de référence (déterminés à partir de valeurs de rétention réelles).

Figure IV-7. Courbes de percée expérimentales de la Rubisco du jus vert de luzerne sur une colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit expansé remplie du support Q Hyper Z. En ligne continue temps de percée théorique dans les conditions de l'équilibre, en ligne discontinu temps de percée théorique dans les conditions de pseudo-saturation.

Figure IV-8. Evolution de la concentration de Rubisco avec le temps dans un réacteur batch en présence de l'échangeur Q Hyper Z à température ambiante. Concentration initiale de Rubisco en solution $2,2 \text{ g.L}^{-1}$. Rapport Liquide/Solide 11 (v/v).

Figure IV-9. Evolution de la fixation de Rubisco de luzerne sur le support Q Hyper Z avec le temps. A gauche, évolution de la concentration en solution. A droite, évolution de la concentration fixée. Les traits continus ont été calculés à partir de l'équation IV-22 (à gauche) pour les temps courts, et à partir de l'équation IV-25 (à droite), pour les temps plus longs.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1. Propriétés des supports chromatographiques classiques pouvant être utilisés en lit expansé et des supports spécifiques à la chromatographie en lit expansé (CLE) rapportées par Anspach et al., 1999.

Table II-1. Molecular weight proteins marker used for HPLC SEC column calibration.

Table II-2. Molecular weight markers used for SDS PAGE analysis.

Table II-3. Studied operating conditions of the TAMD process for green juice production.

Table II-4. Characteristics of spinach juices produced from different degrees of leaf cutting with the TAMD process at 50°C.

Table II-5. Characteristics of spinach juice samples produced at different wall temperatures.

Tableau III-1. Caractéristiques des échangeurs HyperZ® (d'après Pall Corporation, page internet vérifiée le 4/02/2011 : http://www.pall.com/biopharm_35755.asp).

Tableau III-2. Caractéristiques physico-chimiques de différents jus verts de luzerne d'origine industrielle.

Tableau III-3. Conditions expérimentales des différentes expériences de charge de Rubisco du jus de luzerne par colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit fixe.

Tableau III-4. Conditions expérimentales des différentes expériences de charge de Rubisco du jus de luzerne par colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit expansé.

Tableau III-5. Capacités dynamiques à 10% obtenues à partir des expériences de charge d'une colonne en lit fixe sur support Q Hyper Z avec un jus de luzerne à différentes concentrations initiales.

Tableau III-6. Capacités dynamiques à 10% obtenues à partir des expériences de charge d'une colonne en lit expansé sur support Q Hyper Z avec un jus de luzerne à différentes concentrations initiales.

Tableau III-7. Conditions expérimentales d'élution pour les expériences de charge de Rubisco du jus de luzerne réalisées en colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit fixe.

Tableau III-8. Conditions expérimentales d'élution pour les expériences de charge de Rubisco du jus de luzerne réalisées en colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit fixe.

Tableau III-9. Tableau récapitulatif des masses de Rubisco fixées et éluées pour les différentes expériences réalisées en colonne lit fixe sur le support Q Hyper Z.

Tableau III-10. Tableau récapitulatif des masses de Rubisco fixées et éluées pour les différentes expériences réalisées en colonne lit expansé sur le support Q Hyper Z.

Tableau IV-1. Conditions expérimentales de la solution de Rubisco utilisée pour la détermination en batch de l'isotherme d'équilibre de la Rubisco avec le support Q Hyper Z.

Tableau IV-2. Comparaison des conditions de concentration et de conductivité de la solution de Rubisco pure utilisée pour l'isotherme théorique et du jus à différentes dilutions utilisé dans les expériences de charge en lit fixe.

Tableau IV-3. Temps de percée théorique déterminé à partir de la théorie de l'équilibre pour les expériences de charge en lit fixe avec des concentrations de Rubisco différentes ($H=0,03$ m, cf Chapitre III, paragraphe IV.1).

Tableau IV-4. Temps de percée théorique déterminé à partir de la théorie de l'équilibre pour les expériences de charge en lit expansé avec des concentrations de Rubisco différentes ($H=0,21$ m, cf Chapitre III, paragraphe IV.1).

INTRODUCTION GENERALE

Pour répondre à une demande mondiale de protéines croissante, plusieurs nouvelles sources, notamment les feuilles végétales, sont de plus en plus proposées. Les protéines végétales sont les plus abondantes sur la planète et sont très renouvelables. Le rendement agronomique des protéines végétales est très intéressant. Sur 1 hectare, chaque année, 1800 à 3000 kg de protéines de luzerne sont obtenues contre 150 à 200 kg de protéines de viande, 400 kg de protéines laitières, 500 à 700 kg de protéines céréalières, 700 à 1200 kg de protéines issues des grains (Soja, Féverole, Colza) [Costes, 1981]. En plus d'une forte productivité, les protéines des feuilles présentent d'autres avantages, comme des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressantes. Elles ont été reconnues par la FAO (Food and Agriculture Organisation) comme une source potentielle et effective de protéines de haute qualité pour la consommation humaine en raison de l'abondance de leur source, de leur valeur nutritionnelle et de l'origine végétale donc sans cholestérol animal [Chen et Qiu, 2003].

La luzerne est la légumineuse la plus cultivée au monde. D'après la FAO, la récolte annuelle mondiale est d'environ 454 millions. En culture pure, la luzerne occupe 33 millions d'hectares, dont 13 en Amérique du Nord (États-Unis), 8 en Amérique du Sud (Argentine), et 8 en Europe. En France, la surface cultivée en luzerne couvre 600 000 hectares. La luzerne, principalement utilisée comme plante fourragère, est la plus cultivée des plantes légumineuses en Europe. Elle produit en Europe 2600 kg de protéines par hectare [Mauriès 1994] ce qui constitue un rendement particulièrement élevé en comparaison avec d'autres plantes cultivées. Il est par exemple quatre à cinq fois supérieur au rendement en protéines du blé ou du soja [Lamarche et Landry, 1992].

D'autre part, la culture de la luzerne est une culture à faible impact environnemental. En effet, la luzerne intègre l'azote de l'air en symbiose avec des bactéries du sol et ne nécessite ainsi pas d'engrais azotés. Ses racines profondes permettent l'enrichissement et l'ameublissement du sol. D'autre part, cette culture permet de protéger les nappes et les cours d'eau car elle joue un rôle de pompe à nitrates et assure un sol couvert toute l'année qui limite ainsi le ruissellement et les inondations.

Les protéines foliaires de luzerne sont caractérisées par un aminogramme équilibré. Leur composition en acide aminés essentiels, comme le montre le tableau 1, est comparable à celle de protéines d'origine animale telles que les protéines de l'œuf. Elle est globalement

conforme aux recommandations nutritionnelles de la FAO (Food and Agriculture Organisation) et la WHO (World Health Organisation).

Tableau 1. Acides aminés essentiels des protéines foliaires de luzerne [Gastineau et Mathan, 1981], de la Rubisco [Douillard, 1996], et de l'œuf [Sauveur, 1988]. Valeurs en g d'acide aminé pour 100 g d'acides aminés totaux.

Acides aminés essentiels	Protéines hydrophobes	Protéines hydrophiles	RuBisCO	Œuf	FAO /WHO
Valine	5.5	6.2	6.7	7.2	5.0
Leucine	9.8	8.6	9.3	9.2	7.0
Isoleucine	5.5	4.5	4.9	7.7	4.0
Phénylalanine	6.2	6.5	7.0	6.3	0.6
Tryptophane	2.1	3.2	2.7	1.5	1.0
Méthionine	1.8	1.9	1.9	4.0	3.5
Thréonine	5.7	4.8	5.3	4.3	4.0
Lysine	7.4	6.9	6.5	7.0	5.5

En dehors des propriétés nutritionnelles des protéines de la luzerne, leurs propriétés fonctionnelles montrent le potentiel qu'elles présentent pour des applications aussi bien dans le domaine alimentaire ou pharmaceutique que dans le domaine non alimentaire des adhésifs et films biodégradables. De plus, de nouvelles voies de valorisation de la protéine majoritaire des protéines de la luzerne, la Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase, basées sur son activité catalytique peuvent être envisagées : le progrès des bioprocédés suggère la possibilité de mise au point de procédés de fixation du dioxyde de carbone par l'immobilisation de la Rubisco dans un bioréacteur [Bhattacharya, 2001, Bhattacharya et al., 2002, Chakrabarti et al., 2002]. Toutefois, l'application des protéines solubles de la luzerne à tous ces domaines reste conditionnée par la possibilité de mettre en œuvre des procédés de séparation pour leur purification et concentration et par les effets de ces procédés sur leurs différentes propriétés.

Les récoltes de luzerne sont souvent destinées à la déshydratation car c'est le meilleur moyen de conservation jusqu'à sa consommation [Demarquilly et al., 1973 ; Bailly, 1989 ; Hamm, 2001]. En effet, vu sa faible teneur en sucres, la luzerne est peu adaptée à l'ensilage comme moyen de conservation, qui s'avère difficile [Fairburn et al., 1988]. Ainsi, la luzerne est traitée industriellement dans un procédé habituellement appelé de déshydratation. Ce procédé est apparu en France dans les années 60, il consiste à broyer et à presser la luzerne immédiatement après sa récolte pour séparer une fraction solide riche en fibres qui est destinée à l'alimentation animale et des quantités importantes d'un jus, appelé couramment

« jus vert », riche en protéines hydrophiles et hydrophobes, en pigments, en vitamines... Ces deux fractions, solide et liquide, présentent un intérêt économique.

Plusieurs travaux, dans les années 70, se sont intéressés à la valorisation des jus verts par la récupération de composés à faible ou moyenne valeur ajoutée. Ces travaux ont abouti à la production de concentrés de protéines totales, de concentrés de protéines hydrophiles ou de concentrés de protéines hydrophobes connus sous différentes dénominations (LCP, PX, ProXan...) [Kohler and Knuckles 1977, Pirie 1978, Telek et Graham 1983]. La plupart des procédés mis au point reposent sur le fractionnement des jus verts par thermo-coagulation ou par modification du pH ou par précipitation grâce à l'ajout de solvants, une étape de centrifugation, de lavage et souvent la combinaison de certaines de ces techniques. La plupart des concentrés produits présentent une faible valeur ajoutée puisqu'ils restent destinés essentiellement à l'alimentation animale. D'autres part, ces procédés sont coûteux à l'échelle industrielle en raison de leur consommation énergétique et peuvent surtout engendrer des modifications des propriétés des protéines importantes [Stahmann, 1978]. Au final, l'impact environnemental global de ces procédés est assez important.

Le concept de bioraffinerie, né dans les années 1980, n'a pas cessé de se développer face aux nouvelles préoccupations environnementales et aux évolutions du prix des énergies fossiles. Ce concept repose sur le modèle de la raffinerie pétrolière qui utilise du pétrole brut, pour fabriquer des carburants et des produits dérivés variés. De la même façon, la bioraffinerie a pour objectif de fractionner la plante puis de purifier et transformer les différents produits aux usages divers dans les domaines énergétique (biocarburants), non énergétique (polymères, tensioactifs, solvants, agromatériaux...) et agroalimentaire (protéines, pigments...).

C'est dans cet esprit que nous avons mené nos travaux de séparation d'une protéine cible à partir du jus produit par la déshydratation de la biomasse végétale qui est, dans le cadre de nos travaux, la luzerne. Pour cela, le procédé de séparation sélectionné est la chromatographie d'échange d'ions. En effet, la chromatographie d'échange d'ions pour la séparation des biomolécules a été introduite dans les années 60 et a beaucoup été développée depuis. Aujourd'hui, elle est l'une des techniques les plus utilisées en bioséparation (de protéines, de peptides, d'acides nucléiques...) car elle permet de séparer les biomolécules avec une bonne résolution et offre une capacité de traitement importante. Elle est caractérisée par une grande sélectivité puisqu'elle est capable de séparer des espèces moléculaires ayant des différences

mineures dans leurs propriétés de charge. La chromatographie d'échange d'ions est ainsi une technique bien adaptée pour la capture et la purification de biomolécules, bien que les modes d'application classiques s'adressent essentiellement à des solutions fortement pré-purifiées, compatibles avec un fonctionnement en lit fixe.

L'objectif de cette thèse est ainsi l'étude d'un procédé chromatographique d'échange d'ions pour la séparation sélective de la Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase (Rubisco) à partir du jus de luzerne. Dans le but de limiter le nombre d'étapes du procédé, et donc de réduire son impact environnemental, la particularité de ce travail a été de travailler directement avec des solutions brutes, réelles, et donc complexes. Afin d'évaluer les possibilités d'adaptation du procédé au traitement de ce type de solutions, deux modes de contact ont été utilisés : la séparation en lit fixe et la séparation en lit expansé. Dans les deux cas, cette étude s'attache essentiellement à la mise en œuvre du procédé mais aussi à la mise en évidence des interactions et des limitations du procédé de séparation de la protéine d'intérêt lorsqu'il est appliqué à un milieu végétal brut.

Pour aborder les difficultés posées par l'application des procédés de séparation aux milieux biologiques complexes, une synthèse bibliographique est d'abord présentée dans le premier chapitre. Elle permet de résumer quelques connaissances biochimiques de base des protéines et de présenter la protéine objet de cette étude et ses principales caractéristiques. Les bases physico-chimiques des procédés de séparation utilisés sont aussi exposées, tout en mettant l'accent sur la nécessité de prendre en compte la complexité des milieux à traiter. Le travail réalisé se trouvant clairement orienté vers les bioséparations, et donc à la frontière de deux domaines disciplinaires. Les connaissances de base multidisciplinaires nécessaires à la compréhension du sujet sont abordées.

Le chapitre 2 présente les méthodes analytiques qui ont été mises au point pour la caractérisation et la mesure de la protéine d'intérêt : la Rubisco. Ces méthodes permettent une analyse qualitative et quantitative de la Rubisco directement à partir de son milieu brut. En effet, on ne peut aborder un procédé de récupération de cette protéine sans disposer des outils analytiques spécifiques permettant de suivre sa concentration dans les différents milieux de travail.

L'étude du procédé chromatographique d'échange d'ions fait l'objet du troisième chapitre. Dans ce cadre, l'influence de la composition du jus initial est étudiée afin de mettre en évidence les interactions des composés de ce jus avec l'échangeur. Deux modes de contact sont étudiés et comparés dans des conditions opératoires communes ou spécifiques, le lit fixe et le lit expansé. En plus de constituer le cœur de l'étude, ce travail a été essentiel pour produire la protéine d'intérêt (qui n'est pas disponible commercialement) et aborder une analyse plus fondamentale sur les interactions de la protéine avec le support d'échange d'ions, qui sera développée dans le 4^{ème} et dernier chapitre. La détermination d'une isotherme d'équilibre et des mécanismes cinétiques a ainsi été initiée. Ce chapitre IV tente globalement d'appréhender la complexité des interactions entre la protéine et le support. La difficulté associée à la nature du milieu rend extrêmement difficile les déterminations quantitatives d'intérêt.

Ce travail de thèse a ainsi pour objectif d'apporter des réponses d'ordre appliqué et de poser des questions d'ordre fondamental en ce qui concerne les mécanismes de rétention d'une protéine cible à partir d'un milieu brut afin de décrire les performances de la séparation de celle-ci. Parallèlement à ces travaux, la modélisation des phénomènes impliqués a été initiée. Cet aspect du travail ne sera pas développé dans ce mémoire car il n'est pas abouti, mais montre déjà l'importance de la modélisation dans la compréhension des mécanismes et la difficulté de leur application aux milieux réels.

CHAPITRE I.
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire

I. Les protéines	33
I.1. Structure moléculaire	33
I.2. Propriétés générales	34
I.2.1. Masse molaire	34
I.2.2. Charge d'une protéine	34
I.2.3. Solubilité	37
I.3. La protéine dans son milieu	37
II. Les protéines foliaires de luzerne	38
II.1. Classification des protéines de luzerne	38
II.1.1. Protéines insolubles ou hydrophobes	39
II.1.2. Protéines solubles ou hydrophiles	40
II.2. Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase ou Rubisco	40
II.2.1. Structure tridimensionnelle	40
II.2.2. Point isoélectrique de la Rubisco	41
II.2.3. Température de dénaturation	42
II.2.4. Activité enzymatique	42
II.2.5. Propriétés fonctionnelles	43
II.2.6. Traitement industriel des jus de luzerne pour la récupération des protéines	43
III. Procédés conventionnels de séparation des protéines	45
III.1. Techniques de séparation chromatographiques	47
III.2. La chromatographie d'échange d'ions	48
III.2.1. Les matériaux échangeurs d'ions	50
III.2.2. Nature de la matrice	50
III.2.3. Nature des groupes fonctionnels	51
IV. Purification primaire des milieux bruts	52

IV.1. Chromatographie en réacteur agité	53
IV.2. Chromatographie en lit fluidisé	53
IV.3. Chromatographie en lit expansé	54
IV.3.1. Mise en œuvre des procédés chromatographiques en lit expansé	56
IV.3.2. Aspects hydrodynamiques	57
<i>IV.3.2.1 Fluidisation du support solide</i>	<i>57</i>
<i>IV.3.2.2 Classification</i>	<i>60</i>
<i>IV.3.2.3 Dispersion en phase liquide</i>	<i>61</i>
IV.3.3. Support solide	63
IV.3.4. Applications de la chromatographie en lit expansé	65
V. Conclusion	67

Ce chapitre a pour objectif, dans un premier temps, de rappeler des éléments théoriques nécessaires à la compréhension de la biochimie des protéines de luzerne. Cela permettra de faire le lien entre les propriétés de ces protéines, le potentiel de valorisation des jus verts de luzerne, la complexité du milieu et l'importance du procédé à mettre en œuvre.

Dans un deuxième temps, les principes de base sur lesquels reposent les techniques conventionnelles de séparation des protéines à partir d'un milieu brut sont synthétisées. Ceci permet de justifier le besoin de procédés plus adaptés à ces milieux comme la chromatographie en lit expansé. Un état de l'art des différents aspects et différentes applications de ce procédé est alors discuté.

I. Les protéines

Une protéine est une macromolécule biologique obtenue par copolymérisation d'acides aminés. Il existe une vingtaine d'acides aminés ce qui fait d'eux des éléments indispensables à toutes les espèces puisqu'ils participent à tous les stades de l'organisation des tissus et du déroulement de nombreux processus. La structure, la composition et les principales propriétés générales des protéines seront brièvement décrites dans ce qui suit d'après Voet et Voet (2005).

I.1. Structure moléculaire

Les protéines sont toujours composées de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène et très souvent de soufre. Elles peuvent également contenir du fer, du zinc, du phosphore ou du cuivre.

Les acides aminés constituent les éléments unités d'une protéine : ces acides aminés sont des acides α -aminés. Leur formule générale est représentée par la figure I-1. La structure de la chaîne latérale R diffère d'un acide aminé à un autre.

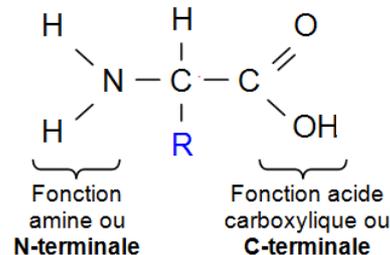


Figure I-1. Formule générale d'un acide aminé.

En fonction du nombre d'acides aminés, on distingue, les peptides (moins de 60 acides aminés enchaînés) et les protéines qui comprennent plus de 60 acides aminés et dont certaines sont de très grandes molécules ou macromolécules.

Les acides aminés sont reliés par des liaisons peptidiques en chaînes plus ou moins complexes et forment des structures que l'on qualifie de primaire, secondaire, tertiaire ou quaternaire. La structure primaire est le squelette de la protéine, elle représente l'enchaînement d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. La liaison peptidique est une liaison amide qui se forme par élimination d'une molécule d'eau entre la fonction C-terminale d'un acide aminé et la fonction N-terminale de l'acide aminé voisin.

Le repliement de la chaîne peptidique par la formation de liaisons hydrogène entre les acides aminés du squelette protéique donne naissance à des structures secondaires variables qui peuvent correspondre à plusieurs configurations spatiales. On distingue les structures hélice α , feuillets plissés β ou triple hélices.

La structure tertiaire provient des associations intramoléculaires, telles que des interactions ioniques, hydrophobes, hydrogène, ponts disulfure qui entraînent la courbure des chaînes.

Enfin, la structure quaternaire n'est autre qu'une association de plusieurs structures tertiaires (chaînes polypeptidiques) qui sont appelées dans ce cas des sous-unités ou monomères et qui peuvent être semblables ou différentes. On parle dans ce cas de protéines oligomériques ou multimériques.

Le degré d'organisation auquel aboutit la protéine est très élevé et souvent essentiel à sa fonction biologique surtout dans le cas des enzymes. Pour cette raison, les protéines sont des molécules complexes et fragiles. Leur conformation et leurs propriétés biologiques, nécessaires à leur activité, ne sont conservées que dans un domaine restreint de pH, de température et de force ionique, au-delà de ce domaine des modifications surviennent, comme le déroulement ou l'hydrolyse des chaînes polypeptidiques. On parle alors de protéine dénaturée qui peut avoir perdu son activité biologique. Toutefois, cette dénaturation peut être irréversible ou réversible auquel cas la protéine peut retourner à son état natif.

I.2. Propriétés générales

On caractérise en général une protéine par sa masse molaire, par son point isoélectrique et son hydrophobicité. Ces paramètres résultent du nombre et de la nature des acides aminés qui constituent la protéine mais également de la structure moléculaire globale de celle-ci.

I.2.1. Masse molaire

La masse molaire d'une protéine peut aller de 6 à plus de 1000 kDa. Une protéine de masse molaire supérieure à 50 kDa est vraisemblablement constituée de plus d'une chaîne peptidique. Par conséquent, ce paramètre représente une information stérique sur la protéine.

I.2.2. Charge d'une protéine

La charge nette électrostatique d'une protéine provient de la déprotonation ou de la protonation des groupements à caractère acide ou basique des résidus R (figure 1) des acides

aminés qui la constituent. Selon la structure tertiaire et/ou quaternaire, ces groupements vont plus ou moins apparaître à la surface de la protéine.

Dans le cas d'un acide aminé neutre, les constantes d'acidité des couples fonction carboxylique-carboxylate et ammonium-amine d'un acide aminé ($\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$) sont respectivement :

$$K_{a_1} = \frac{[\text{NH}_3^+\text{CHR}\text{COO}^-] \times [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{NH}_3^+\text{CHR}\text{COOH}]} \quad \text{Equation I-1}$$

$$K_{a_2} = \frac{[\text{NH}_2\text{CHR}\text{COO}^-] \times [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{NH}_3^+\text{CHR}\text{COO}^-]} \quad \text{Equation I-2}$$

Les différents états d'ionisation d'un acide aminé peuvent être expliqués par la figure I-2 qui montre les domaines de prédominance de chaque forme en fonction du pH du milieu :

- A très faible pH l'acide aminé a ses deux formes acido-basiques protonées, il se trouve sous la forme $\text{NH}_3^+\text{-CHR-COOH}$. Il possède donc une charge nette positive.

- A pH plus élevé, la fonction acide carboxylique se dissocie et l'acide aminé se retrouve sous une forme dipolaire, totalement ionisée : $\text{NH}_3^+\text{-CHR-COO}^-$. Cette espèce électriquement neutre est appelée zwitterion. Lorsque la forme zwitterionique est à sa concentration maximale, le pH est appelé pH isoélectrique ou point isoélectrique (pI). Il est défini par l'équation I-3.

$$\text{pH}_1 = \frac{1}{2}(\text{pK}_{a_1} + \text{pK}_{a_2}) \quad \text{Equation I-3}$$

- A pH basique c'est la fonction ammonium qui va se dissocier pour donner la forme $\text{NH}_2\text{-CHR-COO}^-$. La charge nette de l'acide aminé devient alors négative.

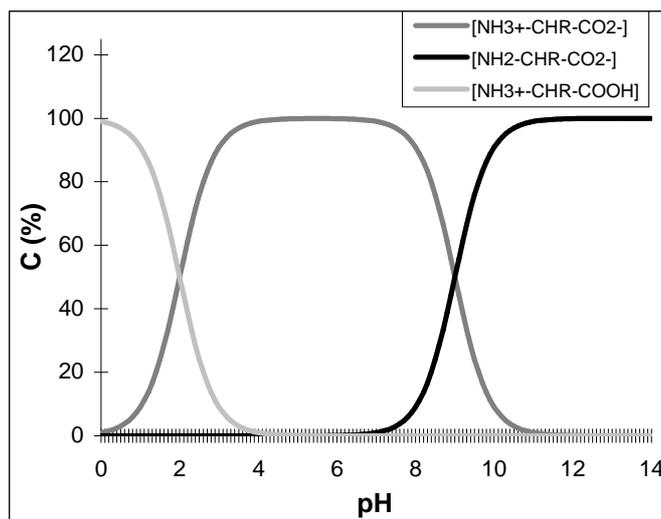


Figure I-2. Représentation des domaines de prédominance des différentes formes ionisées d'un acide aminé en fonction du pH avec $pK_{a1} = 2$ et $pK_{a2} = 9$.

Ainsi, un acide aminé existe sous trois formes ionisées possibles en fonction du pH de la solution : la charge globale de l'acide aminé est donc nulle au point isoélectrique, elle est négative à un pH supérieur au point isoélectrique, elle est positive à pH inférieur au point isoélectrique. De même pour une protéine, à pH inférieur au pI, on peut supposer que les fonctions amines basiques sont ionisées alors que les fonctions carboxyliques ne le sont pas. La protéine porte alors une charge globalement positive et inversement à pH supérieur au pI elle porte une charge globale négative. Enfin à pH égal au pI, la charge nette de la protéine est nulle.

Toutefois, il est important de signaler que le point isoélectrique d'une protéine est une information insuffisante pour prédire, par exemple, le mode de rétention d'une protéine par des forces électrostatiques. Le fait que, par définition, la charge globale de la protéine soit nulle à son pI ne signifie pas que celle-ci ne présente pas de charge à sa surface, mais que les charges se compensent. En effet plusieurs auteurs ont montré que pratiquement toutes les protéines se fixent à leur pI à un échangeur d'ions. Pour certaines la rétention est même maximale à ce pH [Koutsoukos, 1982, Kopaciewicz, 1983, Regnier, 1987]. En effet, en fonction de la taille, la structure et la conformation tridimensionnelle d'une protéine, au point isoélectrique les charges peuvent être plus ou moins accessibles et/ou spécifiquement distribuées. La protéine peut alors se fixer à un échangeur d'ions, par exemple, même si elle se trouve à son point isoélectrique.

I.2.3. Solubilité

La solubilité d'une protéine dans différents solvants est déterminée par la distribution à sa surface des chaînes latérales hydrophiles et hydrophobes et des groupes ionisables, des acides aminés constitutifs. La solubilité varie donc avec le pH, la force ionique, la température et la nature du solvant dans lequel elle se trouve. Lorsqu'on s'intéresse au comportement des protéines dans les milieux naturels, le pH et la force ionique sont particulièrement intéressants.

- Le pH

Pour une force ionique donnée, le minimum de solubilité dans l'eau d'une protéine est à son point isoélectrique (souvent attribué à un minimum de répulsion électrostatique).

- La force ionique

Dans des conditions de faible concentration en sels, la solubilité de la protéine est augmentée. C'est l'effet salting-in dû aux modifications de capacité d'ionisation des groupes ionisables. En augmentant la concentration du sel, la solubilité des protéines passe par un maximum avant de décroître. A des concentrations salines élevées, les protéines vont alors être complètement précipitées, c'est l'effet salting out ou relargage. Il est ainsi possible de séparer les protéines présentes dans un milieu biologique par ajout de sel. La concentration de sel à laquelle une protéine (ou un groupe de protéines) précipite dépend de son hydrophobicité. Plus une protéine est hydrophobe moins la concentration en sel nécessaire à sa précipitation est élevée.

I.3. La protéine dans son milieu

L'origine des protéines étant toujours biologique, la protéine se trouve dans un milieu complexe parmi tous les autres composants du milieu. La présence de ces composants participe activement à la stabilisation de la protéine en solution. Ainsi, les ions (sels) peuvent présenter un effet stabilisateur (sels kosmotropes) et d'autres un effet dénaturant (sels chaotropes) sur les structures des protéines [Cacace et al. 1997]. La stabilisation de la protéine dans son milieu découle également des propriétés intrinsèques comme sa charge nette (pI), la distribution des groupements à sa surface, les interactions hydrophobes. Les protéines peuvent également être complexées à d'autres molécules comme les polyphénols, les pigments, ou les lipides.

II. Les protéines foliaires de luzerne

II.1. Classification des protéines de luzerne

Les protéines de luzerne sont principalement localisées dans la partie foliaire de la plante où elles constituent 13 à 25% de la matière sèche, en fonction de l'espèce, du climat et surtout du stade de développement de la plante [Lamarche et Landry, 1992]. Jusqu'à 75% des protéines trouvées dans les feuilles sont des protéines du chloroplaste. Ces protéines chloroplastiques sont divisées en deux groupes : les protéines insolubles dans l'eau et les protéines hydrosolubles qui peuvent être extraites dans l'eau lors de l'éclatement des chloroplastes [Costes, 1981].

Cette répartition des protéines chloroplastiques a permis la distinction entre les deux groupes de protéines foliaires qu'elles soient chloroplastiques ou non :

- Les protéines non hydrosolubles qui sont en général les protéines intrinsèques des membranes (lamelles des chloroplastes, membranes interne et externe des mitochondries, appareil de Golgi).
- Les protéines hydrosolubles, que l'on retrouve à quelques exceptions près dans le stroma des chloroplastes, dans le cytosol, dans la matrice mitochondriale et dans le nucléoplasme.
-

La figure I-3 représente schématiquement une cellule végétale, permettant de distinguer les différents organites cités dans ce paragraphe.

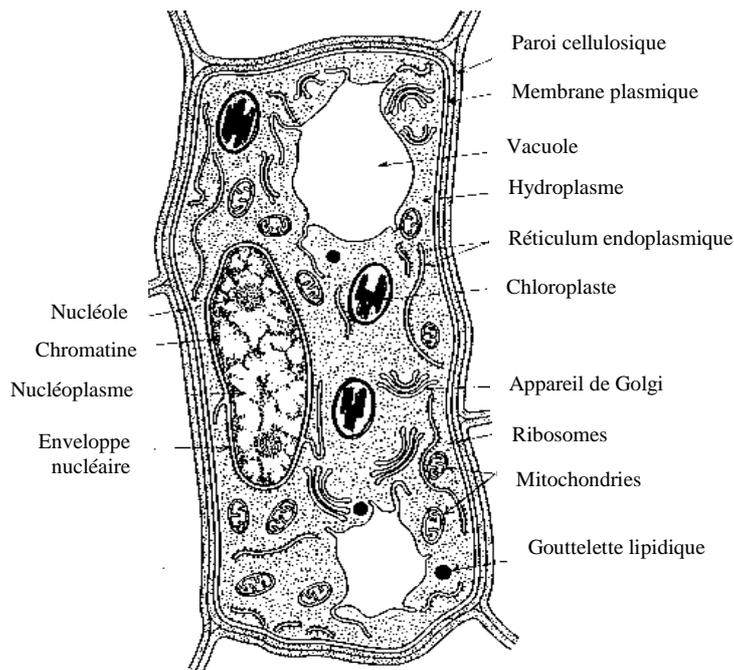


Figure I-3. Organisation générale d'une cellule végétale (de blé) [Poux, 1962].

II.1.1. Protéines insolubles ou hydrophobes

Ce sont essentiellement des protéines membranaires qui participent au processus de conversion de l'énergie de la lumière en énergie chimique. Parmi ces protéines hydrophobes on peut distinguer les chromoprotéines des photosystèmes, les protéines de la chaîne de transfert d'électron et les ATPases. Ce groupe de protéines est souvent appelé protéines vertes en raison de leur association à des pigments lipophiles tels que la chlorophylle. Les chromoprotéines sont notamment complexées de manière assez forte à un pigment photorécepteur (chlorophylle a, b, caroténoïdes). En 1975, Thornber a décrit un complexe protéine-chlorophylle la Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein ou LHCP. Ce complexe peut représenter, selon les génotypes et les conditions de croissance de la plante, jusqu'à 50% des protéines membranaires totales. Il peut rassembler de 40 à 60% de la chlorophylle totale des chloroplastes. Un second complexe chromoprotéique correspond au centre photochimique du photosystème I (CPI), il rassemble 20 à 30% de la chlorophylle totale des feuilles.

Les protéines vertes ont une distribution de masse moléculaire allant de 20 à 100 kDa, un pH isoélectrique compris entre 4,6 et 4,8. Elles présentent une faible résistance aux traitements thermiques et précipitent en totalité à partir d'une température de 50 °C [Dilly et De Mathan, 1978].

II.1.2. Protéines solubles ou hydrophiles

Ce sont des protéines non membranaires qui sont extraites par éclatement des organites cellulaires. Elles représentent principalement des enzymes (intra-cytoplasmique et intra-chloroplastiques) du métabolisme cellulaire. Ce groupe de protéines est souvent appelé protéines blanches. Ces protéines ont été divisées en deux groupes en fonction de leur vitesse de sédimentation en ultrafiltration [Jones et Mangan, 1976].

Le premier groupe appelée f-1-p est constitué de protéines de masses moléculaires homogènes, lesquelles constituent la majeure partie des protéines des chloroplastes des feuilles [Wildman et Bonner, 1947]. La caractérisation des protéines blanches par la technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) a montré que le groupe f-1-p se compose majoritairement des deux sous-unités de la Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase (protéine dont les propriétés seront détaillées ultérieurement) et que cette fraction représente plus de 65% des protéines blanches totales [Douillard, 1985].

La deuxième fraction f-2-p représente moins de 35% des protéines blanches, elle est composée de protéines hydrosolubles hétérogènes.

II.2. Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygénase ou Rubisco

Cette protéine est la plus abondante des protéines solubles. Elle représente de 30 à 70% (% massique) des protéines solubles des feuilles de luzerne [Douillard et De Mathan, 1994] et elle joue un rôle important dans la photosynthèse.

II.2.1. Structure tridimensionnelle

La Rubisco est une protéine globulaire, multimérique. Chez les végétaux supérieurs, elle représente la protéine qui a la masse moléculaire la plus élevée, d'environ 560 kDa, et présente une structure quaternaire en L8S8. Cette structure comporte huit grosses sous-unités (LS) qui font chacune environ 56 kDa et huit autres petites sous-unités (SS) chacune de 14 kDa [Barbeau et Kinsella, 1988 ; Douillard & de Mathan, 1994]. La composition en acides aminés, la structure des deux types de sous-unités et leurs principales propriétés ont été beaucoup étudiées.

La structure tridimensionnelle de la Rubisco, chez les végétaux supérieurs, a été décrite par Cotes (1981). Cette structure montre que l'édifice moléculaire est arrangé en double couche, chacune ayant quatre grandes et quatre petites masses sphériques.

D'autre part, l'organisation des sous-unités a été décrite grâce à la diffraction des rayons X [Knight et al., 1990] qui a montré 4 dimères des grosses sous-unités, formant une structure en tonneau. Les petites sous-unités sont organisées en deux tétramères qui associent aux extrémités inférieures et supérieures le noyau formé par les grandes sous-unités. Les représentations schématiques de la structure spatiale de la Rubisco, qui ont été proposées dans la littérature, sont présentées dans la figure I-4.

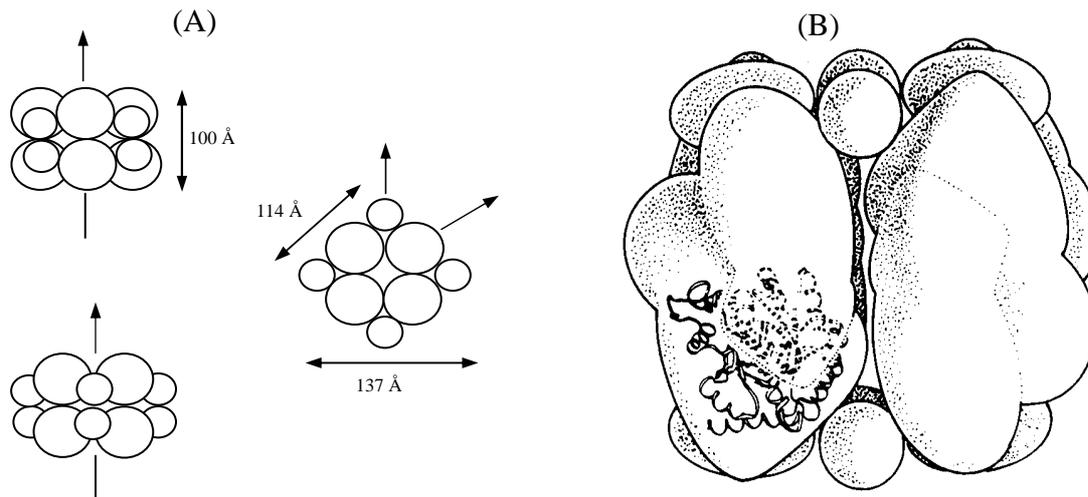


Figure I-4. Représentations schématiques de la structure spatiale de la Rubisco L8S8, (A) selon Costes (1981) ; (B) selon Knight et al., (1990).

II.2.2. Point isoélectrique de la Rubisco

Le point isoélectrique de la Rubisco varie en fonction de son origine végétale mais également en fonction de la méthode de détermination c'est-à-dire du milieu dans lequel la protéine se trouve au cours de la mesure. Ainsi le pI de la Rubisco de tabac, de coton, d'épinard ou de maïs a été déterminé à 4,5 par une étude de solubilité dans une large gamme de pH [Bahr et al., 1977].

Dans le cas de la Rubisco de luzerne, les points isoélectriques de la grande et de la petite sous-unités ont été déterminés par focalisation isoélectrique [Daday et Whitecross, 1983]. Le pI de la grande sous-unité a été alors estimé entre 6,6 et 6,9, celui de la petite sous-unité à 7,45. Le point isoélectrique de la Rubisco de luzerne (L8S8) est a été estimé à 6,0 par Douillard et Songrilay Kongphet (1990) et à 4,9 par Antonov et Shoshinsky (2000). Par conséquent, il est difficile de conclure quant à la charge globale de cette protéine en fonction du pH du milieu dans lequel elle se trouve [Douillard et De Mathan, 1994].

Les divergences observées dans les points isoélectriques déterminés sont liées à la composition en acides aminés lorsque l'urée, utilisée pour la séparation des sous-unités, est présente dans le milieu de mesure du pI. La conformation de la molécule joue certainement un rôle important, même quand les conditions ne sont pas dénaturantes, puisque le pI de la Rubisco n'est pas dans la plage trouvée pour les sous-unités.

On peut conclure de ces données que le point isoélectrique des Rubiscos extraites de différentes plantes n'est pas une constante. Il faut donc être vigilant lors de la comparaison des propriétés et de l'application des procédés des différentes Rubisco notamment pour ceux-ci dépendent de la charge de la protéine.

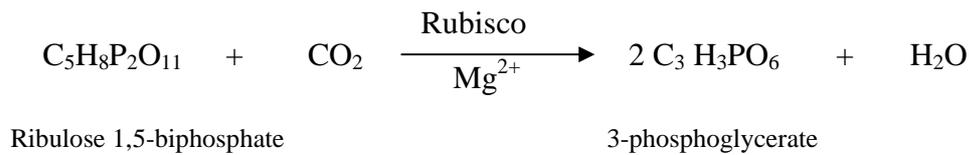
II.2.3. Température de dénaturation

La température de dénaturation de la Rubisco de luzerne a été déterminée par calorimétrie différentielle [Burova et al., 1989, Beghin et al., 1993]. Les deux études ont prouvé qu'à pH 7,5 la température de dénaturation de la Rubisco est comprise entre 66 et 70°C et que celle-ci diminue avec l'augmentation du pH. Toutefois, différents types de modifications structurales en fonction de la température ont été décrits par Li et al (2002). Ainsi, entre 25 et 45°C, les structures tertiaire et/ou quaternaire subissent une dénaturation avec une cinétique très lente, mais la structure secondaire de la protéine n'est pas affectée. Entre 45 et 60°C celle-ci présente quelques modifications alors que la cinétique de dénaturation des structures tertiaire et quaternaire devient plus rapide [Li et al 2002].

II.2.4. Activité enzymatique

La Rubisco est la protéine la plus abondante dans le monde vivant à cause de son rôle important dans le cycle de Calvin [Ellis 1979]. Elle est dotée d'une activité biologique puisqu'elle catalyse la première réaction du cycle de Calvin dans les cellules végétales.

La ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase est une enzyme bifonctionnelle. Elle intervient à la fois dans la photosynthèse et dans la photorespiration des plantes. Dans la photosynthèse, l'enzyme catalyse la première étape de la fixation du dioxyde de carbone. Dans cette réaction de carboxylation, une molécule de CO₂ est ajoutée à un sucre, le ribulose 1,5-biphosphate (RuBP), pour donner deux molécules de 3-phosphoglycérate (3 PGA) comme le montre l'équation suivante :



La Rubisco peut catalyser la réaction d'oxygénation du RuBP produisant dans ce cas une molécule de 3- phosphoglycérate et une molécule de 2-phosphoglycolate [Sissel et al., 1999]. Il a été démontré par Andrews (1988) que la petite sous-unité n'était pas essentielle pour la catalyse de la réaction de carboxylation, le site catalytique de l'enzyme serait ainsi localisé au niveau de la grande sous-unité. Enfin, une activation de la Rubisco est indispensable pour son activité enzymatique. Elle est réalisée par la fixation des ions Mg^{2+} qui provoquent un changement de conformation de la protéine.

II.2.5. Propriétés fonctionnelles

Les propriétés fonctionnelles des protéines blanches comme la Rubisco ont été largement étudiées. Les propriétés de solubilité, de gélification, le pouvoir émulsifiant et moussant de ces protéines sont comparables à celles des protéines standards [Barbeau, 1990, Knuckles & Kohler, 1982, Sheen, 1991, Wang et Kinsella, 1976]. Knuckles and Kohler (1982) ont montré que le pouvoir émulsifiant et la stabilité de l'émulsion des protéines solubles de luzerne sont similaires à ceux des protéines de Soja. Cependant, la plupart de ces propriétés sont largement affectées par les conditions physico-chimiques (température, pH...) auxquelles la protéine est soumise pendant son extraction et sa purification [Lamsal et al., 2007].

Les protéines jouent non seulement un rôle important dans les organismes vivants, mais elles ont aussi un très large potentiel d'application dans des produits pharmaceutiques et thérapeutiques et dans l'industrie alimentaire, textile, des détergents et du papier. Avec le développement des biotechnologies et de la biologie moléculaire en particulier, différents types de protéines sont produites aujourd'hui à partir de matière première biologique. En ce qui concerne les protéines de luzerne, il existe un réel intérêt à produire ces protéines car, outre leurs propriétés nutritionnelles, elles présentent un potentiel d'application intéressant.

II.2.6 Traitement industriel des jus de luzerne pour la récupération des protéines

Compte tenu de l'intérêt commercial des protéines, des procédés industriels ont été développés depuis plusieurs décennies afin de récupérer et valoriser celles contenues dans les

sous-produits industriels. La figure I-5 schématise le procédé industriel permettant de récupérer un concentré des protéines hydrophiles à partir des jus de déshydratation de la luzerne. Ce procédé industriel illustre bien, par ailleurs, les procédés classiques de bioséparations aux multiples étapes. La présence de nombreuses opérations de séparation, la consommation énergétique élevée de certaines étapes et la consommation non négligeable des produits chimiques (comme les sels d'ammonium) induisent un impact environnemental et économique assez lourd, outre le fait que les produits finis ne soient pas à très haute valeur ajoutée.

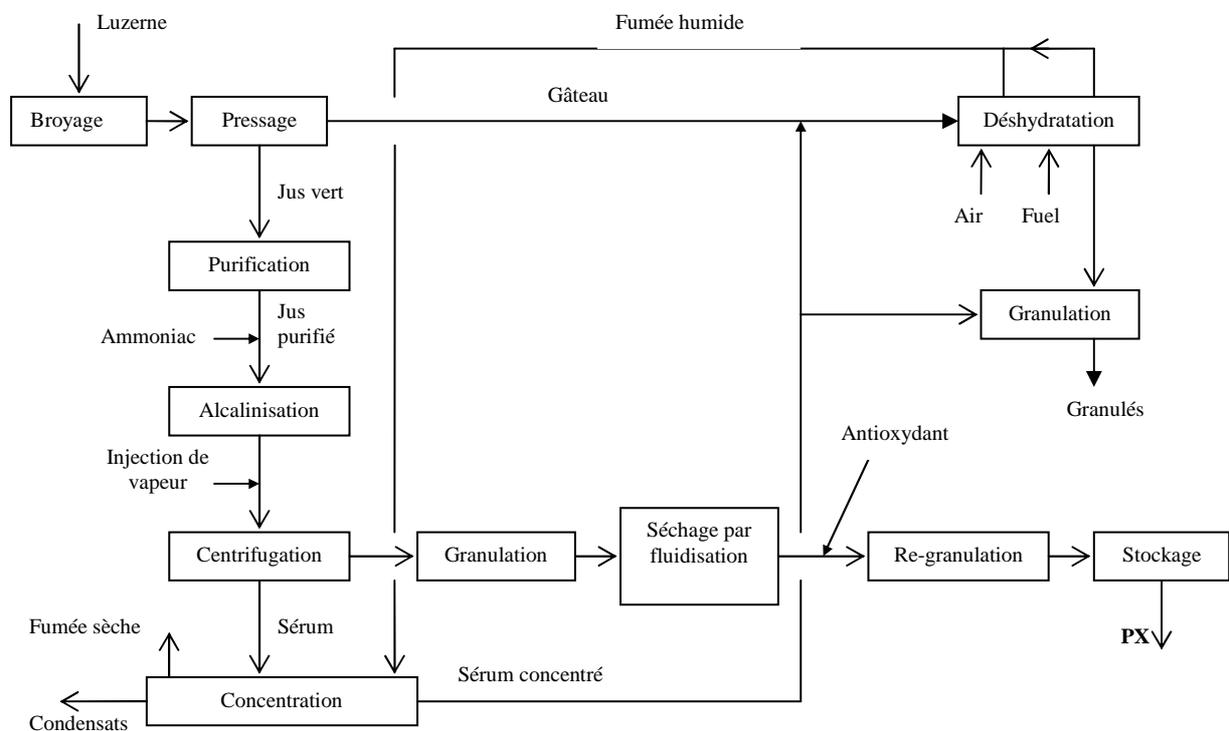


Figure I-5. Production de concentré de protéines hydrophiles (PX), procédé de France Luzerne [Gastineau and De Mathan 1981].

Depuis les années 70, de nombreuses études se sont attachées au développement des procédés industriels permettant la production d'une protéine Rubisco de haute pureté. Le procédé présenté par la figure I-6, par exemple, a été breveté en 2002, sans avoir trouvé de développement industriel, notamment du fait de sa complexité [Levesque et Rambourg, 2002].

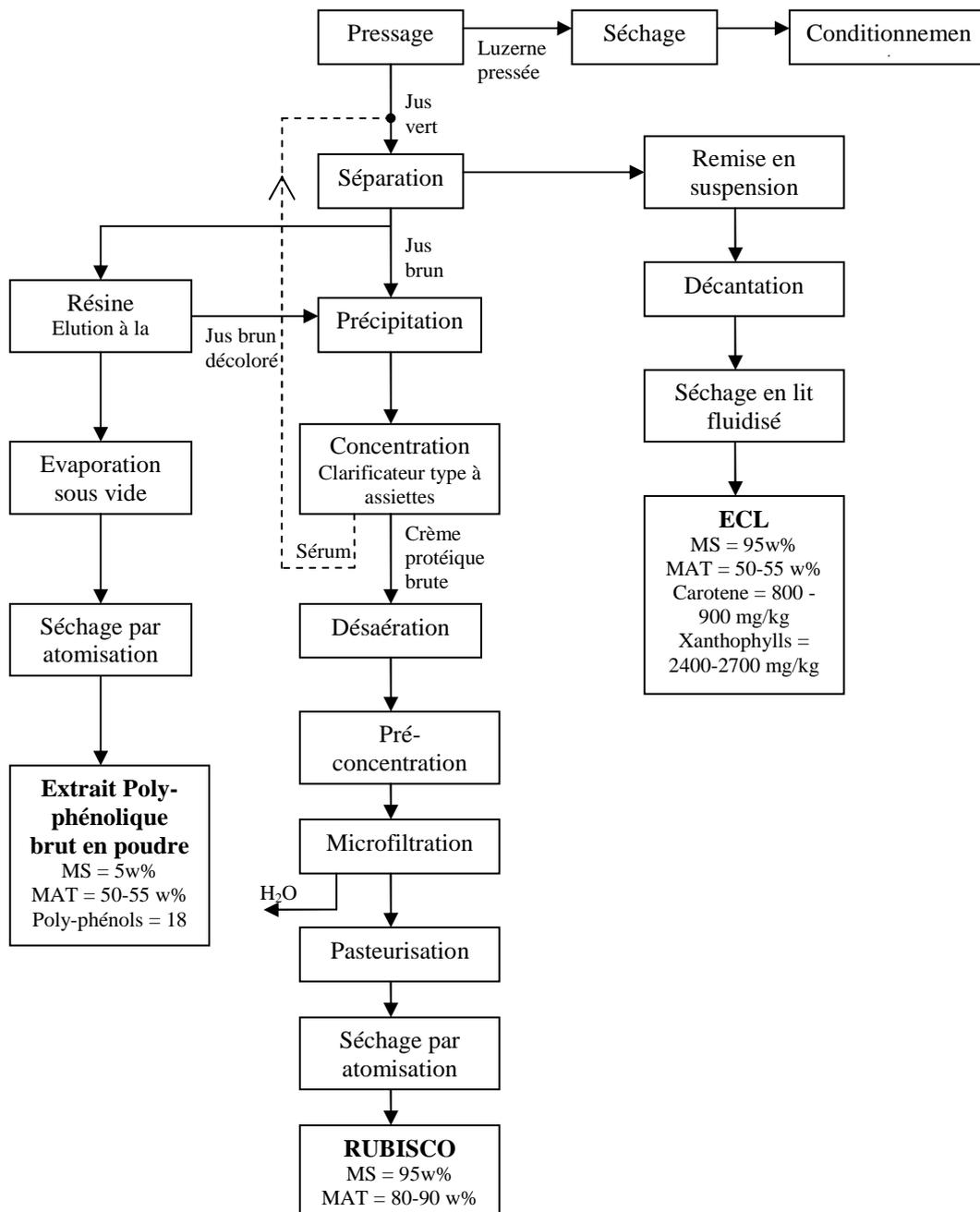


Figure I-6. Schéma du procédé industriel de production de Rubisco à partir des jus de luzerne, élaboré à partir du brevet de Levesque et Rambourg (2002).

III. Procédés conventionnels de séparation des protéines

Les procédés à mettre en œuvre pour la séparation, la purification et la concentration des protéines d'intérêt à partir de milieux biologiques doivent répondre à plusieurs contraintes. En effet, ces procédés doivent éviter la dénaturation des protéines cibles (surtout dans le cas des protéines dotées d'activité biologique) tout en réduisant les coûts de production. Ceci reste toujours un vrai défi à relever pour la bioindustrie.

Les principes des procédés de séparation des protéines reposent majoritairement sur les propriétés des protéines à séparer :

- La séparation des protéines par précipitation est basée la modification de paramètres tels que le pH ou la force ionique qui entraîne une modification de la solubilité de la protéine et permet de la faire précipiter.
- La séparation par procédés chromatographiques (d'affinité, d'échange d'ions, par interactions hydrophobes...), est basée sur l'interaction entre une phase stationnaire (propre à la technique chromatographique utilisée) et les chaînes latérales des acides aminés à la surface de la protéine.
- Les procédés de filtration (chromatographique ou membranaire) mettent, essentiellement, en jeu la taille des protéines.

Les difficultés qui se posent à l'application de ces techniques pour la séparation des protéines proviennent essentiellement du milieu à partir duquel celles-ci doivent être isolées. En effet, les sources de protéines sont typiquement des milieux de fermentation, des extraits ce tissus végétaux ou des cellules animales. Ces milieux biologiques sont complexes. Ils renferment le plus souvent des particules solides qui doivent être éliminées dans la première étape de fractionnement du milieu brute. D'autre part, le liquide lui-même contient une multitude de composés solubles, présents à différentes concentrations, caractérisés par des propriétés variées (taille, charge, hydrophobicité...). En effet, la protéine d'intérêt ne représente généralement qu'une fraction minoritaire parmi les autres molécules présentes comme les carbohydrates, les lipides, les acides organiques, les polyphénols, les minéraux...

Ainsi, la plupart des procédés de séparation des protéines nécessitent plusieurs étapes pour que la molécule atteigne le degré de pureté souhaité en plus d'étapes intermédiaires de conditionnement généralement indispensables pour le passage d'une technique de purification à une autre [Anspach et al., 1999]. La figure I-7 représente les grandes étapes présentes dans la plupart des procédés nécessaires à la purification de protéines à partir d'un milieu complexe.

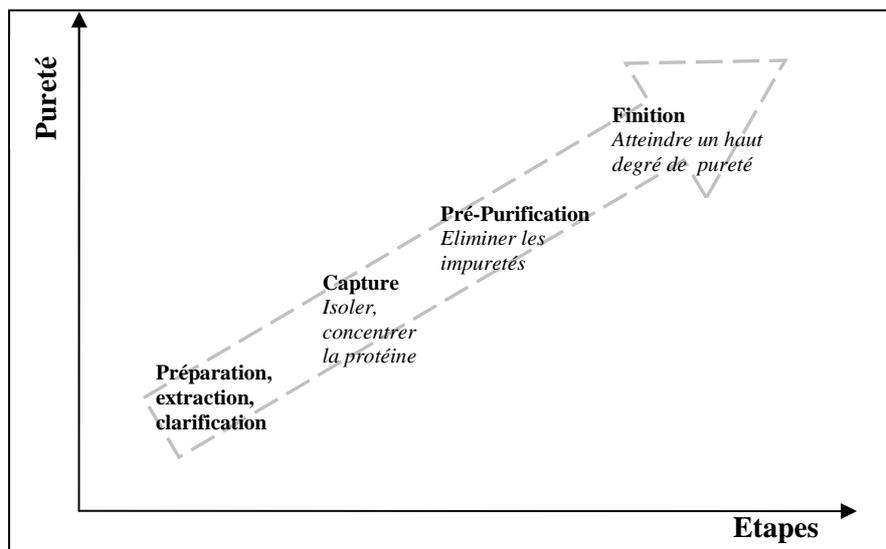


Figure I-7. Schéma général des étapes de purification d'une protéine à partir d'un milieu biologique brut [Amersham Biosciences].

La première étape est la récupération de la protéine à partir du milieu dans lequel elle se trouve (milieu de culture, cellule végétale ou microbienne). Une clarification, par centrifugation ou filtration, est souvent réalisée pour éliminer les particules en suspension. A ce stade, la concentration de protéine d'intérêt est faible, il est donc nécessaire de l'isoler et de la concentrer par une réduction de volume. Une étape de pré-purification peut ensuite être réalisée pour éliminer les impuretés pouvant être de nature protéique ou non. Enfin, une étape de finition est réalisée dans le but d'éliminer toute trace d'autres contaminants (formes moléculaires dégradées ou agrégées). Le nombre d'étapes réalisées dépend de la pureté requise pour l'application envisagée de la protéine mais également de la complexité initiale du milieu à traiter.

Ces procédés aux nombreuses étapes ont un coût élevé (jusqu'à 80% du coût total de production des biomolécules). Globalement, le coût de ces procédés de séparation est inversement proportionnel à la concentration de la protéine dans la solution [Lightfoot et Moscoriello, 2004]. De plus, la multiplication des étapes ne fait qu'augmenter les impacts environnementaux du procédé dans sa globalité.

III.1. Techniques de séparation chromatographiques

Actuellement, les procédés chromatographiques sont des procédés qui peuvent être utilisés dans les étapes de capture, de purification primaire et de finition d'une protéine à partir de son

milieu initial. La chromatographie met en œuvre l'interaction entre les solutés de la phase mobile et la phase stationnaire solide. Dans le cas des protéines, la phase mobile est une solution. La séparation des composés d'un mélange est due à la distribution différente de ces composés entre la phase mobile et la phase stationnaire. Cette séparation peut être réalisée en discontinu dans un réacteur fermé agité où la solution et le support solide sont en contact, ou en dynamique sur un lit fixe disposé dans une colonne à travers laquelle percole la solution de protéines à séparer. Dans ce dernier cas on parle de technique chromatographique du fait de la distribution spatiale des espèces. Le support solide de la phase stationnaire est souvent formé d'une matrice plus ou moins inerte sur laquelle sont greffés des ligands dont la nature détermine le type d'interaction avec la protéine. La variété des chaînes d'acides aminés présents dans la protéine permet plusieurs types d'interactions [Chase, 1988].

Selon les interactions mises en œuvre entre la protéine d'intérêt et les ligands du support solide, on peut distinguer plusieurs types de chromatographie notamment la chromatographie d'échange d'ions. Cette technique chromatographique est la plus utilisée pour la purification des protéines, des polypeptides, des acides nucléiques et de tout autre biomolécule chargée en raison de sa large applicabilité, de son pouvoir de résolution élevé, et de grands volumes qu'elle permet de traiter [Bonnerjera et al., 1986, Xin et al., 2002, Wee, 2008].

III.2. La chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions est une technique qui peut aussi bien être utilisée pour la purification primaire (capture et pré-purification) d'une protéine que pour la finition de la purification. Elle permet de séparer des espèces ayant de très légères différences dans leurs propriétés, comme par exemple, deux protéines qui ne diffèrent que par un seul acide aminé chargé. Elle représente une technique de séparation très efficace.

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire comporte des groupements ionisés fixes (chargés positivement ou négativement). Des ions mobiles de charge opposée assurent l'électroneutralité, ce sont les contre ions. Ces contre ions sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile comme le montre la figure I-8. La séparation est basée sur cette propriété d'échange d'ions et ne peut donc s'appliquer qu'à des solutés ioniques ou ionisables ce qui est le cas des protéines. Ainsi, au contact de ces échangeurs, les ions présents dans l'échantillon, de la même charge que les contre ions, vont déplacer ces derniers et se lier de façon réversible à la phase stationnaire.

La récupération des ions fixés par la phase stationnaire se fait par un éluant. Les éluants sont des solutions aqueuses qui contiennent des ions échangeables avec les solutés fixés sur l'échangeur. Ils peuvent être des :

- Solutions contenant un ion de densité de charge plus élevée et/ou de concentration plus élevée.
- Solutions d'un pH tel qu'il modifie la charge des ions fixés et/ou des groupements ionisés de la phase stationnaire et provoque leur libération dans l'éluat.

L'éluant peut être réalisé avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec un gradient de pH ou de force ionique, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur.

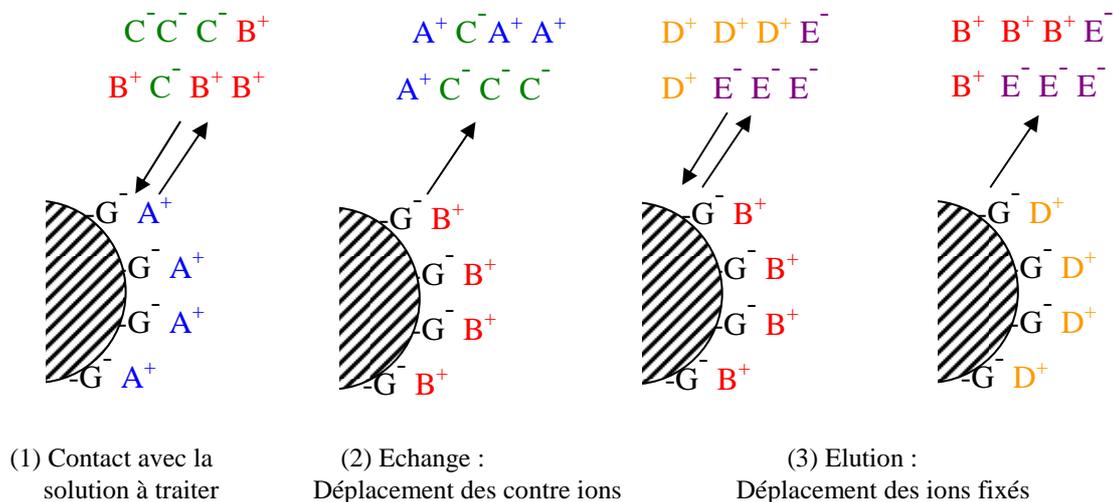


Figure I-8. Phénomènes mis en jeu lors de la chromatographie d'échange d'ions : G^- groupements ionisés, A^+ : contre ions, B^+ et C^- ions présents dans la solution à traiter et D^+ et E^- ions présents dans l'éluant.

Plus les composés à séparer ont des degrés d'interaction différents avec la phase stationnaire et plus ils vont être séparés. Ceci est lié à la charge des composés, la densité et la distribution en surface de cette charge.

Dans un procédé de chromatographie d'échange d'ions, on peut choisir de ne capturer que les biomolécules d'intérêt pour laisser passer les autres contaminants à travers la colonne ou de fixer plutôt les contaminants et récupérer en sortie de colonne une solution purifiée. En

bioséparation, la première méthode est souvent utilisée car elle permet un meilleur fractionnement et surtout une concentration des composés d'intérêt.

III.2.1. Les matériaux échangeurs d'ions

Un échangeur d'ions est constitué d'une matrice insoluble sur laquelle des groupements fonctionnels chargés ont été fixés par liaison covalente (figure I-8). Il est possible d'avoir des échangeurs chargés positivement ou négativement. Ceux qui sont chargés négativement portent un contre ion de charge positive, on parle d'échangeurs de cations, inversement ceux qui sont chargés positivement et sont associés à des contre ions négatifs sont dits échangeurs anioniques.

Un échangeur d'ions est caractérisé par sa :

- **Porosité** : le support est un polymère plus ou moins réticulé ; la porosité dépend du taux de pontage : un polymère très réticulé convient pour des petites molécules.
- **Distribution granulométrique** : le support est souvent commercialisé sous forme de grains de diamètre variable. Les échanges sont d'autant plus rapides et efficaces que les grains sont petits. Des échangeurs sous la forme de membrane sont également disponibles [Kedem et Bromberg, 1993, Xu, 2005].
- **Capacité de rétention** : quantité maximale d'ions que peut fixer l'échangeur d'ions. Elle dépend de la densité du support en groupements fonctionnels.

III.2.2. Nature de la matrice

Classiquement, la matrice peut être constituée de composés inorganiques, de résines synthétiques ou de polysaccharides. La résistance mécanique et chimique de l'échangeur dépend des caractéristiques de la matrice. La nature de la matrice peut aussi avoir un impact sur la capacité et l'efficacité de séparation de l'échangeur.

Les résines minérales les plus courantes sont à base de silice. L'avantage des billes de silice réside dans leurs propriétés physiques puisqu'elles offrent une grande résistance mécanique et ne gonflent pas, elles peuvent donc être utilisées pour des techniques hautes pressions. [Vanacek et al., 1980, Rounds et al., 1986].

- Les résines synthétiques

Elles sont généralement fabriquées par polymérisation de styrène ou de dérivés acryliques avec un pourcentage plus ou moins élevé de divinylbenzène comme agent de réticulation. Ce type de résine est peu utilisé avec les molécules organiques qui ont un poids moléculaire de plus de 500 Da (cas de la plupart des protéines) car la taille de leurs pores est faible [Chase, 1988].

- Les matrices à base de cellulose, dextran ou agarose

Peterson and Sober (1956) ont été les premiers à mettre au point des échangeurs cellulosiques (DEAE-cellulosique). Depuis, de nombreux groupements fonctionnels ont été greffés sur des matrices de polysaccharides synthétisés (dextran, agarose...). Les groupements ioniques se trouvent en surface du squelette dans le cas de la cellulose, et à l'intérieur dans le cas du dextran et des gels de polyacrylamide. Ces matrices ont l'avantage de présenter des pores de diamètre suffisamment important pour que les biomolécules y pénètrent mais elles ont un inconvénient majeur qui est celui de présenter de grands changements de volume lorsque le pH et la force ionique fluctuent [Janson et Hedman, 1982, Yamamoto et al., 1988].

III.2.3. Nature des groupes fonctionnels

La séparation des protéines par chromatographie d'échange d'ions peut être réalisée avec un échangeur anionique ou cationique, en fonction du point isoélectrique de la protéine à séparer et des conditions de pH où elle est placée. Qu'ils soient échangeurs d'anions ou de cations, les groupements fonctionnels sont classés en deux catégories : les supports forts et les supports faibles. Les échangeurs forts ont un nombre de sites constant puisque leurs groupements sont toujours ionisés, alors que les échangeurs faibles ont un nombre de site de fixation qui varie en fonction de l'environnement ionique en solution, en particulier du pH. Ainsi la capacité d'un échangeur type acide faible augmente avec le pH tandis que celle d'un échangeur type base faible diminue avec le pH.

- Les échangeurs d'anions

Ils sont tous dérivés de groupements basiques. On distingue des échangeurs d'anions faibles qui sont dérivés d'une base faible, généralement des amines secondaires ou tertiaires dont la protonation donne un ammonium capable de fixer un anion, et des échangeurs d'anions forts

dérivés d'une base forte souvent des amines quaternaires associés à un contre ion comme par exemple Cl^- .

- Les échangeurs de cations

Dérivés de groupements acides dont l'ionisation génère des anions. Les contre ions positifs portés par ces anions sont échangeables. Comme pour les échangeurs anioniques, on distingue des échangeurs de cations faibles qui dérivent d'acides faibles très souvent le carboxyméthyle et des échangeurs de cations forts avec des groupements sulfonates (en général sulfopropyle).

IV. Purification primaire des milieux bruts

La purification primaire d'une protéine d'intérêt à partir d'un milieu brute consiste concrètement à concentrer et pré-purifier la protéine. En fonction de la complexité du milieu biologique initial, des étapes préliminaires à la séparation chromatographique peuvent être envisagées. Les caractéristiques du milieu brut à partir duquel la protéine doit être isolée, vont conditionner le procédé de séparation à mettre en œuvre. Dans le cas d'un procédé de chromatographie par échange d'ions, par exemple, la conductivité élevée des milieux biologiques, qui indique une teneur en sels importante, réduit souvent la capacité de rétention de la protéine cible par l'échangeur [Thömmes et al., 2001, Sandgathe et al., 2003]. De plus, dans un milieu brut, la détermination des propriétés de la protéine cible, comme sa charge globale, sa solubilité ou son pI devient plus délicat en raison des interactions qu'il peut y avoir entre les différents composés. La protéine d'intérêt se trouve alors en compétition avec les autres composés (peptides ou d'autres protéines) pour la fixation sur le support solide.

D'autre part, la présence de particules solides provoque le colmatage des colonnes chromatographiques ou des membranes de filtration. La clarification du fluide à traiter est généralement indispensable. Souvent, la centrifugation seule ne permet pas l'élimination de tous les débris, elle est donc combinée à une microfiltration. Ce processus génère une perte inévitable de la protéine d'intérêt, un temps de traitement assez long qui se traduit par un coût de production élevé et éventuellement une dégradation de la qualité de la protéine en question [Keller et al., 2001, Wohlgemuth, 2009].

D'autres limitations d'ordre cinétique peuvent diminuer l'efficacité d'un procédé chromatographique de séparation de biomolécules. En effet, le transfert de matière dans ce

type de procédé est influencé par l'hydrodynamique de la colonne mais aussi par la taille de la protéine d'intérêt, la structure du support et la compétition avec les autres biomolécules présentes dans le milieu.

Au final, un procédé **efficace, économique et sélectif** qui permet un rendement et un degré de pureté suffisants est nécessaire pour la production à grande échelle de protéines. Or d'un point de vue industriel le nombre d'opérations unitaires accroît considérablement le coût du procédé (durée totale du procédé et investissements). La réduction du nombre d'étapes est ainsi un enjeu principal de la bioséparation [Schügerl et Jürgen, 2005].

IV.1. Chromatographie en réacteur agité

La séparation de la biomolécule d'intérêt par chromatographie sur un support solide approprié dans un réacteur fermé parfaitement mélangé représente une alternative aux étapes de clarification et purification primaire sur colonne. Cette méthode permet d'augmenter l'espace entre les particules permettant ainsi de traiter, en deux étapes, un volume important d'un extrait brute contenant des solides et molécules plus ou moins solubles. La première consiste à mettre en contact le support solide et le fluide pendant un temps suffisant pour fixer la protéine d'intérêt. Dans un deuxième temps, le support est séparé du milieu pour être élué.

Le facteur IX de coagulation du plasma a été produit et commercialisé par cette méthode, avec pour support le DEAE Sephadex [Curling et Brummelhuis, 1980]. L'inconvénient de ce mode de contact est le fait qu'un réacteur agité se comporte comme un système à un seul plateau théorique. Il faut donc plus de particules ou une recirculation dans un autre réacteur pour atteindre le même taux d'adsorption que sur un lit fixe de résine. Un système multi-étage tel que la chromatographie dynamique sur une colonne offre une meilleure efficacité.

IV.2. Chromatographie en lit fluidisé

La rétention de la biomolécule d'intérêt par chromatographie en lit fluidisé permet également de s'affranchir des opérations d'élimination des matières en suspension du fluide à traiter. Dans cette configuration, un flux ascendant de la solution biologique met en suspension le support solide ce qui permet aux solides et aux impuretés de traverser le lit tandis que les protéines cibles vont se fixer.

La chromatographie en lit fluidisé a eu quelques applications industrielles en biotechnologie pour la purification d'antibiotiques à partir de milieux de culture : en batch pour la production

de la streptomycine [Bartels et al, 1958], en système semi-continu pour la production de la novobiocine [Belter et al, 1973] et la production de l'immunomycine à partir de culture de *Streptomyces* [Gailliot et al 1990].

Bien que les performances de séparation d'un lit fluidisé soient plus intéressantes que celles d'un réacteur agité, elles restent tout de même moins importantes que celles obtenues en lit fixe. En effet le mélange généré dans le lit fluidisé l'éloigne de l'écoulement piston caractéristique des colonnes en lit fixe. Le lit fluidisé se trouve ainsi plus proche de la chromatographie dans un réacteur mélangé puisque le système se comporte comme un système à faible nombre de plateaux théoriques (voire à plateau unique). Ceci diminue le rendement de fixation (une recirculation du milieu devient souvent nécessaire) et rend l'étape de lavage inefficace.

Plusieurs travaux ont tenté de résoudre le problème des lits fluidisés en essayant de réduire le mélange. La première approche consiste à placer des plaques perforées à différents niveaux de la colonne de façon à former plusieurs étages de lits fluidisés assimilés à une série de réacteurs parfaitement agités [Buijs et Wesselingh, 1980]. Une autre approche consiste à utiliser des particules magnétiques et à stabiliser le lit en appliquant un champ magnétique [Burns et Graves, 1985, Nixon et al, 1991]. Toutefois cette technique reste onéreuse pour des applications à grande échelle.

IV.3. Chromatographie en lit expansé

La chromatographie en lit expansé (CLE) permet aussi de traiter les milieux bruts évitant les étapes de clarification et de purification primaire. Elle présente ainsi l'intérêt de réduire le nombre d'étapes qui sont nécessaires dans les procédés classiques de bioséparation. En effet, elle combine, en une seule opération, une séparation solide-liquide, une réduction de volume grâce à la fixation de la protéine sur le support chromatographique et une purification partielle. Un gain considérable sur la durée du procédé et sur les coûts d'investissement est alors possible.

La mise en œuvre de la CLE se fait par l'alimentation, dans le sens ascendant, d'un lit de particules avec un liquide brut (milieu de culture, extrait brut). Le lit de particules commence alors à s'expanser à partir d'un flux critique. L'expansion du support solide éloigne les particules les unes des autres, augmentant ainsi le volume poreux dans le lit, ce qui permet le

libre passage des cellules, débris et autres matières en suspension en même temps que la rétention des biomolécules d'intérêt sur le support [Chase, 1994, Yun et al., 2004a, Xia et al. 2007a].

La différence entre la CLE expansé et l'adsorption en lit fluidisé c'est que les particules dans le lit expansé sont stratifiées. En effet, la distribution de taille des particules soigneusement choisie conduit à une classification du lit fluidisé. Ainsi les particules de grand diamètre se trouvent en bas de la colonne alors que les plus petites seront localisées dans la partie supérieure de la colonne.

Cette stratification permet de réduire considérablement le mélange dans la colonne, dont les caractéristiques sont alors similaires à celles d'un lit fixe [Drager and Chase, 1990]. Les premières applications de cette technique ont commencé dans les années 90 [Draeger et Chase, 1991, Chase et Draeger, 1992a ; Chase et Draeger 1992b, Ramos et al., 2010, Yap et al., 2010].

Il est important de noter que le degré de classification du support solide dans la colonne dépend du ratio des tailles des particules. Une distribution de particules appropriée nécessite un rapport de taille des particules de l'ordre de 2,2 [Al-Dibouni et Garside 1979, Karau et al 1997]. Si une distribution de densité est également réalisée, le lit est davantage stabilisé. La figure I-9 représente le degré du mélange en fonction des performances de séparation pour les différents modes de contact liquide/support solide.

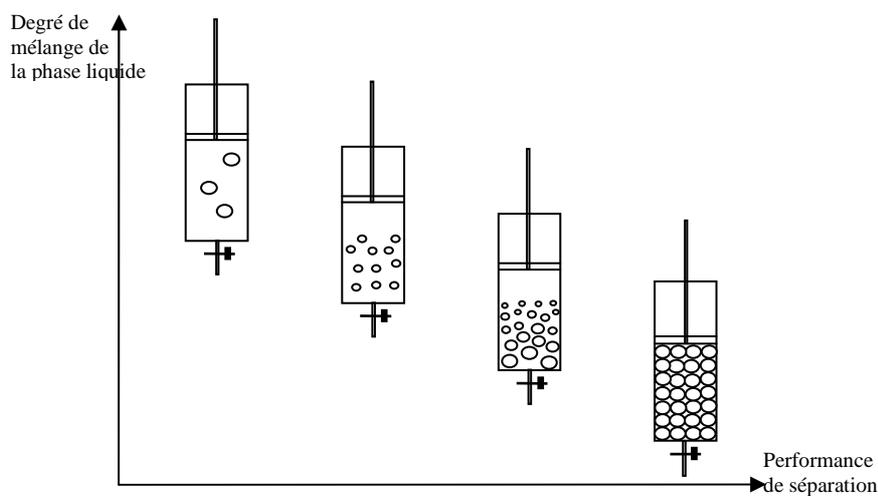


Figure I-9. Les différents modes d'adsorption de protéines (de droite à gauche) : chromatographie en lit fixe, en lit expansé, en lit fluidisé et en colonne agitée.

IV.3.1. Mise en œuvre des procédés chromatographiques en lit expansé

La mise en œuvre de la chromatographie en lit expansé comporte les mêmes étapes que celle en lit fixe. La figure I-10 représente le déroulement du procédé de CLE. Le support est tout d'abord équilibré par l'application d'un flux ascendant d'une solution d'équilibration appropriée. Un lit fluidisé stable se forme quand toutes les particules sont maintenues en suspension grâce à un équilibre entre leur vitesse de sédimentation et la vitesse d'écoulement du liquide. Pendant cette étape, il est recommandé d'atteindre un taux d'expansion compris entre 2 et 3 qui est le ratio de la hauteur finale du lit fluidisé stable et la hauteur du lit initial sédimenté.

Pendant la charge, le milieu biologique renfermant la molécule d'intérêt et différentes impuretés comme des débris et des cellules est ensuite mis en contact du support solide avec un flux ascendant. Ainsi, étant donné que la densité du support solide est supérieure à celle des contaminants et des débris, ces derniers vont quitter la colonne alors que les molécules d'intérêt vont interagir avec le support et s'y fixer.

Un lavage est ensuite effectué pour éliminer le reste des contaminants et les molécules faiblement liées au support. Le lavage se fait également en flux ascendant pour maintenir l'expansion du lit et faciliter le passage des particules en suspension. En général, un volume de plus de vingt fois le volume du lit est utilisé pour le lavage.

L'élution des protéines fixées peut se faire en lit expansé ou en lit sédimenté avec un tampon approprié (pH, force ionique). Les avantages de l'élution en lit sédimenté sont la possibilité d'appliquer facilement des gradients et la récupération d'un volume d'éluat plus réduit et par conséquent plus concentré.

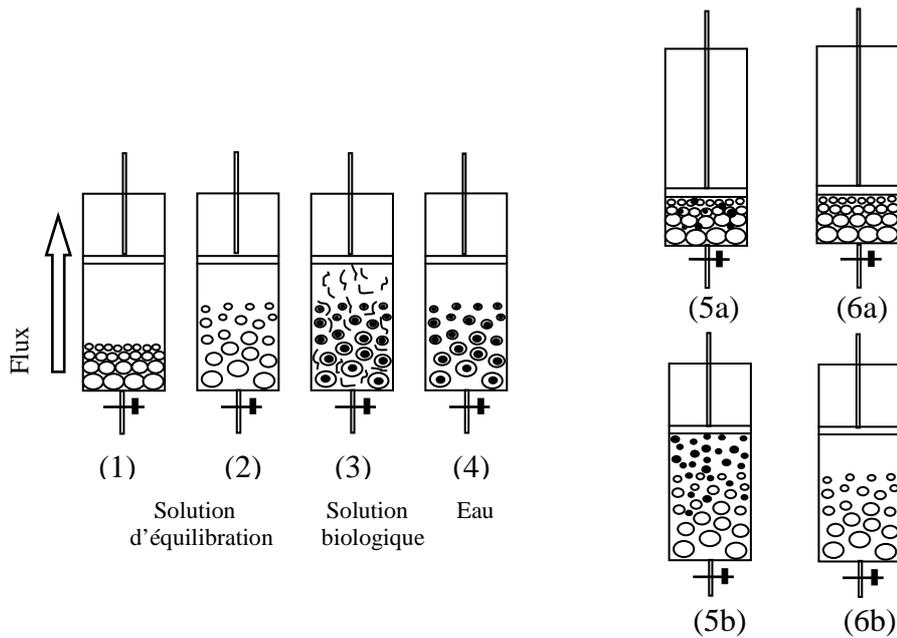


Figure I-10. Représentation des étapes d'un procédé d'adsorption en lit expansé : (1) Lit sédimenté, (2) Equilibration, (3) Charge, (4) Lavage, (5a) Elution en lit fixe, (b) Elution en lit expansé, (6a) Nettoyage et régénération en lit fixe, (6b) en lit expansé.

IV.3.2. Aspects hydrodynamiques

Si le problème du lit fluidisé était le degré de mélange introduit (par rapport au lit fixe), le développement des procédés en lit expansé n'est possible que si cet aspect est amélioré. De nombreux travaux se sont alors rapidement orientés vers la constitution de lits à porosité élevée et aux propriétés hydrodynamiques similaires à celles du lit fixe [Chetty et Burns, 1991, Nixon et al, 1991]

IV.3.2.1 Fluidisation du support solide

On définit la vitesse superficielle comme étant le rapport du débit d'alimentation de la colonne par la section de celle-ci. A faibles vitesses superficielles, le lit de particules sédimentés se comporte comme un lit fixe : le liquide circule dans le volume interstitiel du lit sédimenté. En augmentant la vitesse superficielle, des vibrations des particules sont d'abord provoquées, puis à partir d'un certain débit la couche de particules sédimentées va commencer à s'expanser. On atteint ainsi la transition entre l'état fixe et l'état fluidisé du lit caractérisée par la vitesse minimale de fluidisation U_{min} .

Dans l'état de fluidisation les particules sont soumises à leur poids, à la poussée d'Archimède et aux forces de frottement avec le liquide. Quand on atteint la vitesse minimale de fluidisation U_{\min} , ces forces s'équilibrent. L'expression du module F de la résultante du poids et de la poussée d'Archimède est donnée par l'équation I-4. Les forces de frottement subies par les particules correspondent au produit de la perte de charge du liquide à la traversée de la colonne et de la section du lit. L'expression de la perte de charge Δp résultante du poids et de la poussée d'Archimède est donnée par l'équation I-5.

$$F = S \cdot H \cdot g \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_p - S \cdot H \cdot g \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \rho_l \quad \text{Equation I-4}$$

$$\Delta p = H \cdot g \cdot (1 - \varepsilon) \cdot (\rho_p - \rho_l) \quad \text{Equation I-5}$$

Où H est la hauteur du lit, ρ_l la masse volumique du liquide, ρ_p la masse volumique de la particule, ε la porosité du lit et S sa section.

En augmentant encore la vitesse superficielle du liquide, le lit poursuit son expansion tout en gardant une perte de charge constante. On peut alors décrire l'état fluidisé. Les particules sont indépendantes les unes des autres. Elles sont soumises à des mouvements désordonnés de faible amplitude. La surface supérieure du lit est pratiquement nette et horizontale et le lit est assimilable à un liquide. Par conséquent U_{\min} peut être déterminée à partir de l'évolution de la perte de charge en fonction de la vitesse superficielle U , comme le montre la figure I-11.

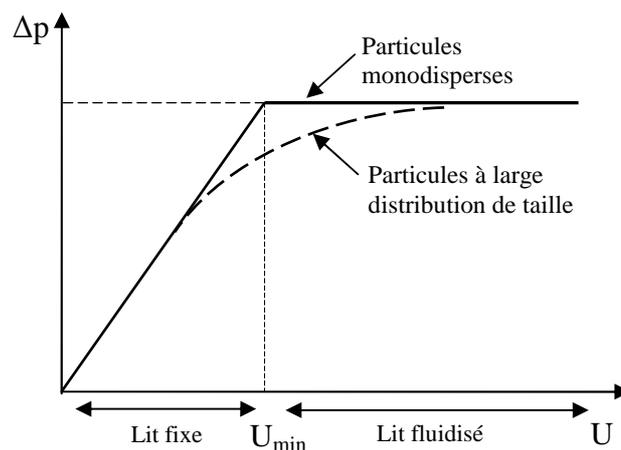


Figure I-11. Détermination de la vitesse minimale de fluidisation (U_{\min}) à partir de la relation entre la perte de charge dans un lit de particules et la vitesse superficielle du liquide (U) [Anspash 1999].

D'autre part, la perte de charge dans les cas habituels de fluidisation avec de fines particules sphériques, et pour un régime laminaire, peut être exprimée selon la loi d'Ergun par l'équation I-6.

$$\Delta p = 150 \cdot \frac{(1 - \varepsilon)^2 \cdot \eta_l \cdot U_{\min} \cdot H}{d_p^2 \cdot \varepsilon^3} \quad \text{Equation I-6}$$

Avec η_l la viscosité dynamique du liquide et d_p le diamètre des particules.

La vitesse minimale (équation I-7) de fluidisation est ainsi déterminée à partir des équations I-5 et I-6.

$$U_{\min} = \frac{g \times (\rho_p - \rho_l) \times d_p^2}{150 \times \eta_l} \times \frac{\varepsilon^3}{(1 - \varepsilon)} \quad \text{Equation I-7}$$

Quand la vitesse superficielle du liquide dans la colonne augmente et au delà d'une certaine limite, les forces d'Archimède et les forces de frottement excèdent le poids. L'équilibre est rompu. La particule est entraînée hors de la colonne. Cette vitesse limite est appelée vitesse terminale de fluidisation (U_{ter}). Elle est décrite par la loi de Stokes (Equation I-8) pour un nombre de Reynolds terminal (Re_{ter}) inférieur à 0,2.

$$U_{\text{ter}} = \frac{g \times (\rho_p - \rho_l) \times d_p^2}{18 \times \eta_l} \quad \text{pour } Re_{\text{ter}} < 0,2 \quad \left(Re_{\text{ter}} = \frac{U_{\text{ter}} \times d_p \times \rho_l}{\eta_l} \right) \quad \text{Equation I-8}$$

L'équation I-8 met en évidence les paramètres qui jouent un rôle important dans la fluidisation. Pour contrôler la vitesse terminale de fluidisation dans le lit, il faut principalement agir sur le diamètre et la masse volumique du support solide.

Ainsi pour traiter des fluides chargés de matières en suspension, la vitesse superficielle d'écoulement à appliquer pendant l'étape de charge doit être, d'une part, supérieure à U_{\min} pour créer un volume poreux important et permettre ainsi le passage des impuretés, et d'autre part, inférieure à U_{ter} afin d'éviter que le support solide ne soit élué de la colonne.

Il existe dans la littérature un grand nombre de théories et de corrélations qui décrivent la fluidisation des particules. Ces corrélations ont été recensées par Di Felice (1995). La corrélation, très ancienne (1952), de Lewis Bowermann, plus connue sous le nom de la corrélation de Richardson Zaki, est souvent utilisée pour déterminer la plage de vitesses

superficielles d'écoulement applicables. Cette corrélation est empirique, elle découle de l'étude du comportement des particules à différents débits. Elle permet de déterminer le taux de vide du lit obtenu pour une vitesse superficielle donnée U et les paramètres qui sont la vitesse terminale de fluidisation et l'indice n de l'expansion comme le montre l'équation I-9 [Richardson Zaki, 1954].

$$U = U_{\text{ter}} \times \varepsilon^n \quad \text{Equation I-9}$$

Cette relation n'est valable que pour des particules monodisperses, de même masse volumique, non poreuses et sphériques. Une vaste étude expérimentale menée par Richardson et Zaki a permis la détermination de n en fonction du régime d'écoulement. Ils ont démontré que lorsque le diamètre des particules d_p est largement inférieur au diamètre de la colonne d_c ($d_p/d_c < 0,01$) les effets de bord sont négligeables et l'indice d'expansion est uniquement fonction de Re_{ter} . Ainsi n peut être déterminé par l'équation I-10, I-11 ou I-12.

$$n = 4,65 + 19,5 \cdot d_p / d_c \quad Re_{\text{ter}} < 0,2 \quad \text{Equation I-10}$$

$$n = (4,35 + 17,5 \cdot d_p / d_c) \cdot Re_{\text{ter}}^{-0,03} \quad 0,2 < Re_{\text{ter}} < 1 \quad \text{Equation I-11}$$

$$n = (4,45 + 18 \cdot d_p / d_c) \cdot Re_{\text{ter}}^{-0,1} \quad 1 < Re_{\text{ter}} < 500 \quad \text{Equation I-12}$$

Une fois le taux de vide déterminé, il permet par un bilan de matière au solide de calculer la hauteur finale de la colonne (équation I-13).

$$\varepsilon = 1 - \frac{H_0}{H} \times (1 - \varepsilon_0) \quad \text{Equation I-13}$$

Bien que cette corrélation soit la plus appliquée au lit expansé [Thommes, 1997], plusieurs écarts entre les valeurs de l'index d'expansion n calculées par cette corrélation et celles déterminées expérimentalement sont relevés [DeLuca et al., 1994 ; Finette et al., 1996 ; Griffith et al., 1997 ; Karau et al., 1997 ; Theodossiou et al., 2002]. Ces écarts sont essentiellement dus soit à la distribution de taille et de densité des particules, soit à l'agglomération des particules, soit à la forme non sphérique des particules ou encore au mode de distribution du fluide [Theodossiou et al., 2002].

IV.3.2.2 Classification

Au cours de la fluidisation, les grosses particules qui ont des vitesses terminales de fluidisation les plus importantes, se placent en bas de la colonne. Les plus petites sont

poussées en haut de la colonne en fonction de leur U_{ter} . Plus le diamètre de la particule et sa densité sont faibles et plus la position de la particule sera haute. Cette classification permet de s'approcher de l'écoulement piston en réduisant la dispersion axiale et radiale.

La classification des particules pendant la fluidisation a été démontrée expérimentalement par plusieurs travaux. En 2002, Tong et Sun ont démontré que pendant l'expansion dans une colonne de diamètre de 2,6 cm, les billes du support Streamline (ayant du quartz dans leur matrice et une distribution de taille entre 80-500 μm) se trouvent localisées à différentes hauteurs selon leur taille. L'expérience consiste à effectuer des prélèvements des particules à différentes hauteurs du lit, pendant l'expansion. Ainsi les particules de grosse taille sont localisées en bas de la colonne alors que les petites sont localisées en haut. Une relation linéaire entre la taille de la particule et sa hauteur dans la colonne est établie [Tong and Sun, 2002].

D'autre part, plusieurs travaux [Bruce and Chase, 2001; Tong and Sun, 2002 and Yun et al., 2004a] mettent en évidence une variation de la porosité le long du lit fluidisé. Celui-ci est plus important en haut du lit où les particules sont les plus petites. Le taux de vide est, en revanche, plus faible en bas du lit ce qui est cohérent avec la distribution de taille des particules.

IV.3.2.3 Dispersion en phase liquide

La dispersion dans la phase liquide en chromatographie lit fixe a été largement étudiée. Il a été ainsi prouvé que la distribution des temps de séjour dans une colonne chromatographique en lit fixe peut considérablement affecter l'efficacité de la séparation. Un grand nombre de données sont disponibles sur la dispersion dans les lits fixes et plusieurs corrélations ont été proposées [Slater et al., 1992].

En chromatographie en lit expansé la dispersion est considérée comme plus importante en raison de la mobilité des particules. De nombreuses études ont ainsi cherché à caractériser et quantifier la dispersion axiale en lit expansé. La plupart de ces travaux utilisent des modèles simplifiés qui ne prennent pas en compte toute la complexité de l'hydrodynamique du système mais en se basant uniquement sur le mélange [Thommes 1997]. Comme en chromatographie en lit fixe, la dispersion dans la phase liquide est généralement quantifiée par des nombres adimensionnels ou un coefficient de dispersion axiale dans la phase liquide déterminés grâce à une étude de distribution de temps de séjour. La mesure de la distribution

du temps de séjour est basée sur le calcul des moments de premier et second ordre : le temps de séjour t_s et la variance σ^2 à partir d'expérimentations réalisées par injection d'une impulsion ou d'un échelon d'un traceur [Villermaux, 1993].

La dispersion axiale de la phase liquide dans le lit expansé est souvent caractérisée par le modèle de dispersion ou par le modèle des réacteurs en série [Thommes et al. 1995b]. Dans le premier cas, l'étude de la distribution du temps de séjour permet de déterminer le coefficient de dispersion axiale D_{axL} (équation I-14), ainsi que les nombres adimensionnels de Peclet particulaire Pe_p (équation I-15) ou de Bodenstein (équation I-16).

$$D_{ax} = \frac{\sigma^2}{t_s^2} \cdot \frac{u \cdot H}{2} \quad \text{Equation I-14}$$

$$Pe_p = \frac{u \cdot d_p}{D_{ax}} \quad \text{Equation I-15}$$

$$Bo = \frac{u \cdot H}{D_{ax}} \quad \text{Equation I-16}$$

Avec H la hauteur du lit et u la vitesse interstitielle de la phase liquide (rapport de la vitesse superficielle par la porosité du lit).

Le modèle des mélangeurs en série permet lui de calculer un paramètre N : nombre de mélangeurs (équation I-17) qui est indépendant des conditions opératoires comme la vitesse superficielle. Cependant, les deux modèles conduisent au même résultat lorsque la dispersion dans le système est faible.

$$N = \frac{t_s^2}{\sigma^2} \quad \text{Equation I-17}$$

Ces modèles ont été largement utilisés pour caractériser le mélange en lit expansé [Chang et Chase 1996a ; Bruce et Chase 1999, Yamato et al., 1999] mais ils restent limités au niveau de l'extrapolation du fait que les différents paramètres (temps de séjour ou hauteur du lit) varient avec le degré d'expansion. En effet certains auteurs remettent en cause l'utilisation des équations établies en lit fixe pour la détermination des différents nombres adimensionnels, qui ne répondent pas aux critères expérimentaux du lit expansé [Theodossiou et al. 2002, Palsson et al., 2001]. Certains travaux ont démontré que la dispersion axiale est plus importante en bas de la colonne à cause de la présence de chemins préférentiels. Ces turbulences sont estompées

par la hauteur du lit. Ainsi à partir d'une hauteur de lit de 10 cm ces effets seraient négligeables [De Luca et al., 1994, Hjorth et al., 1995, Bruce et Chase, 2001]. Vergnault (2004) a mis en évidence l'importance du distributeur du liquide de la colonne dans la création des chemins préférentiels. Toutefois, plusieurs travaux ont mis en évidence l'effet de la classification des particules dans le lit sur la réduction de la dispersion axiale [Chang et Chase 1996b, Batt et al., 1995, Karau et al., 1997].

Par ailleurs, en CLE, en plus des facteurs limitant classiques (similaires à ceux rencontrés en chromatographie en lit fixe), un mélange de la phase solide peut exister caractérisé par le coefficient de dispersion axiale des particules solides D_{axp} . Certains auteurs ont établi des corrélations qui relient D_{axp} à la vitesse superficielle du liquide [Van Der Meer et al., 1984, Kang et al., 1990]. Cependant, comme il n'existe pas de données expérimentales sur l'influence de la dispersion axiale des particules solides sur les performances de la séparation, ce paramètre n'est pas toujours pris en compte [Li et al., 2004, Kaczmarski et Bellot, 2004].

L'évaluation des paramètres hydrodynamiques et la modélisation de l'hydrodynamique dans la colonne continuent à faire l'objet des travaux actuels de la chromatographie en lit expansé. Des études récentes ont par exemple démontré que le coefficient D_{axL} diminue avec la hauteur de lit et la vitesse superficielle et augmente avec le diamètre de la colonne [Jahanshahi et al., 2009a, Jahanshahi et al., 2009b]. D'autre part, plusieurs modèles sont développés pour décrire l'hydrodynamique en lit expansé tout en prenant compte d'un maximum de paramètres comme la distribution de tailles des particules, la variation de la porosité du lit, la dispersion axiale de la phase liquide et/ou solide [Yun et al., 2004a, Yun et al., 2004b, Li et al., 2004, Kaczmarski, 2004, Chen et al., 2007]. On reviendra rapidement sur ce point dans le chapitre IV.

IV.3.3. Support solide

Les différentes considérations hydrodynamiques ont été au cœur du développement des supports chromatographiques spécifiques au lit expansé.

Les premiers travaux de séparation de protéines en lit expansé, ont été réalisés avec des supports communément utilisés en lit fixe ayant des matrices à base d'agarose ou de cellulose tel que le Sepharose Fast Flow [Dreager and chase, 1990, Chase and Dreager, 1992(a et b), Dreager and Chase, 1991]. Malgré une capacité dynamique similaire à celle obtenue en lit fixe (avec un taux d'expansion de 2), la productivité globale du procédé reste faible. Ceci est

expliqué par la faible vitesse d'écoulement utilisée, car il faut éviter une expansion trop importante des particules très peu denses du lit. En effet, la vitesse terminale de fluidisation de particules est très faible, de l'ordre de 200 cm.h^{-1} pour le le Sepharose Fast Flow.

Globalement, les caractéristiques des particules utilisées en termes de taille, de densité et de taille des pores sont déterminantes pour un bon fonctionnement du procédé chromatographique en lit expansé. En effet, ces caractéristiques déterminent la plage de vitesses d'écoulement utilisables et la cinétique de rétention des molécules, en particulier les limitations de transfert interne. Concrètement, des particules de taille importante permettent de travailler à des débits élevés, mais augmentent la résistance au transfert interne. Par conséquent, un lit sédimenté de hauteur plus élevée est nécessaire pour garantir un temps de contact suffisant pour le transfert dans la phase solide.

Des supports solides à base de silice [Finette, 1996] ou d'oxyde de zirconium [Griffith et al, 1997] sont utilisés. Ces particules sont caractérisées par une densité plus élevée que celle des particules d'agarose mais une taille plus petite ce qui permet d'atteindre, pour une même vitesse d'écoulement, le même degré d'expansion que celui atteint avec des particules à base d'agarose. D'autre part ces particules sont caractérisées par une taille plus petite ce qui permet en même temps de réduire les limitations de transfert intra-particulaire. En raison de la taille des particules, il est souvent nécessaire d'équiper la colonne d'une sorte de grille avec un maillage assez fin pour éviter que les particules ne soient entraînées. Cela peut poser des problèmes de colmatage avec les particules et les débris cellulaires contenus dans le fluide à traiter.

D'autres types de supports, développés pour la séparation des protéines en lit expansé, sont commercialisés actuellement. Ces supports ont pour matrices des polysaccharides, tels que la cellulose ou l'agarose, ou des polymères synthétiques comme le trisacrylate, auxquels un matériau de haute masse volumique, comme le quartz, le verre, le titane, le zirconium ou un autre métal, est incorporé.

Le matériau à haute masse volumique peut être incorporé sous forme de noyau central. Ceci permet, en plus de l'augmentation de la vitesse terminale de fluidisation, d'adapter la distance de diffusion indépendamment de la taille de la particule [Palsson et al 2000]. Les différents supports qui ont été utilisés en chromatographie en lit expansé ainsi que leurs caractéristiques physiques, sont présentés dans le tableau I-1.

Tableau I-1. Propriétés des supports chromatographiques classiques pouvant être utilisés en lit expansé et des supports spécifiques à la chromatographie en lit expansé (CLE) rapportées par Anspach et al., 1999.

Matériaux	Masse volumique (g.mL ⁻¹)	Diamètre (µm)	Références
<i>Particules utilisables en CLE</i>			
Fractosil 1000 (gel de silice)	1,389	40	[Dasari et al., 1993]
Verre à porosité contrôlée	≈ 1,3	100-250	[Thommes et al., 1995a]
Perfluorocarbone	2,2	50-80	[McCreath et Chase, 1995]
Dioxyde de Zirconium	3,2	50	[Griffith et al., 1997]
Dioxyde de Titane	2,59*	40 et 80	
<i>Particules spécifiques à la CLE</i>			
Cellulose/Dioxyde de Titane	1,2	125-600	[Gilchrist et al., 1994]
Agarose/Quartz	1,15	100-300	[Hjorth et al., 1995]
Agarose/Alliage métallique	1,3	80-165	[Hjorth et al., 1995]
Agarose/Verre	1,4-1,6	100-300	[Zafirakos et Lihme, 1996]
Trysacrylate/Dioxyde de Zirconium	1,5	100-300	Biosepra (France)

* calculée sur la base de Sachtopore (volume des pores 0,12 ml/g, dimension de pores 30 nm), (Sachtleben Chemie, Duisburg, Allemagne).

Des supports avec des groupements fonctionnels multiples : échangeurs d'anions, échangeurs de cations, ou hydrophobes sont commercialisés.

On peut citer comme supports : Streamline (gel d'agarose poreux et noyau en quartz) et Streamline Direct (gel d'agarose poreux et noyau en acier inoxydable) commercialisés par Amersham Biosciences, Fastline (gel d'agarose poreux et un noyau de tungstène) commercialisé par UpFront Chromatography A/S et Hyper Z (oxyde zirconium et polymère d'acrylate) commercialisé par Biosepra.

Vu le rôle que joue le support dans la stabilisation du lit et l'amélioration des performances de séparation en lit expansé, le développement de supports adaptés à la chromatographie en lit expansé fait encore l'objet de travaux de recherche [Miao et al., 2005, Xia et al., 2007b, Li et al., 2004, Chase, 2009, Zhao et al., 2010, Shi et al., 2011].

IV.3.4. Applications de la chromatographie en lit expansé

De nombreux travaux portant sur la chromatographie en lit fluidisé ont été publiés depuis les années 60. Plusieurs applications de séparation de protéines directement à partir d'un milieu brut riche en matières en suspensions sont décrites dans la littérature. Des problèmes

rencontrés liés au blocage du système de distribution du fluide et aux interactions entre le support solide et les débris cellulaires sont souvent mentionnés [Hubbuch et al., 2005].

Les premiers travaux concernent la purification de la streptomycine, un antibiotique, à partir de milieu de culture dans le but d'améliorer le procédé de production classique pour lequel des pertes importantes de produit sont observées. Les pertes sont dues à l'étape de centrifugation et à la diminution du flux au cours de l'étape de filtration [Bartels et al., 1958]. D'autres procédés de séparation d'antibiotiques par chromatographie en lit fluidisé ont été mis en œuvre et ont permis une augmentation du rendement de production de plus de 50% comme dans le cas de la novobiocine [Belter et al., 1973].

Avec le développement des biotechnologies, la chromatographie en lit fluidisé représente de plus en plus un outil très important pour la récupération des protéines recombinantes à partir de milieu de culture de bactéries ou de champignons. Hanson et al., (1994) ont réussi à isoler directement une protéine recombinante de fusion par un procédé de chromatographie d'échange d'ions en lit expansé utilisant comme support la DEAE Streamline. Pour améliorer la productivité du procédé, une étape de dilution du milieu a été rajoutée avant le procédé d'échange d'ions. L'application à échelle pilote a permis également la production d'une protéine recombinante l'annexine V (protéine à effet anticoagulant) à partir d'un milieu de culture bactérien avec un rendement très élevé (> 95%) [Barnfield Frej et al., 1994]. D'autres purifications de protéines recombinantes à partir de milieu de culture de champignons sont décrites. Par exemple, Chang et Chase (1995, 1996b) ont isolé la glucose-6-phosphate-dehydrogenase.

Le procédé d'adsorption en lit expansé a également été appliqué aux cellules de mammifères [Thommes et al., 1995a, Born et al., 1996]. Toutefois, l'application de la CLE aux effluents agroalimentaires est relativement récente [Tong et al, 2002; Ozyurt et al., 2002 ; Bai et Glatz, 2003a, Biazus et al, 2006].

Les travaux de Bai et Glatz (2003b) ont montré l'intérêt de ce type de procédé pour le traitement d'extraits bruts des plantes, même si une étape de prétraitement des extraits pour l'élimination partielle des produits lipidiques, a été réalisée. Malgré une légère adsorption sur le support des composés lipidiques résiduels et des composés phénoliques, le procédé s'est avéré performant et le support réutilisable pour de nombreux cycles.

Parmi les travaux publiés dans la littérature scientifique, il faut mentionner celui de Straetkvern et al. (1999) qui traite de la récupération d'une protéine spécifique à partir d'un jus brut de pomme de terre, par chromatographie en lit expansé. Un mélange de deux résines avec le même ligand multi-fonctionnel à des concentrations différentes, est utilisé, cela permet de rendre le système relativement indépendant de la force ionique. En outre, ces auteurs ont montré que les enjeux scientifiques principaux concernent la compétition entre les différents types de composés du jus (polyphénols, notamment) et ils préconisent l'utilisation de ce type de procédé pour assurer la conservation des propriétés fonctionnelles des protéines.

L'application du procédé d'adsorption en lit expansé aux extraits aqueux provenant de matériel végétal reste peu étudiée et peut être confrontée à quelques limitations :

- Ces extraits sont caractérisés par des compositions chimiques plus complexes puisqu'on peut y trouver des lipides, de l'amidon, de fortes concentrations en sels, des phénols et des pigments qui peuvent se lier aux protéines et/ou au support solide.
- La teneur des particules solides dans ces extraits est plus importante (9 à 20% massique), leur taille est comprise entre 10^{-4} et 1 mm ce qui représente un risque de déstabilisation « physique » du lit fluidisé.

Cependant de nombreuses applications de la chromatographie en lit expansé pour la séparation de molécules d'intérêt à partir de milieu biologique sont toujours en cours d'étude. Des travaux récents tels que la séparation d'antigène de l'hépatite B à partir de milieu de culture bactérie [Ng et al., 2008, Yap et al., 2010], pour la production à grande échelle de phycocyanine C à partir de cyanobactéries [Ramos et al., 2010] par CLE, peuvent être cités à titre d'exemple.

V. Conclusion

De part leurs propriétés de taille, composition, structure et charge, les protéines sont des biomolécules assez complexes. La stabilité d'une protéine dans son milieu biologique est liée à la présence d'autres composants mais aussi à ses propriétés intrinsèques comme sa charge, la distribution des groupements à sa surface, sa composition en acides aminés...

Les protéines végétales présentent un intérêt particulier compte tenu de leur valeur nutritionnelle mais également de leur potentiel d'application dans différents domaines. Parmi ces protéines, la Rubisco est la protéine végétale la plus abondante et son potentiel

d'application est très important, ce qui justifie le besoin de procédés bien adaptés pour sa récupération à partir de son milieu d'origine, qui peut être considéré par ailleurs acceptable d'un point de vue environnemental.

Cette synthèse bibliographique a permis de faire le point sur les procédés de séparation des protéines conventionnels à partir de milieux bruts tout en soulignant l'importance de la mise en œuvre des procédés les mieux adaptés à ces milieux. En effet, le développement de procédés qui permettent une séparation efficace, sélective et peu coûteuse de biomolécules représente un enjeu crucial pour les biotechnologies. Cette tâche est d'autant plus difficile que la plupart du temps, la biomolécule à séparer se trouve dans un milieu complexe et par conséquent, le nombre des opérations nécessaires à sa récupération engendre des coûts assez importants.

Le procédé chromatographique d'échange d'ions représente une alternative intéressante aux procédés industriels actuels, notamment en mode lit expansé. En effet, la chromatographie d'échange d'ions offre une bonne sélectivité et la capacité à traiter de grands volumes. Sa mise en œuvre reste cependant délicate et nécessite des travaux de recherche afin d'identifier toutes les potentialités d'application.

CHAPITRE II.
METHODES ANALYTIQUES
POUR LA CARACTERISATION
DES JUS ISSUS DE BIOMASSE
VEGETALE

Sommaire

I. Introduction générale	73
II. Publication: Production of green juice with an intensive thermo-mechanical fractionation process. Part II: Effect of processing conditions on the liquid fraction properties	75
II.1. Introduction	76
II.2. Material and methods	79
II.2.1. Vegetable material	79
II.2.2. Biomolecules	80
II.2.3. Conventional methods	81
<i>II.2.3.1 Nitrogen content</i>	<i>81</i>
<i>II.2.3.2 Protein fractionation</i>	<i>81</i>
<i>II.2.3.3 SDS PAGE electrophoresis</i>	<i>82</i>
II.2.4. Rubisco analysis method	83
II.3. Results and discussion	88
II.3.1. Biomass pre-treatment effect	89
II.3.2. Temperature effect	90
II.4. Conclusion	96
III. Bilan général	96
IV. Conclusion générale	98

Des méthodes analytiques de caractérisation générique ont été appliquées directement sur les jus. D'autres méthodes analytiques spécifiques à la Rubisco ont été mises au point avec la seule protéine commercialisée, qui est celle issue des épinards. De part leurs principes, ces méthodes font appel à des propriétés comme la taille, le nombre et le type de sous-unités qui ne changent pas d'une Rubisco à une autre, quel que soit son origine. Ainsi, deux étapes ont été suivies dans le développement des protocoles : dans un premier temps, les méthodes ont été mises au point et validées uniquement avec la Rubisco des épinards, à partir de la protéine commerciale et des jus obtenus à différentes conditions expérimentales. Ensuite, la méthode a été validée sur des jus issus de la luzerne.

Pour la première étape, l'étude a été réalisée dans le cadre du projet de recherche PRODULUZ. Dans ce projet, un procédé de déshydratation mécanique assistée thermiquement pour la déshydratation des biomasses végétales, telles que la luzerne ou les épinards, fait l'objet des travaux du laboratoire RAPSODEE. Dans ce cadre, des jus ont été produits et caractérisés dans le but d'évaluer leur potentiel de valorisation et de mieux conduire le procédé, ce qui a nécessité de la mise au point de méthodes analytiques adaptées. Ce travail a fait l'objet d'une publication scientifique : *S. Kerfai, et al., (2011) Production of green juice with an intensive thermo-mechanical fractionation process. Part II: Effect of processing conditions on the liquid fraction properties, Chemical Engineering Journal, 167, 132–139*. Le texte de la publication constitue le corps de ce chapitre. Il est précédé d'une introduction générale et suivi d'une conclusion générale.

Une fois les méthodes mises au point, elles ont été appliquées sur le jus de luzerne, pour lesquels la concentration approximative de Rubisco est a priori connue (cf Chapitre III, paragraphe II.2).

I. Introduction générale

Le traitement industriel actuel de la biomasse végétale, telle que la luzerne, consiste globalement en une opération de déshydratation par pressage de la biomasse qui conduit à une fraction solide et une fraction liquide. La première fraction est par la suite séchée et transformée en produits finaux capables d'être conservés longtemps, ils sont destinés à l'alimentation animale. La fraction liquide est elle fractionnée par plusieurs étapes de précipitation pour produire un concentrat protéique utilisé aussi pour l'alimentation animale [De Fremery et al., 1973] et récemment accepté (en quantité contrôlée) pour la nutrition humaine. Cette transformation dans son ensemble présente un bilan énergétique très défavorable et une valorisation matière assez faible.

La notion de bioraflnerie, qui se développe de plus en plus, implique d'une part la transformation durable de la biomasse avec une consommation énergétique faible, voire même une production d'énergie renouvelable (biocarburants), et d'autre part la production d'une variété de produits à haute valeur ajoutée [Di Donato et al., 2009]. Ainsi, pour palier au bilan énergétique défavorable du procédé actuel de traitement de la biomasse végétale, plusieurs travaux se sont intéressés à l'amélioration de l'étape de déshydratation en réduisant sa consommation énergétique [Mahmoud et al., 2010 ; Arlabosse et al., 2010]. D'autre part, la fraction liquide issue de la déshydratation de la biomasse végétale a aussi fait l'objet de plusieurs études [Godessart et al., 1987 ; Levesque and Rambourg, 2002] dans le but d'améliorer la valeur ajoutée et de diversifier les produits finaux.

En effet, la fraction liquide présente un potentiel de valorisation important puisqu'elle constitue une source de protéines (et peptides) d'origine végétale abondante et renouvelable. Ces protéines représentent une alternative importante aux protéines animales dans l'alimentation humaine et ont également des applications potentielles dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire et environnemental. En plus de sa teneur en protéines, le jus renferme des composés phénoliques, des pigments et des vitamines [Kromus et al., 2006]. Il apparaît ainsi que le potentiel de valorisation de la fraction liquide issue de la déshydratation de la biomasse végétale est étroitement lié à sa teneur et sa composition en biomolécules. Par conséquent, la caractérisation des biomolécules présentes dans le jus devient nécessaire pour mettre en œuvre des procédés de valorisation bien adaptés.

La caractérisation physico-chimique d'un jus brut issu de déshydratation se fait actuellement par des méthodes conventionnelles qui fournissent des informations globales sur la

composition du jus. La méthode la plus courante est la détermination de la teneur en protéines dans jus par un dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldhal. Une caractérisation plus spécifique des protéines a été réalisée par des approches protéomiques qui ont permis l'identification des différentes protéines présentes [Incamps, 2005]. Toutefois, ces méthodes donnent uniquement des informations d'ordre qualitatif et restent assez complexes à mettre en œuvre.

Ce travail s'intègre dans le cadre de l'étude d'un procédé de déshydratation mécanique assisté thermiquement (DMAT) pour la déshydratation de biomasse végétale. Ce procédé est caractérisé par une faible consommation énergétique et une production de grandes quantités de jus. Les conditions opératoires appliquées lors de ce procédé (température et prétraitement de la biomasse) peuvent avoir un effet sur la composition et les caractéristiques du jus produit. Par conséquent, la caractérisation des jus produits par DMAT permettra d'évaluer leur potentiel de valorisation, mais aussi donneront des informations vis-à-vis de la conduite du procédé de déshydratation en fonction de l'objectif recherché.

Pour cela, les propriétés physico-chimiques des jus produits par le procédé DMAT appliquée à des feuilles d'épinard sont étudiées. Des méthodes de caractérisation globale, comme le fractionnement des protéines du jus en fonction de leur hydrophobicité et la détermination de la teneur en azote total sont utilisées dans un premier temps, ensuite une méthode de détection et de quantification de la Rubisco dans la fraction liquide par chromatographie liquide d'exclusion de taille est développée et l'analyse électrophorétique en conditions dénaturantes est réalisée pour vérifier la présence des deux sous unités de la protéine. La disponibilité de la Rubisco d'épinard partiellement purifiée sur le marché, commercialisée sous forme de poudre a permis de disposer d'une référence qualitative et quantitative pour la mise au point des méthodes.

II. Publication

PRODUCTION OF GREEN JUICE WITH AN INTENSIVE THERMO-MECHANICAL FRACTIONATION PROCESS. PART II: EFFECT OF PROCESSING CONDITIONS ON THE LIQUID FRACTION PROPERTIES

S. Kerfai^{1,2,3}, A. Fernández^{1,2,3}, S. Mathé^{1,2,3}, S. Alfenore^{1,2,3}, P. Arlabosse^{4,5}

1) Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077
Toulouse, France

2) INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400
Toulouse, France

3) CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

4) Université de Toulouse ; Mines Albi ; CNRS ; Campus Jarlard, F-81013 Albi, France

5) Ecole des Mines Albi, Centre RAPSODEE, Campus Jarlard, F-81013 Albi, France

Chemical Engineering Journal, 2010, doi 10.1016/j.cej.2010.12.011

Abstract

The thermally assisted mechanical dewatering (TAMD) process proved to be efficient to dewater various biomasses. The main idea of this process is to supply heat by conduction through the press walls during the wet fractionation. Applied to spinach leaves, this process led to energy saving but also to a larger amount of green juice. In order to optimize the TAMD process and to evaluate the valorisation potential of the liquid fraction produced, the physico-chemical characteristics of the green juice were investigated.

In addition to conventional characterisation methods, an analysis method specific to Rubisco protein (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) has been developed in the present work. The method enables detection and quantification of Rubisco in green juice samples by using size exclusion chromatographic principles (HPLC SEC).

Global methods showed that cut degree of the biomass leaves has an effect on the liquid fraction produced. Indeed, nitrogen content, green and white proteins contents are higher when leaves are finely cut.

The investigation of temperature processing effect on juice characteristics by applying the different characterisation methods leads to:

- At high temperature (90°C), low nitrogen and fractionated proteins contents in juice, which means that an enriched press cake is produced.
- At medium temperature (50°C), higher nitrogen content in juice, which means that a polypeptides-rich liquid is produced.
- At low temperatures (30°C), HPLC SEC method developed revealed that TAMD process produced a green juice containing biomolecules of high added value such as Rubisco protein.

Keywords: Green juice, valorisation, TAMD process, physico-chemical characterisation, Rubisco, HPLC SEC analysis.

II.1. Introduction

According to the principle of sustainability, a modern society should preserve non-renewable energy sources and replace them with renewable energy. Biorefinery is widely defined as “the sustainable processing of renewable biomass into a variety of value-added products (chemicals, materials, food and feed) and energy (biofuels, power and heat)” [Donato et al., 2009]. Biorefineries usually process agriculture or forest biomass such as sugar and starch crops, vegetable oils, grasses, whey, lignocellulosic materials and different organic wastes such as municipal solid wastes and residues from the food production chain, to produce energy and a wide variety of chemical precursors and bio-based materials.

Renewable resources derived from biomass plants, also referred to as biofuel, bioenergy, or bioresources are sufficiently similar to fossil fuel to provide substitution. Especially, renewable grass resources derived from extensive land cultivation or other natural resources such as alfalfa, are excellent biorefinery raw materials [Starke et al., 2000]. Green biorefineries are dedicated to the processing of these green grasses.

The first processing step of the green biorefinery is the wet fractionation. This process separates the plant material under pressure effect into two broad components: (1) water-insoluble components (press cake usually used for animal feed) and (2) carbohydrate- and protein-rich water-soluble fraction [Kamm et al., 2009]. The liquid fraction is a nutrient-rich green juice containing proteins, free amino acids, organic acids, dyes, enzymes, hormones, further organic substances, and minerals. This is the reason why it constitutes a raw material

for several high value products such as lactic acid and corresponding derivatives, amino acids, ethanol, and proteins [Kromus et al., 2006].

The thermally assisted mechanical dewatering (TAMD) process, designed since several years now in the RAPSODEE Research Center, proved to be efficient to dewater various biomasses under a variety of processing conditions ranging from 21 to 90°C and from 300 to 3000 kPa [Mahmoud et al., 2008]. The main idea of this process is to supply heat by conduction through the press walls during the wet fractionation. It has been illustrated that, when applied to alfalfa, the TAMD process can remove up to 69% of the inherent liquid fraction with a one-stage thermally assisted compression [Arlabosse et al., 2010] and up to 83% with a two-stage thermally assisted compression [Mahmoud et al., 2010]. As the extraction yield of conventional process with prior pulping amounts to 55%, the TAMD process is able to produce a much larger amount of green juice. Besides, the use of the TAMD process before the drying of the dewatered alfalfa cake leads to an energy saving of at least 30% on the overall separation chain. Indeed, the energy consumption of the TAMD process is less than 150 kWh/m³ [Grau, 2009].

In addition to the energy consumption reduction, recovering high value co-products from the liquid fraction is a real challenge for biorefineries industries to increase the sustainability and the profitability [Kamm et al., 2009]. The relative abundance of proteins in leaf material and the basic need for protein in the human diet are the main reasons for scientists concern to focus on proteins recovery from vegetable biomass. From 70's on, several developments have been directed toward production of human food grade Leaf Protein Concentrate (LPC) from green juice [Douillard, 1985; Telek and Graham, 1983; Kohler and Knuckles, 1977; Prie, 1969]. These last years, several vegetable biomasses revealed their intrinsic value and potentialities as biorefineries feedstocks. The wet fractionation process of alfalfa biomass for example has been the subject of many researches [Koschuh et al., 2004; Levesque and Rambourg, 2002; Godessart et al., 1987]. A valorisation process by thermal coagulation and centrifugation was used to recover some compounds, especially proteins and peptides. The final product was a (92% (w/w) moisture) powder containing 82% (w/w) protein and was exclusively used as animal feed [Fremery et al., 1973]. Prévot D'Alvise, (2004) and Kapel et al., (2006) used enzymatic hydrolysis to produce proteins from an industrial alfalfa soluble protein concentrate.

The TAMD process is likely to extract green juice in larger quantities than conventional fractionation processes. Furthermore, the liquid fraction composition will probably vary depending on the operating conditions of the TAMD process. Indeed, some of the green juice components have a low resistance to thermal treatments. In addition, the mechanisms of water transportation in plant cells are related to temperature [Arlabosse et al., 2010], so the green juice composition can be used for process control. Besides, the valorisation potential of the liquid fraction produced by biomass dehydration depends on its biomolecules content and their characterisation is necessary to define the most adapted valorisation process. Therefore, global and specific characterisation methods development allows not only a specific valorisation but also a control of the dewatering process.

To date, in the wet fractionation plant, the green juice has been only characterised by its protein content determined by its nitrogenous matter according to Kjeldahl analysis (Procedure V18-100; AFNOR, 1985) [Incamps et al., 2006]. Starke et al., (2000) developed a qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in green juices by gas chromatography/mass spectrometry. More specific analysis of the green juice was performed by proteomics. Studies of genome products and establishment of proteome maps of alfalfa juice were investigated by Incamps et al., (2006). However no specific quantitative method is available in the literature.

For green biomass, the chlorophyll, xantophyll, carotene and other fatty materials like hydrophobic proteins of leaves (commonly called green), are contained in small bodies in cells of leaf, called chloroplasts. These chloroplasts are suspended in the liquid cell which contains a hydrophilic protein mixture. The hydrophilic proteins have been designed as white proteins although a part of it comes from broken chloroplasts [Kohler, 1972]. Purification and technological evaluation of the main hydrophilic protein of leaves Rubisco (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, EC 4.1.1.39) has been the subject of several studies. Rubisco is one of the largest proteins in nature. It is a globular protein and in higher plants having molecular weight (MW) close to 560 kDa. The general structure of Rubisco is L8S8-eight large subunits with MWs around 56 kDa and eight small subunits with MWs close to 14 kDa. Four dimers of the large subunit constitute a core of eight large subunits with a four-fold axis of symmetry and a barrel-like general shape [Barbeau and Kinsella, 1988; Douillard and Mathan, 1994]. Owing to its natural abundance in chloroplasts and its physico-chemical properties, this protein could be obtained with a good yield and a high level of purity

[Douillard and Mathan, 1994]. Separation of the white hydrophilic protein fraction from the cell wall components opens opportunities of products marketing for ruminant and non-ruminant organisms, furthermore, recovering of Rubisco fraction offers potentialities to enzymatic activity application such as its immobilisation for a carbon dioxide fixation bioprocess [Chakrabarti et al., 2002].

The aim of this work was to characterise the composition of the green juices produced by TAMD process in order to evaluate their potential of valorisation but also to evaluate their capacity for process control. Physico-chemical properties of green juices produced by the TAMD process applied to spinach leaves were investigated. The choice of Spinach leaves as green vegetable biomass, for this study, is due to the availability of partially purified Rubisco extracted from this plant. Partially purified Rubisco of Spinach, commercialised in powder form, was thus considered as a reference for the development of qualitative and quantitative characterisation methods. Global characterisation, such as fractionation of juice proteins according to their hydrophobicity and total nitrogen content were also carried out. A method of detection and quantification of Rubisco in the wet fraction by HPLC size exclusion chromatography was developed to highlight the effects of operating conditions on this protein and to optimize the TAMD process for their production. Finally Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS PAGE) was carried out to check the two Rubisco subunits presence.

II.2. Material and methods

II.2.1. Vegetable material

Green juice samples were produced with the TAMD process, according to the protocol described by Arlabosse et al., (2010), from spinach leaves cut at different degrees and produced under constant temperature from 30 to 90°C. Three cutting levels were considered: none (whole leaves), coarse (leaves chopped into pieces of 3*3 cm) and fine (leaves chopped into 0.5 cm broad bands). The samples were immediately frozen (-20°C) after production and defrozen at 6°C before characterisation. Figure II-1 summarises the steps of biomass fractionation and physico-chemical characterization that have been followed in this work.

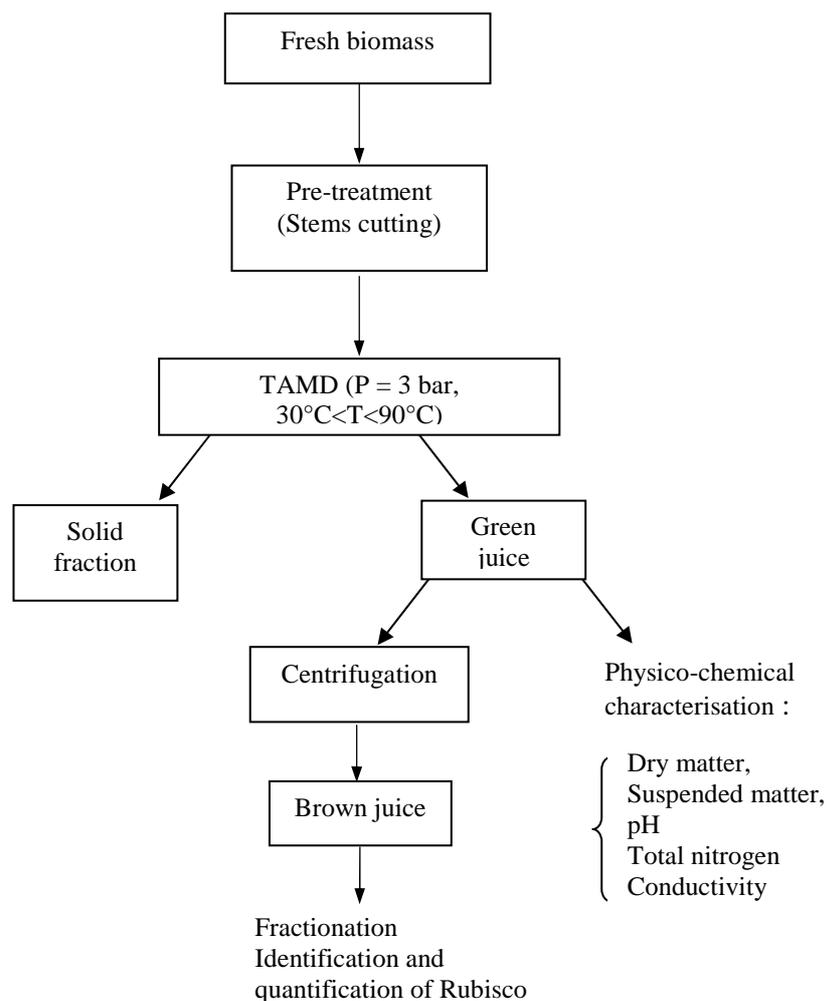


Figure II-1. Global layout of spinach fractionation and physico-chemical characterisation steps.

II.2.2. Biomolecules

Molecular weight marker proteins used for HPLC Size Exclusion Chromatography (HPLC SEC) were from Amersham-Pharmacia. These proteins and their molecular weights (MW) are given in table II-1.

Table II-1. Molecular weight proteins marker used for HPLC SEC column calibration.

Protein	Aprotinin	Ribonuclease A	Ovalbumin	Conalbumin	Aldolase	Catalase	Ferritin	Thyroglobulin
MW (kDa)	6.5	13.7	43	72	128	232	440	669

Molecular weight markers from Bio-Rad, mentioned in table II-2, were used for Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis analysis.

Table II-2. Molecular weight markers used for SDS PAGE analysis.

Protein	Phosphorylase b	Bovine serum albumin	Ovalbumin	Carbonic anhydrase	Soybean trypsin inhibitor	Lysozyme
MW (kDa)	97	66.2	45	31	21	14.4

Commercial Rubisco from Spinach (Sigma Aldrich, France) were used in this work as a reference for detection and quantification of Rubisco in the juice samples. This protein is commercialised as a partially purified powder, soluble in 1 M Tris HCl, pH 7.8.

To estimate the purity of the commercial Rubisco, dialysis treatment was carried out to remove all compounds of molecular weight lower than 300 kDa. Rubisco solution was dialysed for 30 hours at 4°C with a dialysis membrane from Biovalley (France) of 300 kDa molecular weight cut-off. The purity of Rubisco solution was estimated as being 70%.

II.2.3. Conventional methods

The pH and the electrical conductivity were measured prior any juice sample characterisation. Dry solids content and suspended matter were then determined for each sample according to the AFNOR standard protocols 90-105 [AFNOR, 1994]. The juice was dried at 105°C for 24 hours. Suspended matter was eliminated by centrifugation at 5000 g for 10 min to remove cell debris.

II.2.3.1 Nitrogen content

Total nitrogen content was determined in crude juice samples by the Kjeldhal procedure [Incamps et al., 2006] with Büchi K-425 and K-350 (Büchi Rungis, France) equipments. Raw juice samples were diluted in deionised water. As commonly seen for biomass proteins [Kapel et al., 2006; Lusueur-Lambert et al., 2003], a factor of 6.25 was used to convert nitrogen into proteins.

II.2.3.2 Proteins fractionation

Alfalfa proteins are divided into two main groups which are hydrophobic and hydrophilic proteins. The fraction of hydrophobic proteins is usually called “green” fraction because of the association of its proteins to coloured compounds such as chlorophyll and xantophyll,

whereas hydrophilic proteins are called “white” proteins. At the laboratory scale, separation of hydrophobic from hydrophilic proteins often includes a precipitation step. Bahr et al., (1977) proved that saturation close to 30% of ammonium sulphate allows green hydrophobic proteins precipitation while white hydrophilic proteins remain in solution. Precipitation of hydrophilic proteins fraction was demonstrated at 55% of ammonium sulphate by Hall et al., (1981) Rubisco generally precipitates at 50% saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ though some small differences have been noticed between Rubiscos of different botanical origins [Bahr et al., 1977]. For example, Rubisco from spinach, the only Rubisco commercialised as a partially purified powder by Sigma Aldrich, is prepared by ammonium sulphate fractionation followed by dialysis prior to lyophilisation.

Suspended matter free juice was fractionated by ammonium sulphate to separate “green” hydrophobic and “white” hydrophilic proteins. Ammonium sulphate was added to the juice sample to obtain a 27% saturated solution. The precipitated hydrophobic proteins were separated by centrifugation (15 minutes at 5000g). The pellet of hydrophobic proteins was washed with deionised water, dried at 105°C and weighed. The supernatant was saturated to 55% with ammonium sulphate to precipitate hydrophilic proteins. The separation of white proteins was obtained by centrifugation for 15 minutes at 5000g and the pellet of hydrophilic proteins was washed, dried at 105°C and weighed.

II.2.3.3 SDS PAGE electrophoresis

As Rubisco is a multimeric protein, SDS-PAGE enables to visualise the large and small subunits. Comparison between bands of commercial Rubisco and bands of different juice samples produced with TAMD process will highlight differences in conformation, if any.

SDS-PAGE was carried out using a 15% resolving gel following the procedure described by Laemmli, (1970). Acrylamide, bisacrylamide, SDS, TEMED, ammonium persulfate and β -mercaptoethanol were purchased from Sigma Aldrich, France.

Electrophoresis procedure was performed for juice samples produced from spinach leaves finely cut, at 30, 50, 70 and 90°C, using the Mini Protean II Cell system (Bio-Rad, France). Gels were stained using Coomassie brilliant blue R-250.

II.2.4. Rubisco analysis method

Specific method for Rubisco detection and quantification was developed. Among white hydrophilic proteins, Rubisco is the most abundant. Knowledge of Rubisco structure and its physico-chemical properties especially its molecular weight (MW) leads to conclude that Rubisco represents most probably the highest molecular weight protein among leaves white proteins. Therefore, size exclusion chromatography constitutes an adequate method to identify and quantify Rubisco in juice samples.

A silica-based (8x300) Protein KW804 column (Shodex, Tokyo, Japan) was selected. The column was firstly calibrated by analysing proteins of different molecular weight (see table II-1), to establish the correlation between the elution volume and the molecular weight.

Äkta purifier system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) was used. Analyses were carried out with an injection loop of 0.1 mL, with phosphate buffer solution 4 mM pH 6.8 and 25 mM Na₂SO₄ eluent at a flow rate of 1 mL/min. The analysis was coupled with a measurement of the absorbance at 280 nm by means of a UV detector. Absorbance 254 and 210 nm were also carried out but were less specific to protein detection, especially Rubisco.

A column calibration curve consists on the relationship between the protein MW and the liquid volume used for the protein moving in the column until its exclusion. This volume is called elution volume and is as high as the MW of the protein is low. Figure II-2 shows the calibration curve of the HPLC SEC column carried out with the pure proteins mentioned before. It can be seen that the separation range of the HPLC SEC column is included between 8.3 and 11.7 mL. According to this calibrating curve, a molecular weight protein of 560 kDa is expected to be eluted from the column at 8.8 mL.

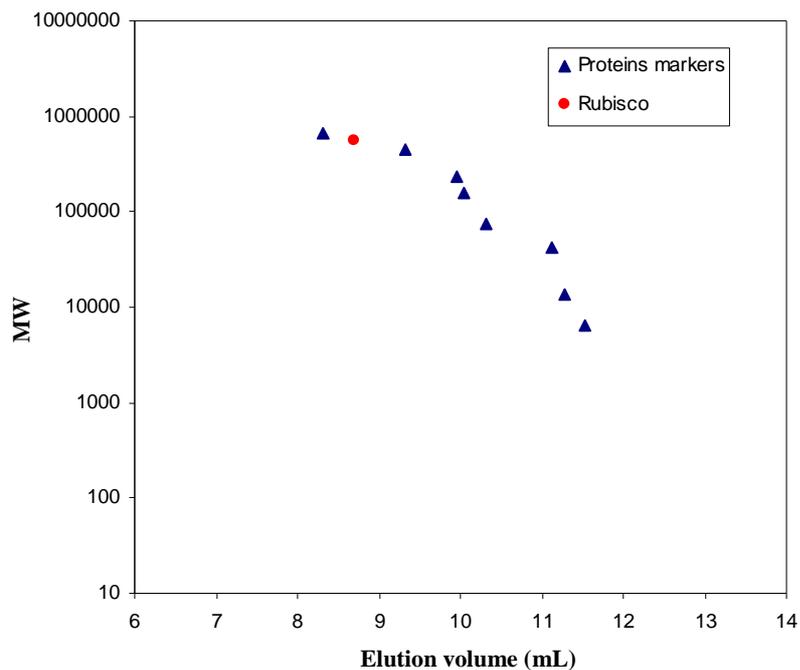


Figure II-2. Calibration curve of HPLC SEC column (Protein KW804 column, Shodex) carried out with proteins markers: Aprotinin, Ribonuclease A, Ovalbumin, Conalbumin, Aldolase, Catalase, Ferritin, Thyroglobulin. Rubisco molecular weight as a function of its elution volume is shown.

Commercial Rubisco from spinach was then analysed with this HPLC SEC protocol. Absorbance at 280 nm as a function of the elution volume, called chromatogram, is plotted in figure II-3 for Rubisco solution at 1 g.L^{-1} .

As expected, Rubisco solution was not pure since the chromatogram revealed many absorbance peaks. The first absorbance peak F1, observed at an elution volume of 8.74 mL, corresponds to a molecular weight close to 570 kDa. Compounds eluted at higher volumes from 10 to 12 mL correspond to molecular weights ranging from 60 to 6 kDa. They constitute the fraction F2.

Compounds eluted at volumes higher than 12 mL correspond to molecular weights compounds lower than 6 kDa. Their MWs can not be determined exactly since they are out of the separation range of the column. However, the scale of the chromatogram was extended until the baseline returns to zero.

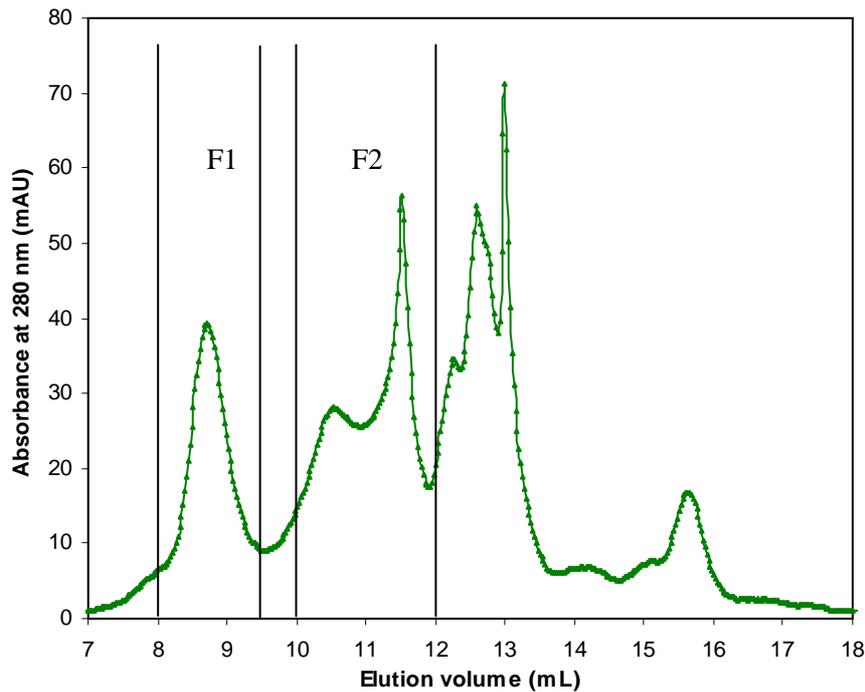


Figure II-3. HPLC SEC chromatogram obtained for spinach Rubisco solution at 1 g.L^{-1} . Sample volume is 0.1 mL, PBS eluent with a flow rate of 1 ml/min. F1 is the fraction having a MW close to 570 kDa and F2 fraction of MW between 60 and 6 kDa.

F1 and F2 fractions were collected separately from HPLC SEC column and analysed by SDS PAGE. Figure II-4 shows the gel revealed with Coomassie blue after migration of Rubisco solution (in lane 3), F1 (in lane 4), F2 (in lane 5), lysozyme (in lane 2) and BSA (in lane 1).

When compared to protein markers, Rubisco solution presented one first band corresponding to a molecular weight of 58 kDa and a second band that appeared at the same level of lysozyme band (14 kDa). Intermediate MW bands were also detected in Rubisco lane migration. Migration of F1 on the SDS PAGE showed only two bands at the same level of the two bands detected with Rubisco solution (of 58 and 14 kDa), while F2 showed the intermediate MW bands.

This seems coherent with HPLC SEC results. The first peak F1 detected in HPLC SEC analysis (eluted at 8.74 mL) corresponds probably to the purified Rubisco whereas F2 is concerned with compounds of lower MWs, between 58 and 14 kDa.

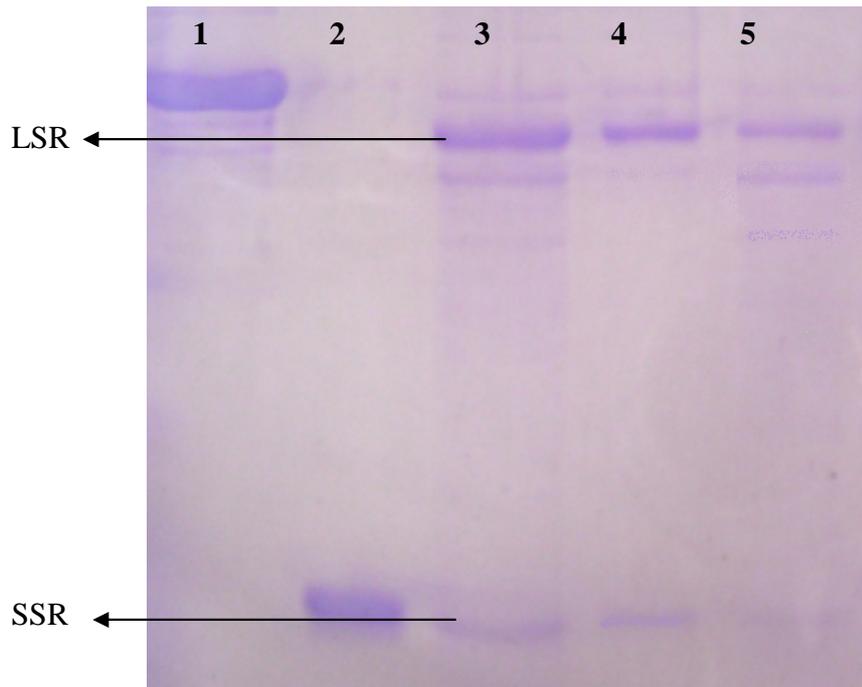


Figure II-4. Rubisco fractions analysis on SDS-PAGE 15%. From left to right: lane 1 BSA, lane 2 Lysozyme migration, lane 3 commercialised spinach Rubisco, lane 4 F1 , lane 5 F2. LSR: large subunit of Rubisco; SSR: small subunit of Rubisco.

The HPLC SEC method developed seems able to detect Rubisco protein in aqueous solution. The peak at an elution volume of $8.74 (\pm 5\%)$ was then considered as an indicator of the presence of Rubisco in green juice samples (figure II-2).

In order to quantify Rubisco content in juice samples, a calibration curve has been established by injection of Rubisco solutions, prepared by dissolution of the partially purified powder in 1 M Tris HCl pH 7.8 buffer, at different concentrations. The chromatograms obtained are shown in figure II-5.

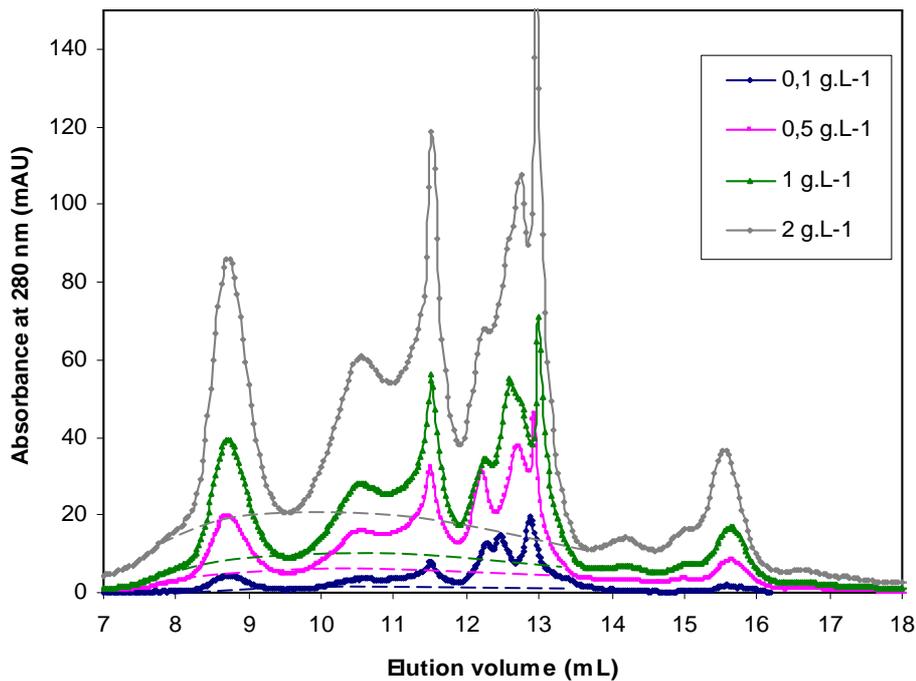


Figure II-5. HPLC SEC chromatograms obtained for spinach Rubisco solutions. Sample volume is 0.1 ml, concentrations in Rubisco vary from 0.1 to 2 g.L⁻¹, PBS eluent with a flow rate of 1 ml/min.

Rubisco peaks area were calculated for each concentration with a baseline adjustment as shown in figure II-5, since the amount of impurities increases when the concentration of the Rubisco solution increases. Figure II-6 presents the calibration curves performed for Rubisco solutions with different concentrations ranging from 0.1 to 2 g.L⁻¹.

Rubisco concentration can be determined by the following equation:

$$C = 53 \times 10^{-3} \times A \quad \text{Equation II-1}$$

Where A is the peak area, C is the Rubisco concentration in g.L⁻¹.

To estimate the accuracy of the measures, Rubisco solutions of well-known concentration were injected and their concentrations were calculated by means of equation II-1. The error was evaluated to 10%. This relationship was used for green juice to quantify Rubisco. Centrifuged juice samples, produced by the TAMD process, were then injected in the HPLC SEC column and their Rubisco content was determined.

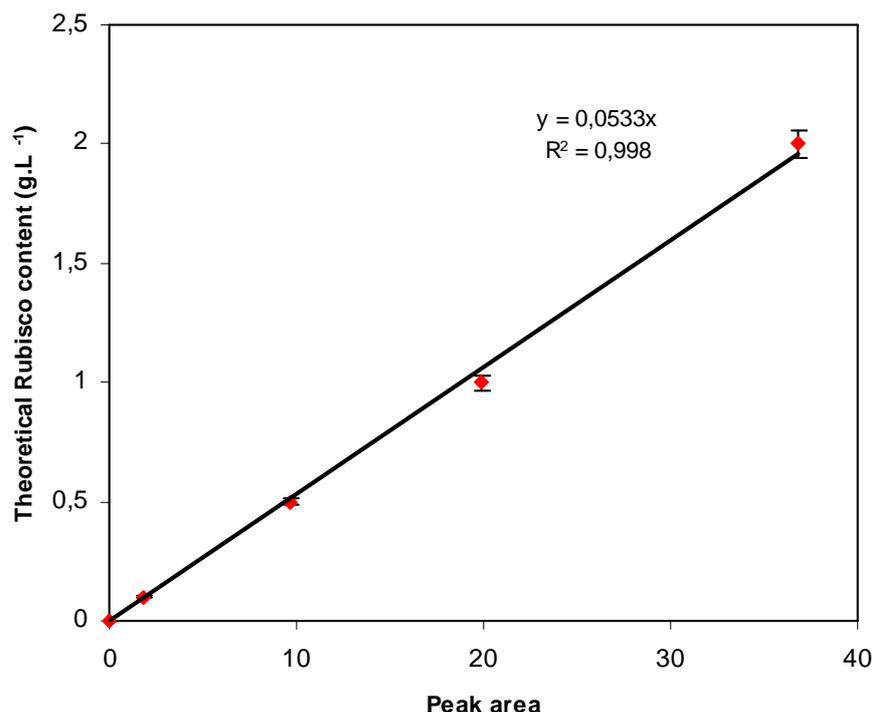


Figure II-6. Calibration curve: Rubisco peak area versus theoretical Rubisco content (from 0.1 to 2 g.L⁻¹).

II.3. Results and discussion

These characterisation methods were applied for the spinach juices produced by TAMD process at the different operating conditions summarised in table II-3.

Table II-3. Studied operating conditions of the TAMD process for green juice production.

Wall temperature of the press	50°C			30°C	50°C	70°C	90°C
Cutting level	None	Coarse	Fine	Fine			

In order to study the influence of the cutting and heat supply on the juice composition, the physico-chemical properties (pH, conductivity, dry solid, suspended matter and total nitrogen content) of the raw juice were firstly measured. Protein fractionation and HPLC SEC analysis were then carried out for juice samples free of suspended matter.

II.3.1. Biomass pre-treatment effect

As mentioned previously, the effect of physical structures of the biomass on the juice composition was investigated. Wall temperature was fixed at 50°C to produce green juice by TAMD process. Three cuttings were considered for spinach leaves: none, coarse and fine. Table II-4 summarises the physico-chemical properties of the juices extracted from spinach leaves under these conditions.

Table II-4. Characteristics of spinach juices produced from different degrees of leaf cutting with the TAMD process at 50°C

Temperature	50°C		
Cutting level	none	coarse	fine
pH	6.7	6.5	6.6
Conductivity (mS.cm⁻¹)	18.9	19.0	20.7
Dry solid (g. L⁻¹)	37.2	38.6	32.1
Suspended matter (g. L⁻¹)	2.33	1.45	1.3
Total nitrogen (mg.L⁻¹)	1960	2450	2730
Total nitrogen (g proteinsL⁻¹)	12.25	13.56	15.31
Green proteins (g.L⁻¹)	4.01	3.68	3.11
White proteins (g.L⁻¹)	5.41	7.28	9.6
Total fractionated proteins (g. L⁻¹)	9.44	10.96	12.71

For the three cutting levels of the spinach leaves, global physico-chemical parameters, such as pH, conductivity, dry matter and suspended matter, were similar for all samples. Cutting level has an influence on both the total nitrogen content, assumed as crude proteins content, and the white proteins content: crude and white proteins contents increased when spinach leaves are more finely cut. On the contrary, the cutting level does not change the green protein content.

This result can probably be explained by the localisation of the two kinds of proteins: white hydrophilic proteins are located in cells organist called stroma which are inside chloroplasts [Costes, 1981]. Thus, to extract this kind of proteins, cells must be disrupted as much as possible. Otherwise, green proteins constitute membrane proteins and do not need a mechanical extraction to be expressed from the leaf cells.

- HPLC SEC characterisation

According to the protocol described in section 2, suspended matter free juices produced by dehydration of spinach stems cut at different levels, were analysed by HPLC SEC. The chromatograms obtained are plotted in figure II-7 for samples at the three cutting levels.

No peak appeared for an elution volume around 8.75 mL indicating the absence of Rubisco in the juices produced under these operating conditions: whatever the cutting level, green juice produced at 50°C did not contain Rubisco in native form.

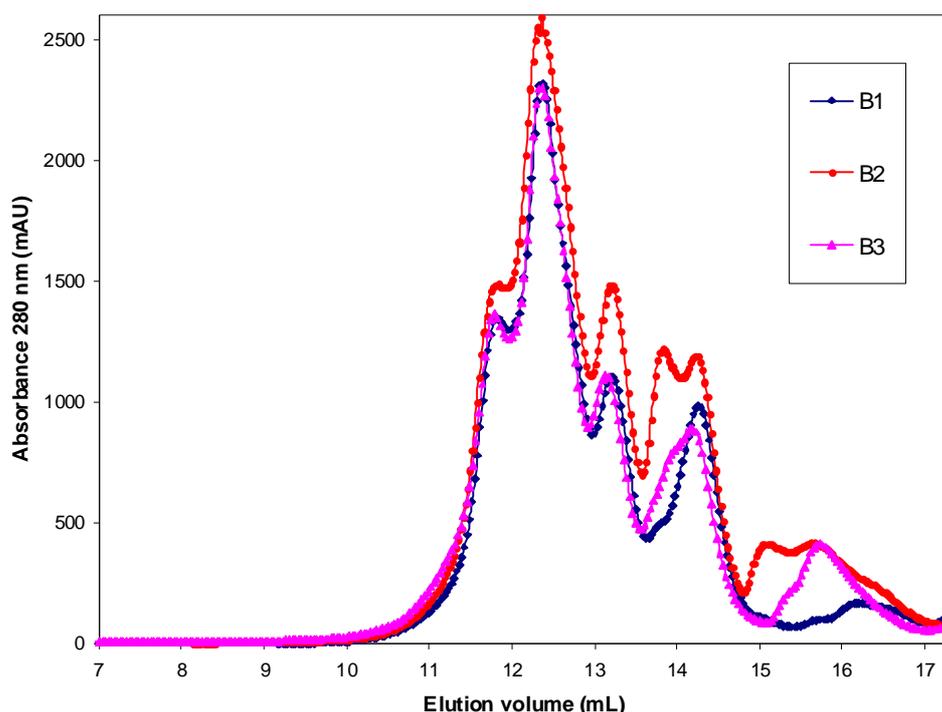


Figure II-7. HPLC SEC chromatograms of juice samples produced at 50°C from spinach leaves with three cutting levels: B1: none, B2: coarse and B3: fine.

II.3.2. Temperature effect

Juice samples produced at different temperatures with spinach leaves finely cut were then characterised. Table II-5 summarises global physico-chemical properties of green juice extracted with a wall temperature set to 30, 50, 70 and 90°C as is described by Arlabosse et al., (2010).

For all juice samples, global physico-chemical properties such as pH, suspended matter and conductivity were similar. Process parameters studied are of low influence on these global properties which does not seem appropriate to control the process.

Green hydrophobic proteins content was lower than white hydrophilic proteins content whatever the temperature wall. Green and white proteins in spinach leaves are usually reported to be present on equal proportions [Costes, 1981]. Costes, (1981) reported that for 1 g of fresh spinach leaves, there are 18.2 mg proteins: 9 mg are hydrophilic proteins which result from break-up of chloroplasts and from cytoplasm. The other 9.2 mg are hydrophobic proteins, mainly membranes proteins, which are generally separated from hydrophilic ones by sedimentation.

In this work, fractionation of proteins was carried out on juices free of solids. Therefore, the removal of the suspended matter, which contains a large proportion of hydrophobic proteins, could explain the present results. This could also explain the difference on the mass balance between fractionated proteins and crude proteins, since several membranes proteins are removed with suspended matter (cells debris).

Table II-5. Characteristics of spinach juice samples produced at different wall temperatures.

Cutting level	fine			
	30°C	50°C	70°C	90°C
Temperature				
pH	6.6	6.6	6.9	6.6
Conductivity (mS.cm⁻¹)	19.6	20.7	20.2	18.7
Dry solid (g. L⁻¹)	20.5	32.1	31.0	33.4
Suspended matter (g. L⁻¹)	2.2	1.3	1	2.4
Total nitrogen (mg.L⁻¹)	1890	2730	2380	1750
Total nitrogen (g proteins.L⁻¹)	11.81	15.31	12.87	10.93
Green proteins (g.L⁻¹)	1.96	3.11	3.52	2.02
White proteins (g.L⁻¹)	7.56	9.6	7.36	6.24
Total fractionated proteins (g. L⁻¹)	9.52	12.71	11.88	8.26

As expected, the operating temperature of the TAMD process has an influence on the crude protein content. Spinach juice produced at 50°C presents the maximal nitrogen, green protein and white protein contents. Gastinau and de Mathan, (1981) reported that green proteins, usually considered as chloroplastic proteins, precipitate between 55 and 65°C and that white proteins, considered as cytoplasmic proteins, precipitate at 85°C. Arlabosse et al., (2010) noticed that, when juice is produced at 50°C, the temperature of the bottom of the press cake reaches 50°C after 2 hours and half processing, while it reaches 66°C after 20 minutes when

processing at 70°C. This could explain why protein content is higher in juices produced at 50 than those produced at 70 and 90°C. In addition, heat could modify structure and conformation of proteins, which modifies their solubility properties and their behaviour [Libouga et al., 1996], or have an influence on the physical mechanisms involved on the juice production having an effect on the bio-molecule content.

- HPLC SEC characterisation

Chromatograms obtained by HPLC SEC analysis of spinach juice obtained with different wall temperatures are presented in figure II-8.

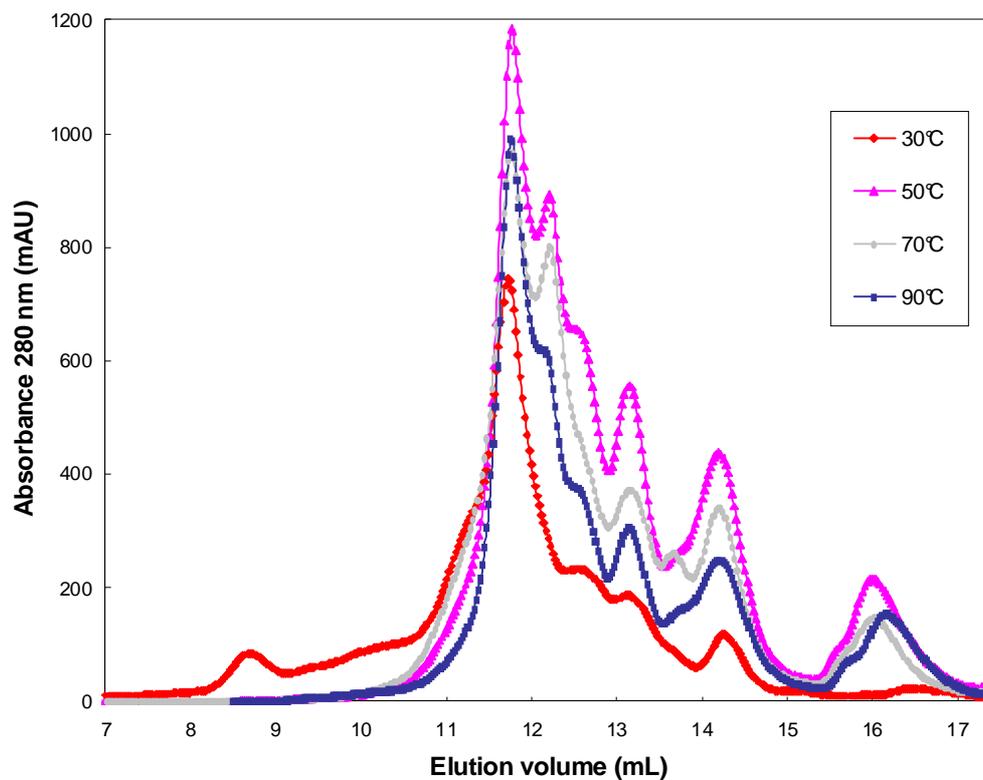


Figure II-8. HPLC SEC chromatograms obtained for spinach juice samples produced by the TAMD at different wall temperatures (30, 50, 70 and 90°C).

The chromatogram of the juice sample produced at 30°C showed two absorbance peaks, the first one at 8.75 mL, the second at 11.65 mL. The corresponding MWs of these peaks, determined thanks to the calibration curve of the HPLC SEC column (figure II-2), were respectively 560 and 6 kDa. This juice sample seems to contain Rubisco. Its concentration was estimated from equation 1, between 2.5 and 3 g/L, which represents more than 40% of white protein content. However, chromatograms of juice samples produced at higher

temperatures (50, 70 and 90°C) showed only the second peak with higher intensity and did not reveal the presence of Rubisco in the samples.

Finally, results obtained from nitrogen characterisation methods showed that physical structure of the biomass has an effect on the liquid fraction produced. Indeed, nitrogen content, green and white proteins contents are higher when leaves are finely cut. Nevertheless, at 50°C, the juice produced by the TAMD process does not contain Rubisco but an important amount of polypeptides and proteins. The developed HPLC SEC method seems to show that TAMD applied at 30°C allows Rubisco extraction.

- SDS-PAGE

To reinforce HPLC SEC results, TAMD juices produced at temperatures from 30°C to 90°C were loaded on SDS-PAGE. Figure II-9 represents the gel stained by Coomassie Brilliant Blue.

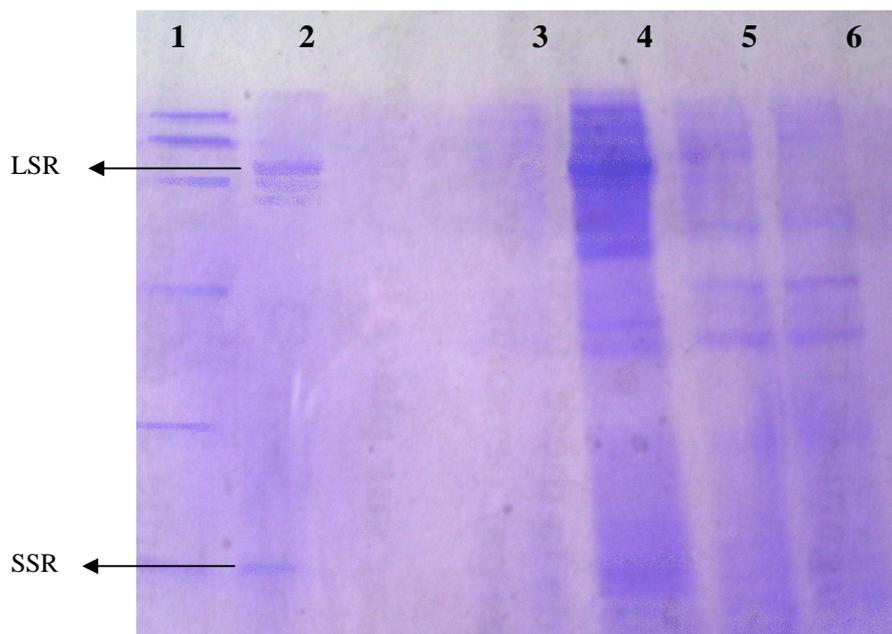


Figure II-9. Spinach juice proteins analysis on SDS-PAGE 15%. From right to left: lane 1 molecular weight marker, lane 2 spinach Rubisco migration, lane 3 spinach juice produced at 90°C, lane 4 spinach juice produced at 30°C, lane 5 spinach juice produced at 50°C, lane 6 spinach juice produced at 70°C. LSR: large subunit of Rubisco; SSR: small subunit of Rubisco.

As seen previously, migration of commercial spinach Rubisco on lane 2, revealed two bands making 58 and 14 kDa, corresponding respectively to MWs of the large and the small subunits of Rubisco.

Lanes 3, 5 and 6 corresponding to TAMD juices produced with a wall temperature of 90, 50 and 70°C do not reveal the bands at the same level of the Rubisco subunits. On the contrary, on lane 4 of the TAMD juice produced at 30°C, two bands corresponding to Rubisco subunits were detected in addition to other proteins, peptides and amino acids having low molecular weights. This result is coherent with HPLC SEC results.

II.4. Conclusion

A thermally assisted mechanical dewatering (TAMD) process was applied to spinach leaves. The process involves two simultaneous steps: (1) mechanical dewatering at low pressure and (2) heating. Thus, green crops are separated into a press cake and a green juice.

To control the TAMD process, by understanding physical mechanisms of the biomass dewatering, and to consider the most adapted valorisation way of the liquid fraction, a deep physico-chemical characterisation is necessary. Therefore, in addition to conventional global methods, specific characterisation methods must be developed.

Conventional global methods such as total nitrogen content determination and proteins fractionation were carried out. Results showed that the amount of total nitrogen and fractionated (hydrophobic and hydrophilic) proteins contents increase when crops are finely cut. In addition, they are maximal when the juice is produced at 50°C and decrease with increasing temperature. Otherwise, global characterization showed that pH, conductivity, suspended matter and dry matter do not depend on the operating conditions of the dewatering process. Juices produced at temperature higher than 70°C showed lower nitrogen content which is normally retained into the medium and allows the production of an enriched cake.

Since proteins are thermally sensitive material (and probably the most interesting valorisable biomolecules), their quality can be modified during juice production. To evaluate the effect of the process on proteins quality and quantity, an analytical method has been developed based on the principles of size exclusion chromatography. The method enables detection and quantification of a specific protein of interest, Rubisco. Results showed that Rubisco was only present in the juice produced at 30°C, even if total nitrogen content and fractionated proteins are maximal at 50°C. Therefore, it can be concluded that juice production with an important amount of polypeptides and proteins is possible when dewatering is operated at 50°C,

whereas Rubisco is extracted when operating at 30°C. The HPLC SEC method developed in this study allowed the control of the dewatering process according to the valorisation path that would be considered.

Acknowledgements

This research was supported in part French National Research Agency (ANR), in the frame of CP2D program (PRODULUZ project n° ANR-07-CP2D-16-02).

III. Bilan général

Le procédé de déshydratation mécanique assistée thermiquement (DMAT) est utilisé pour déshydrater les feuilles d'épinards [Arlabosse et al., 2010]. L'influence de deux conditions opératoires sur la composition du jus produit est étudiée. La température appliquée au niveau du piston de la presse est fixée à des valeurs de 30 à 90°C. Le prétraitement de la biomasse végétale est réalisé par découpage, avec trois niveaux de découpage testés : feuilles d'épinard non découpées, feuilles grossièrement coupées et feuilles finement coupées. Les jus produits dans chaque cas font l'objet d'analyses globales et plus spécifiques afin de visualiser l'effet des conditions opératoires sur la teneur en protéines totales, sur la fraction protéique hydrophile et la fraction protéique hydrophobe. Enfin la présence de Rubisco dans le jus et sa quantification sont également vérifiées par une méthode analytique mise au point.

Pour déterminer la teneur en protéines totales, la mesure de la teneur en azote total dans les jus produits est effectuée par la méthode Kjeldahl (K-425 et K-350, Büchi). Une fois l'analyse effectuée, la teneur en azote total peut être transformée en teneur en protéines (en faisant l'hypothèse que l'azote se trouve dans le jus très majoritairement sous forme organique) en multipliant la valeur obtenue par un facteur 6,25 [Kapel et al., 2006, Incamps et al., 2005, Lusueur-Lambert et al., 2003].

Dans un deuxième temps les protéines hydrophiles et hydrophobes sont séparées par précipitation au sulfate d'ammonium. En effet, à l'échelle laboratoire, la séparation de ces deux groupes de protéines est souvent réalisée par une étape de précipitation. Bahr et al., (1977) ont montré que la saturation à 30% de sulfate d'ammonium permet de faire précipiter les protéines hydrophobes tandis que les hydrophiles restent en solution. Pour faire précipiter cette dernière fraction il faut donc augmenter le pourcentage de saturation en sel à 55% [Hall et al., 1981]. Dans notre cas, avant de fractionner les protéines hydrophiles et hydrophobes, les jus produits ont d'abord subi une étape de centrifugation préalable afin d'éliminer les solides présents (10 minutes à 5000g), puis ils sont saturés à 27% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Une centrifugation pendant 15 minutes à 5000g permet de recueillir un culot de protéines hydrophobes qui sera lavé et séché à 105°C puis pesé. Le surnageant est lui amené à 55% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pour récupérer les protéines hydrophiles. Après centrifugation, le culot est également lavé, séché à 105°C et pesé.

D'autres paramètres physico-chimiques tels que le pH, la conductivité, le pourcentage en matière sèche et en matière en suspension sont également mesurés pour les différents jus.

Une analyse, par chromatographie d'exclusion de taille (HPLC SEC), qualitative et quantitative de la Rubisco est mise au point dans ce travail. La première étape de la mise au point de cette méthode consiste à réaliser une calibration de la colonne chromatographique (Protein KW-804, Shodex) avec des marqueurs de poids moléculaires afin de corrélérer le volume auquel est éluée chaque protéine de la colonne en fonction de son poids moléculaire. Dans un deuxième temps, la Rubisco d'épinard partiellement purifiée est analysée par HPLC SEC et les différents pics élués sont collectés et analysés par électrophorèse en conditions dénaturantes pour visualiser les sous unités de la Rubisco. Le couplage des deux méthodes permet alors d'identifier le pic d'éluion de la Rubisco aussi bien dans la préparation commerciale que dans le jus produit par DMAT.

Pour une détermination de la concentration de la Rubisco en solution, plusieurs solutions de Rubisco de concentrations allant de 0.1 à 2 g.L⁻¹ sont alors analysées par HPLC SEC et l'aire du pic spécifique à la Rubisco est déterminée pour chaque concentration. Ainsi l'établissement de la droite d'étalonnage (Equation II-1) permet alors de remonter à la concentration en Rubisco C à partir de l'aire du pic A.

$$C = 53 \times 10^{-3} \times A$$

Equation II-1

L'application de ces différentes méthodes aux jus produits par DMAT fait l'objet de la deuxième partie de l'étude. Les résultats montrent que les jus obtenus par déshydratation à 50°C avec des feuilles pas du tout découpées, grossièrement ou finement découpées présentent des caractéristiques physico-chimiques similaires. En revanche, la teneur en azote total (protéines brutes) et en protéines hydrophiles est plus élevée quand les feuilles sont finement découpées avant leur déshydratation. Par ailleurs, le découpage des feuilles n'a pas montré d'effet notable sur la concentration en protéines hydrophobes du jus produit. Malgré la teneur en protéines hydrophiles élevée dans ces jus produits à 50°C avec des feuilles finement prédécoupées, les méthodes analytiques spécifiques à la Rubisco démontrent l'absence de la forme native de la protéine dans le jus.

Le procédé DMAT a ensuite été appliqué à différentes températures (30, 50, 70 et 90°C) pour la déshydratation des feuilles d'épinard prédécoupées finement. Les résultats ont montré que le jus produit à 50°C présente les concentrations les plus élevées en protéines brutes et en protéines hydrophiles et que celles-ci diminuent quand la température augmente. Néanmoins, l'analyse HPLC SEC et l'analyse par électrophorèse en condition dénaturantes permettent de d'identifier la Rubisco seulement dans le jus produit à 30°C.

IV. Conclusion générale

Les milieux biologiques utilisés dans ce travail ont été caractérisés par des paramètres globaux comme le pH, la conductivité ou la teneur totale en azote, protéines hydrophiles et hydrophobes, selon des protocoles développés dans la littérature.

L'identification et le suivi des molécules spécifiques dans ces milieux nécessite, cependant, la mise au point des méthodes analytiques spécifiques basées sur des propriétés nettement différenciatrices. Dans le cadre de ce travail, une méthode d'analyse qualitative et quantitative par HPLC d'exclusion de taille a été mise au point pour le suivi de la protéine d'intérêt dans les milieux réels objet de l'étude.

Pour cela, une Rubisco commerciale (issue des épinards) a été utilisée. Bien que l'origine des deux molécules soit différente, la propriété physique à la base de la séparation, la taille, est équivalente dans les deux molécules. La méthode HPLC SEC ainsi développée a été utilisée à l'échelle préparative, ce qui a permis de disposer d'un échantillon de Rubisco de luzerne en quantité suffisante pour la validation de la méthode.

L'électrophorèse en conditions dénaturantes a été utilisée lors de la mise au point de la méthode d'analyse afin de vérifier la présence dans les échantillons de deux sous-unités constitutives de la Rubisco (et donc représentatives de sa présence).

Une fois la méthode analytique mise au point, et afin de tester sa capacité de réponse, elle a été appliquée à des jus d'épinards obtenus sous des conditions opératoires différentes afin de vérifier la présence de la Rubisco et de mesurer sa concentration. Ces résultats ont permis, par exemple, de comprendre l'effet que peut avoir le prétraitement de la biomasse végétale (en particulier le découpage) et la température appliquée lors de la déshydratation sur les propriétés des jus produits, notamment leur teneur en Rubisco. Ainsi, les concentrations en Rubisco déterminées par la méthode développée se sont avérées cohérentes avec les données de la littérature.

CHAPITRE III.
PROCEDE DE SEPARATION DE
LA RUBISCO

Sommaire

I. Introduction	105
II. Matériel et méthodes	107
II.1. Matériel	107
II.1.1. Supports chromatographiques	107
II.1.2. Jus vert	108
II.2. Analyse qualitative et quantitative de la Rubisco dans le jus	110
III. Essais préliminaires de rétention de Rubisco sur le support	111
III.1. Protocole expérimental	112
III.2. Résultats	112
IV. Etude de la rétention de Rubisco par échange d'ions	114
IV.1. Colonnes de chromatographie d'échange d'ions	114
IV.1.1. Colonne en lit fixe	114
IV.1.2. Colonne en lit expansé	115
IV.2. Protocole expérimental	115
IV.3. Comportement hydrodynamique des colonnes	116
IV.3.1. Protocole expérimental	116
IV.3.2. Ecoulement dans la colonne en lit fixe	117
IV.3.3. Ecoulement dans la colonne en lit expansé	118
IV.4. Courbes de percée	119
IV.4.1. Principe	119
IV.4.2. Profil de la courbe	120
IV.4.3. Capacité dynamique à 10%	121
IV.5. Rétention de Rubisco à partir des jus reconstitués centrifugés	121
IV.5.1. Courbes de percée expérimentales	122

<i>IV.5.1.1 Colonne en lit fixe</i>	123
<i>IV.5.1.2 Colonne en lit expansé</i>	127
IV.5.2. Evaluation de la capacité dynamique	128
IV.6. Elution	131
IV.6.1. Conditions d'élution dans la colonne en lit fixe	131
IV.6.2. Conditions d'élution dans la colonne en lit expansé	131
IV.6.3. Analyse quantitative	132
<i>IV.6.3.1 Colonne en lit fixe</i>	132
<i>IV.6.3.2 Colonne en lit expansé</i>	134
IV.6.4. Analyse qualitative	137
<i>IV.6.4.1 Colonne en lit fixe</i>	137
<i>IV.6.4.2 Colonne en lit expansé</i>	138
V. Conclusion	140

I. Introduction

Les bioprocédés reposent sur la transformation durable de ressources naturelles. Les questions environnementales et économiques sont ainsi des facteurs clés de l'amélioration de ces procédés. Par conséquent, le développement des bioprocédés est confronté à des défis et des verrous à relever surtout au niveau de la purification du produit d'intérêt qui est une étape cruciale à impact économique important et qui nécessite des efforts et des innovations technologiques. Le développement de procédés de séparation efficaces, économiques et sélectifs est nécessaire pour une commercialisation réussie des bioprocédés.

La séparation sélective à partir des mélanges biologiques complexes devient une priorité pour réduire le recours aux coûteuses méthodes de séparation thermique ou mécanique [Roush et Lu, 2008]. En raison de la complexité et de la charge élevée de la matière première biologique, il est souvent nécessaire de multiplier ces étapes. De plus, l'ampleur et le type de l'étape de séparation primaire peut affecter les performances des étapes ultérieures [Bracewell et al., 2008]. Le nombre d'opérations et le type de procédé de purification appliqués dépendent non seulement des propriétés du composé d'intérêt mais aussi des propriétés des « impuretés » présentes dans le milieu.

La chromatographie en lit expansé (CLE) présente une alternative, aux procédés de bio-séparation conventionnels, permettant de réduire considérablement le nombre d'opérations de purification par la capture des molécules d'intérêt à partir de milieux chargés en solides en suspension [Chase, 1994]. Plusieurs applications de la CLE ont été réalisées sur des extraits de fermentation et des extraits de cellules animales.

Des études relativement récentes s'intéressent à l'application de la CLE aux extraits végétaux.

Les principales préoccupations communes à ces travaux concernent [Bai et Glatz 2003b]:

- La compatibilité de la taille des particules et de la teneur en solides des extraits de plantes avec la stabilité du lit expansé,
- L'hydrodynamique dans la colonne,
- La capacité dynamique d'adsorption du support utilisé,
- La concurrence qu'il peut y avoir entre la molécule d'intérêt et les autres composants présents dans le milieu dont les solides en suspension.

En effet les extraits végétaux sont caractérisés par une large gamme de taille des particules (10^{-4} à 1 mm) ainsi que des teneurs en solides élevées (allant de 9 à 20%) par rapport aux extraits de cellules microbiennes ou de mammifères. D'ailleurs, plusieurs travaux [Bertrand et al., 1998 ; Straetkvern et al., 1999, Bai et Glatz, 2003b] ont mis en évidence quelques problèmes comme l'obstruction du maillage qui sert de support pour le lit et qui permet la distribution du liquide à l'entrée de la colonne. Krau et al., (1996) ont montré que l'application d'extrait fortement chargés en solides ($> 8\%$) perturbe le lit expansé et peut même engendrer son effondrement, en plus du colmatage du distributeur de liquide et du maillage qui retient le support par les grosses particules (dans le cas des colonnes Streamline 50 et 25).

Par conséquent, un prétraitement de l'extrait avant son application au lit expansé est souvent mis en place. Les extraits de plantes ont été soit filtrés à travers Miracloth (22-25 μm) [Bertrand et al., 1998] ou centrifugés [Straetkvern et al., 1999 ; Bai et Glatz 2003b] ou encore alimentés latéralement pour contourner le maillage. Dans ce cas la distribution du liquide se fait par agitation à l'aide d'un barreau aimanté ce qui éloigne l'écoulement dans la colonne du modèle de l'écoulement piston et réduit ainsi les performances de séparation. D'autre part, plusieurs travaux ont confirmé que la conductivité des extraits bruts affecte significativement l'équilibre d'adsorption en réduisant la capacité de rétention d'un échangeur d'ions [Thömmes et al., 2001 ; Sandgathe et al., 2003 ; Vergnault 2004]. La dilution des extraits de forte conductivité peut ainsi être nécessaire.

Ce chapitre a pour objectif l'étude d'un procédé de chromatographie d'échange d'ions en lit expansé à l'échelle du laboratoire pour la séparation de la Rubisco à partir du jus vert de luzerne. Le support chromatographique utilisé à cette fin est un échangeur d'ions adapté au lit expansé, de type Hyper Z. Le jus utilisé est un jus de luzerne, issu de la déshydratation industrielle de la plante, qui a été séché par atomisation, dans le but d'une meilleure conservation. Les caractéristiques de ce jus sont présentées au tout début de ce chapitre, ensuite, les interactions jus-support échangeur d'ions sont étudiées avant la mise au point de la séparation proprement dite en colonne.

Pour aborder cette étude, nous avons choisi, dans un premier temps, d'étudier le procédé de séparation par chromatographie d'échange d'ions dans une petite colonne en lit fixe. Pour cela, des expériences de charge ont été réalisées avec des jus à différentes dilutions, afin de déterminer les courbes de percée de la protéine. L'objectif de ce travail a été multiple : étudier

l'influence de la composition du jus sur les courbes de percée afin de comprendre la base des mécanismes de rétention, disposer d'une référence pour les essais en lit expansé, identifier les conditions optimales d'élution et de régénération... Il s'agissait par ailleurs de répondre au besoin pratique d'utiliser des volumes faibles de jus car la protéine objet de cette étude n'est pas disponible commercialement. La seule Rubisco partiellement pure commercialisée est issue d'épinard et elle possède des caractéristiques très différentes, notamment en ce qui concerne le point isoélectrique qui est un critère primordial dans la chromatographie d'échange d'ions. En outre, le fonctionnement du lit expansé est considéré comme permettant des capacités de production importantes, car la porosité élevée du lit réduit les pertes de charge et la mise en suspension des particules de masse volumique élevée requiert des vitesses d'écoulement élevées.

Dans un deuxième temps, la séparation de la Rubisco a été étudiée en lit expansé. Les étapes de charge et d'élution dans les deux types de colonnes ont permis de faire des bilans sur la Rubisco et de comparer les performances de séparation dans chaque cas. L'analyse HPLC SEC a permis de vérifier la pureté des produits obtenus.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Supports chromatographiques

Les supports échangeurs d'ions doivent répondre aux critères d'application au lit expansé à savoir : une densité élevée et une distribution de taille des particules spécifique. Les supports Hyper Z (PALL BioSeptra, France) utilisés dans ce travail sont constitués d'oxyde de zirconium poreux dont les pores sont remplis d'un polymère d'acrylate. La densité moyenne des particules est de $3,2 \text{ g.cm}^{-3}$ et la distribution de taille des particules varie de 40 à 105 μm , avec un diamètre moyen de 75 μm , ce qui permet de travailler à des vitesses superficielles supérieures à 500 cm.h^{-1} et offre simultanément une surface totale d'échange plus élevée que d'autres échangeurs pour lit expansé [Cabanne et al., 2004].

Les deux formes de support Q Hyper Z et CM Hyper Z sont des supports échangeurs d'ions qui diffèrent par leurs groupements fonctionnels. Q Hyper Z est une résine anionique forte portant des groupements ammonium quaternaire et CM Hyper Z est une résine cationique faible qui porte des groupements carboxyméthyle. Le tableau III-1 recense les principales caractéristiques de ces échangeurs, d'après le fabricant.

Tableau III-1. Caractéristiques des échangeurs HyperZ® (d'après Pall Corporation, page internet vérifiée le 4/02/2011 : http://www.pall.com/biopharm_35755.asp)

	Q HyperZ	CM HyperZ
Average particle size (µm)	75	75
Nature of ionic groups	Quaternary amine (Q)	Carboxymethyl (CM)
Ionic capacity (µeq/mL)	100 - 180	100 - 180
Particle size distribution	40 - 105	40 - 105
Mean particle density	3.2 g/mL	3.2 g/mL
Binding capacity (mg/ml)	80 (BSA)	~ 50 (hu IgGs)
Degree of expansion (H/H0)	2 at 300 cm/h	2 at 300 cm/h
Chemical stability	Stable in all commonly used aqueous buffers and also 2M NaOH, 1 M HCl, 20 % ethanol, 6 M guanidine-HCl	
Working pH range	4 - 13	4 - 13
Cleaning pH	1 - 14	1 - 14
Packaging	Dry form (2 g ~ 1 mL)	Dry form (2 g ~ 1 mL)

Avant leur utilisation, les résines sont hydratées et équilibrées de façon à assurer la même forme chimique pour tous les groupements disponibles, en les agitant avec une solution tampon phosphate (100 mM) au même pH que le jus (pH 5,9) pendant environ une heure.

II.1.2. Jus vert

En France, la production du jus vert de luzerne n'est pas assurée toute l'année car la saison de récolte s'étale de Mai à Octobre. La qualité de la plante (teneur en eau, en protéines...) varie beaucoup en fonction de la période de la coupe d'une part, d'autre part, la congélation de la plante provoque une dégradation de sa qualité. Par conséquent, pour assurer l'approvisionnement en jus d'une qualité constante pour ce travail, un jus de luzerne déshydraté (sous forme de poudre à 96,4% de matière sèche) a été utilisé. Il a été fourni par Luzerne R&D (ARD, France).

Le jus de luzerne (appelé par la suite *jus frais*) est la fraction liquide issue de la déshydratation industrielle de la luzerne, contenant environ 10% de matière sèche. Ce jus est séché afin d'être conservé sous forme d'une poudre (jus de luzerne déshydraté). Une première étape de

concentration sous vide à 32°C permet d’obtenir un jus à 24% de matière sèche, qui est séché ensuite par pulvérisation. La température de l’air est de 180°C à l’entrée du séchoir, et de 95°C à la sortie.

Pour la réalisation de ce travail, le jus déshydraté est reconstitué par dilution de la poudre dans l’eau ultra-pure, dans des proportions permettant de reproduire les propriétés du jus initial, soit 10% de matière sèche (appelé par la suite *jus reconstitué*). Bien que le lit expansé soit préconisé pour le travail avec des solutions chargées en solides, le jus reconstitué a été ensuite centrifugé 10 min à 5000g pour éliminer les gros débris (appelé par la suite *jus reconstitué centrifugé*), afin d’éviter le colmatage des colonnes chromatographiques utilisées en lit fixé, et le distributeur des colonnes en lit expansé.

Les caractéristiques physico-chimiques du jus reconstitué et du jus reconstitué centrifugé sont par la suite comparées à celles du jus frais. Le tableau III-2 présente l’ensemble des résultats des analyses réalisées sur les trois jus. Les méthodes d’analyse sont celles décrites dans le chapitre II.

Tableau III-2. Caractéristiques physico-chimiques de différents jus verts de luzerne d’origine industrielle.

	Jus de luzerne industriels		
	Jus frais	Jus reconstitué	Jus reconstitué centrifugé
pH	5,9	5,8	5,8
Conductivité (mS/cm)	20,10	16,92	16,96
Matière Sèche (%)	10,1	10,0	8,1
Masse volumique (kg/m³)	1049	1056	1042
Viscosité (Pa.s)	0,003	0,003	0,002
Azote total (g protéines/L)	32,55	29,51	19,43
Protéines hydrophobes (g/L)	15,22	11,80	1,84
Protéines hydrophiles (g/L)	17,32	17,16	16,92

En comparant le jus reconstitué au jus frais, il peut être constaté que les propriétés physico-chimiques globales du jus sont maintenues après son séchage puisqu’on retrouve des valeurs proches en ce qui concerne le pH, la conductivité, la masse volumique, la viscosité et la teneur total en azote dans le jus brut. La teneur en protéines blanches et vertes des jus bruts est aussi

similaire, les différences pouvant être attribuées probablement aux différences naturelles entre les échantillons.

Après centrifugation, la teneur en azote organique total (exprimée en grammes de protéines par litre) du jus est sensiblement inférieure à celles des jus frais et reconstitué. Ce résultat est lié à la localisation des protéines dans la plante : les protéines vertes sont des protéines membranaires et elles se retrouvent associées aux débris cellulaires en grande proportion. Elles sont donc éliminées avec les solides lors de la centrifugation. Par contre, les protéines blanches vont être libérées dans le jus par éclatement des cellules végétales lors du procédé de déshydratation mécanique de la luzerne et restent en solution après la centrifugation. De ce fait, dans les trois jus la teneur en protéines blanches est similaire, alors que celle des protéines vertes est plus faible dans le jus centrifugé. Ceci a également été observé dans le cadre de l'étude menée sur les jus d'épinards, présentée dans le chapitre II.

Par ailleurs, les paramètres tels que le pH et la conductivité (relativement élevée) sont à prendre en compte dans le cadre de la séparation de la Rubisco par échange d'ions. En effet, ils conditionnent la charge de la protéine dans le jus ainsi que la compétition qui peut avoir lieu entre d'autres molécules chargées et la Rubisco pour la fixation sur le support échangeur. Compte tenu de la préservation de la teneur en protéines blanches et de la plupart des caractéristiques physico-chimiques, le jus reconstitué centrifugé est retenu pour toute la suite de ce travail.

II.2. Analyse qualitative et quantitative de la Rubisco dans le jus

L'analyse HPLC SEC d'un échantillon de jus de luzerne reconstitué et centrifugé permet de détecter la présence de la Rubisco et de la quantifier suivant la méthode décrite dans le chapitre II. Le chromatogramme obtenu par analyse d'un échantillon de jus dilué 10 fois est représenté dans la figure 1. Selon la courbe de calibration de la colonne (cf Chapitre II, figure II-2.), le pic d'absorbance à 280 nm qui apparaît au volume d'éluion égal à 8,72 mL correspond à l'éluion d'une molécule de poids moléculaire proche de 570 kDa, et ainsi à l'éluion de la Rubisco de la colonne (figure III-1a).

D'autres composés (phénols, protéines, peptides...) de poids moléculaire plus faible sont élués plus tard, à des volumes d'éluion allant de 10,2 jusqu'à plus de 14 mL. Le poids moléculaire de ces composés est inférieur à 60 kDa. La détermination exacte de leur taille nécessite une colonne chromatographique qui couvre une gamme de poids moléculaires beaucoup plus faible.

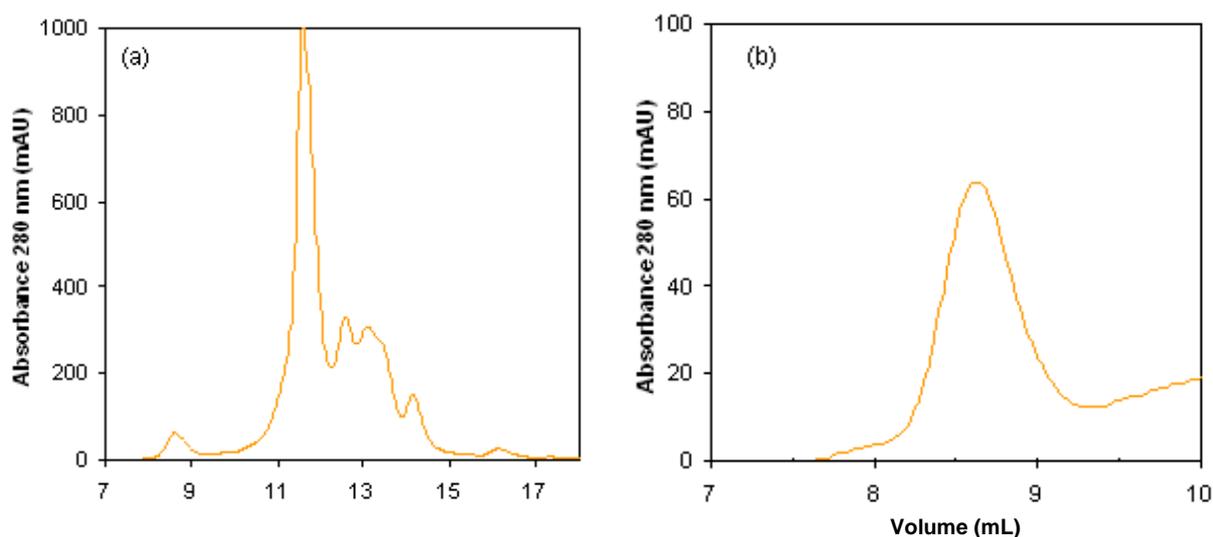


Figure III-1. Chromatogramme obtenu par analyse HPLC SEC d'un échantillon de jus de luzerne reconstitué centrifugé et dilué 10 fois. Volume injecté 0,1 mL, éluion au tampon phosphate à 1 mL/min. (a) chromatogramme entier, (b) pic de la Rubisco.

Dans un deuxième temps l'aire du pic correspondant à la Rubisco permet la détermination de sa concentration à $\pm 10\%$ (cf Chapitre II). Plusieurs injections du jus à différentes dilutions ont ainsi permis de déterminer une concentration de $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ de Rubisco ($\pm 10\%$) soit près de 73% de la concentration des protéines hydrophiles.

III. Essais préliminaires de rétention de Rubisco sur le support

Devant les divergences des données sur le point isoélectrique de la Rubisco de luzerne dans la littérature (entre 4,9 et 6) [Songrilay Kongphet, 1990, Antonov et Shoshinsky, 2000], il est difficile de conclure quant à sa charge globale au pH du jus c'est-à-dire à pH 5,8.

Pour mettre en évidence les interactions qui peuvent avoir lieu entre les supports échangeurs d'ions (cationique et anionique) et la Rubisco dans le jus de luzerne dans les conditions expérimentales, un test en batch, suivi d'une analyse qualitative des différentes phases (solide et liquide) est réalisé.

III.1. Protocole expérimental

Pour réaliser les tests en batch, les deux types de résines CM et Q Hyper Z sont équilibrées dans le tampon phosphate 100 mM pH 5,8 pendant une heure, puis filtrées à l'aide d'un Büchner équipé d'un filtre de 0,45 μm et d'une pompe à vide pour évacuer un maximum de tampon. Vu que ces tests ont pour seul objectif d'étudier qualitativement les interactions de la Rubisco de luzerne avec le support, la masse utilisée pour chaque résine n'est pas particulièrement suivie. Ainsi, environ 15 g de chaque résine équilibrée sont mis en contact avec un volume de 50 ml de jus reconstitué.

Les deux flacons sont agités par la suite sur une table tournante pendant 4 heures, puis les phases liquide et solide sont séparées. Ces dernières sont lavées plusieurs fois à l'eau ultra-pure et sont mises en contact avec 50 mL d'une solution de NaCl à 1 mol.L⁻¹. Au bout de 2 heures, les phases liquides, appelées éluats, sont séparées et les résines sont alors filtrées et lavées.

Pour identifier la présence de la Rubisco dans l'une ou l'autre des deux phases (liquide et/ou solide), des analyses par SDS-PAGE sont réalisées. Les échantillons déposés sur le gel sont : les résines CM Hyper Z et Q Hyper Z après contact avec le jus, le jus après contact avec les deux types de résine, les éluats obtenus pour les deux résines et les supports CM et Q Hyper Z après élution. Des observations des échantillons (Annexe 1) illustrent déjà qualitativement les interactions du jus avec la résine Q Hyper Z.

III.2. Résultats

La figure III-2 présente les résultats de l'analyse électrophorétique des phases liquides et solides aux différentes étapes. La migration des marqueurs de poids moléculaires sur la voie G permet d'identifier les deux sous-unités de la Rubisco.

Les voies F et E représentent respectivement la migration des résines CM Hyper Z et Q Hyper Z après contact avec le jus. La comparaison des bandes révélées sur ces voies montre que la Rubisco s'est fixée uniquement sur la résine anionique Q Hyper Z. En effet les bandes correspondantes aux poids moléculaires des deux sous-unités qui constituent la Rubisco ne sont détectées que sur le profil de migration de la résine Q Hyper Z.

Ce résultat est confirmé par le profil de migration du jus après contact avec les résines : les bandes LS (grosse sous unité) et SS (petite sous unité) sont moins intenses dans le cas du jus ayant été en contact de Q Hyper Z (voie C), puisqu'une grande partie de la Rubisco initialement dans le jus s'est retrouvée sur la phase solide.

Enfin, la voie A correspondant à la migration de la fraction éluee à partir de Q Hyper Z révèle deux bandes LS et SS. Ainsi, l'élution par l'effet de la force ionique en utilisant une solution de NaCl semble permettre de décrocher la Rubisco qui s'est fixée à la résine échangeuse d'anions. L'analyse de la fraction éluee à partir de la résine CM Hyper Z ne montre aucune bande (voie B) puisque la résine n'a rien fixé.

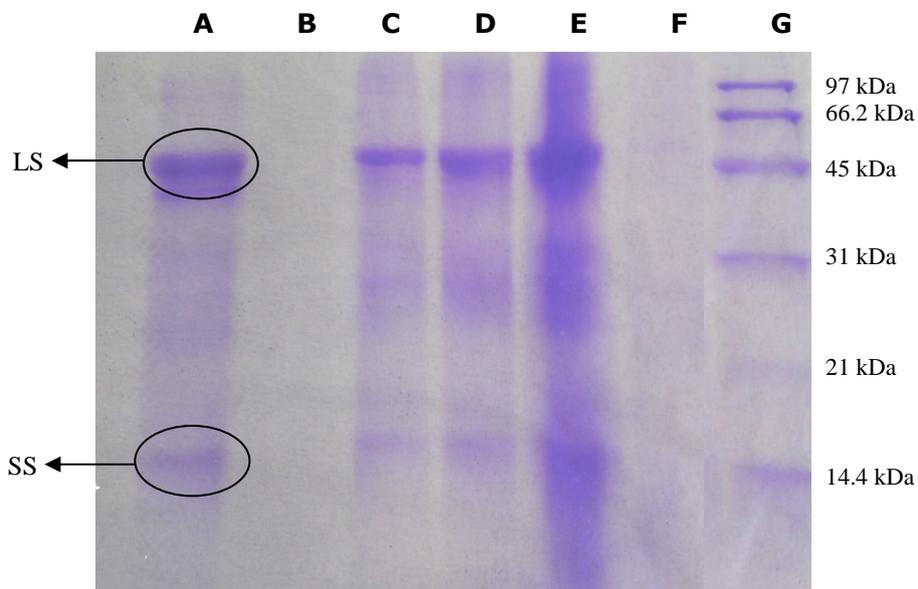


Figure III-2. Analyse par SDS-PAGE 15% des supports Hyper Z et des échantillons du jus après contact des supports. Voie G : marqueurs de poids moléculaire, F : CM Hyper Z après 4 heures de contact avec le jus de luzerne, E Q Hyper Z après 4 heures de contact avec le jus de luzerne, D : jus de luzerne après 4 heures de contact avec CM Hyper Z, C : jus de luzerne après 4 heures de contact avec Q Hyper Z, B : éluat du support CM Hyper Z et A : éluat du support Q Hyper Z.

Ces résultats montrent clairement que la Rubisco dans les conditions expérimentales testées se fixe sur la résine échangeuse d'anions ce qui implique que celle-ci présente plus de charges négatives que positives au pH du jus, du moins pour les charges accessibles. Le point isoélectrique de la Rubisco de luzerne étant estimé à 6,0 par Douillard et Songrilay Kongphet (1990) et à 4,9 par Antonov et Shoshinsky (2000), à pH 5,8 du jus la Rubisco se trouverait dans les deux cas assez proche de son point isoélectrique. Néanmoins, la composition et la structure (secondaire, tertiaire et quaternaire) de la Rubisco induisent une certaine distribution

de charges. Ainsi les zones concentrées en groupements chargés négativement vont intervenir pour la fixation de la protéine sur le support anionique [Fargues, 1993].

IV. Etude de la rétention de Rubisco par échange d'ions

La séparation de la Rubisco par chromatographie d'échange d'ions, a donc été réalisée sur le support Q Hyper Z avec deux modes de contact différents, en lit fixe, et en lit expansé. Dans les deux cas, l'étude est effectuée avec le jus reconstitué centrifugé. Afin d'analyser l'influence de la concentration en protéine sur l'échange, le jus est dilué. Cela implique par ailleurs des changements dans la force ionique lors de différents essais, qui vont rendre bien évidemment difficile l'établissement des conclusions générales.

IV.1. Colonnes de chromatographie d'échange d'ions

Le dispositif expérimental utilisé dans les expériences de séparation de Rubisco par échange d'ions est globalement constitué d'une pompe d'alimentation, de la colonne chromatographique, suivie d'un spectrophotomètre et d'un collecteur de fractions. La figure III-3 représente l'équipement expérimental utilisé.

La mesure de l'absorbance à 280 nm a été réalisée afin d'avoir une indication sur l'avancement de l'expérience notamment par comparaison de l'absorbance initiale du jus à l'absorbance finale en sortie de colonne. Ces données ne sont pas exploitables pour la détermination directe de la concentration de la Rubisco en solution vu le grand nombre de composés présents dans le jus et qui absorbent sur une large gamme de longueurs d'onde (comme par exemple polyphénols). Le suivi de la concentration de Rubisco est donc réalisé par analyse des différentes fractions collectées par HPLC SEC.

IV.1.1. Colonne en lit fixe

La colonne utilisée est une colonne en verre de diamètre interne de 14 mm et de 100 mm de longueur. La hauteur du lit sédimenté H_0 dans cette colonne est fixée à 3 cm. La porosité du lit sédimenté est estimée à 0,4. L'alimentation en jus est réalisée en flux ascendant à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit volumique de $2,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, soit une vitesse superficielle de $1,7 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$. Dans ces conditions aucune expansion du lit n'est constatée, la hauteur H_0 est maintenue fixe pendant toute la durée de l'expérience.

IV.1.2. Colonne en lit expansé

La colonne utilisée pour le travail en lit expansé est une colonne de type Streamline (Amersham Biosciences), de diamètre interne 25 mm (Streamline 25). Cette colonne est équipée d'un distributeur inférieur, et d'un adaptateur supérieur mobile réglable manuellement afin de contrôler la hauteur maximale du lit. La hauteur du lit sédimenté H_0 est fixée à 10 cm, considéré par les auteurs comme le minimum permettant d'avoir un lit stable avec une faible dispersion axiale [Hjorth et al., 1995]. Le flux est ascendant et la vitesse superficielle du jus appliquée est de $5,3 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$, déterminée afin que la hauteur du lit expansé stabilisé H soit égale à 21 cm, assurant ainsi un taux d'expansion légèrement supérieur à 2.

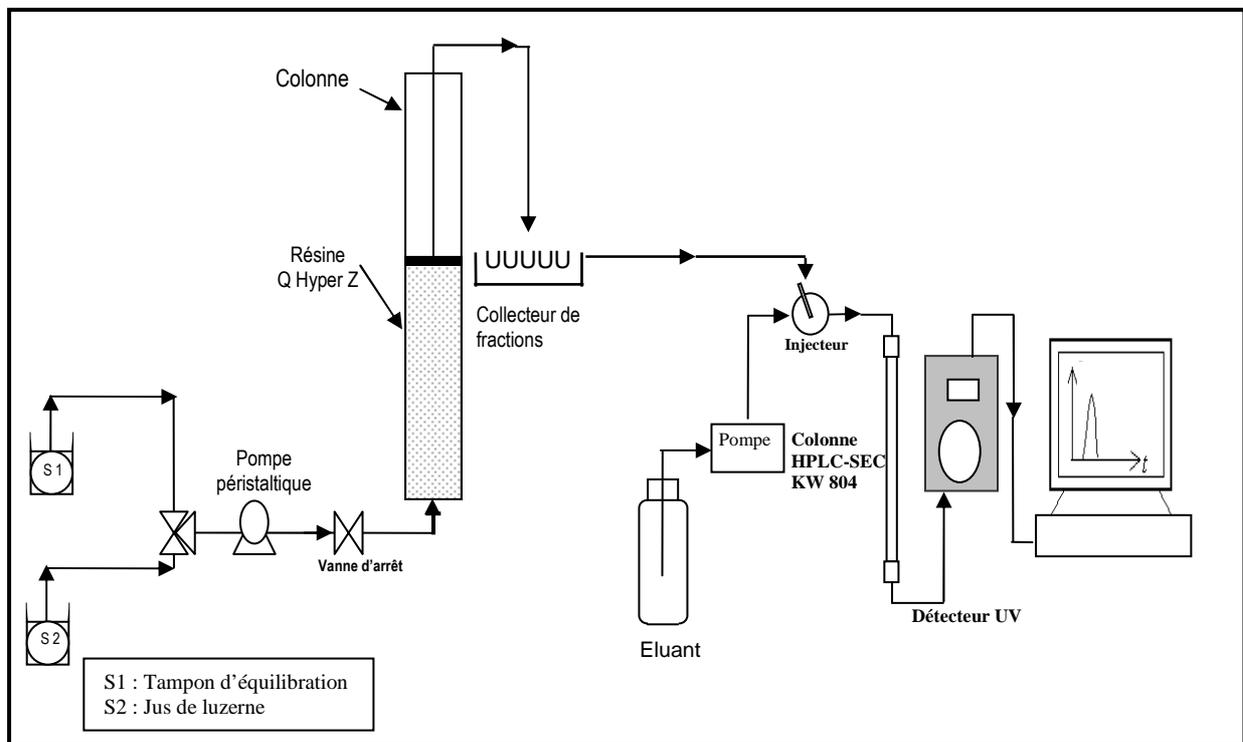


Figure III-3. Schéma général du dispositif expérimental pour l'étude de la rétention de Rubisco par échange d'ions.

IV.2. Protocole expérimental

Afin de préparer une colonne, la résine est d'abord pesée et introduite sèche. L'équilibration se fait par alimentation de la colonne en tampon phosphate pendant une heure. Avant chaque

expérimentation, la verticalité de la colonne est vérifiée et le débit est mesuré manuellement en sortie de colonne.

La charge est réalisée avec un jus reconstitué centrifugé à différentes concentrations en Rubisco. Pendant l'étape de la charge, le jus est injecté en continu dans la colonne en lit fixe ou en lit expansé et la solution en sortie est fractionnée en plusieurs échantillons qui sont analysés par HPLC SEC.

Le lit de résine est par la suite lavé à l'eau ultra-pure jusqu'à ce que la conductivité de la solution en sortie de la colonne soit celle de l'eau. Enfin, l'élution des protéines fixées est réalisée par des solutions de NaCl à différentes conditions de vitesses superficielles et de concentrations.

L'ensemble des conditions opératoires utilisées dans les différentes expériences seront détaillées lors de la présentation des résultats, pour chaque mode de contact.

IV.3. Comportement hydrodynamique des colonnes

La caractérisation du comportement hydrodynamique des colonnes est importante car elle permet de rendre compte du rôle macroscopique de l'écoulement sur les performances de séparation de la colonne. Bien que des nombreux travaux montrent que l'écoulement des lits expansés reste proche du piston pour les petites échelles de travail, il nous a semblé nécessaire de déterminer et comparer le comportement des colonnes dans les conditions opératoires utilisées dans ce travail. Pour cela, l'analyse classique de la distribution de temps de séjour [Levenspiel, 1972] a été utilisée.

IV.3.1. Protocole expérimental

La détermination de la courbe de distribution du temps de séjour (DTS) est réalisée par une stimulation effectuée à l'entrée de la colonne et l'enregistrement de la réponse à la sortie. En raison de la taille de la colonne et les faibles débits appliqués, la stimulation effectuée est une stimulation échelon afin de perturber le moins possible l'écoulement de la colonne.

Le dispositif expérimental étant celui représenté par la figure III-3, il s'agit de remplacer le tampon d'alimentation par un traceur inerte et facilement mesurable en sortie. Dans ce cas, le traceur choisi est le bleu de dextran car grâce à sa masse molaire élevée (environ 2.10^6

g/mol), le bleu de dextran ne diffuse pas dans les pores de la résine. De plus, ce traceur est facilement détectable par mesure de l'absorbance à 220 nm.

Du point de vue expérimental, le lit de Q Hyper Z est alimenté avec la solution tampon. A $t=0$, la solution tampon est remplacée par une solution de bleu de dextran à la concentration $C_0 = 1 \text{ g.L}^{-1}$. Le débit d'alimentation est maintenu constant. Lorsque le traceur entre dans la colonne, l'absorbance de la solution en sortie de colonne est relevée à des intervalles de temps réguliers (courbe $F(\theta)$). La concentration en bleu de dextran de la solution en sortie de la colonne est ensuite déterminée à partir de la droite d'étalonnage préétablie (Annexe2).

IV.3.2. Ecoulement dans la colonne en lit fixe

La courbe adimensionnelle $F(\theta)$ obtenue expérimentalement est donnée par la figure 4a. La fonction de distribution $E(\theta)$ s'obtient alors par dérivation de la courbe F (figure III-4b).

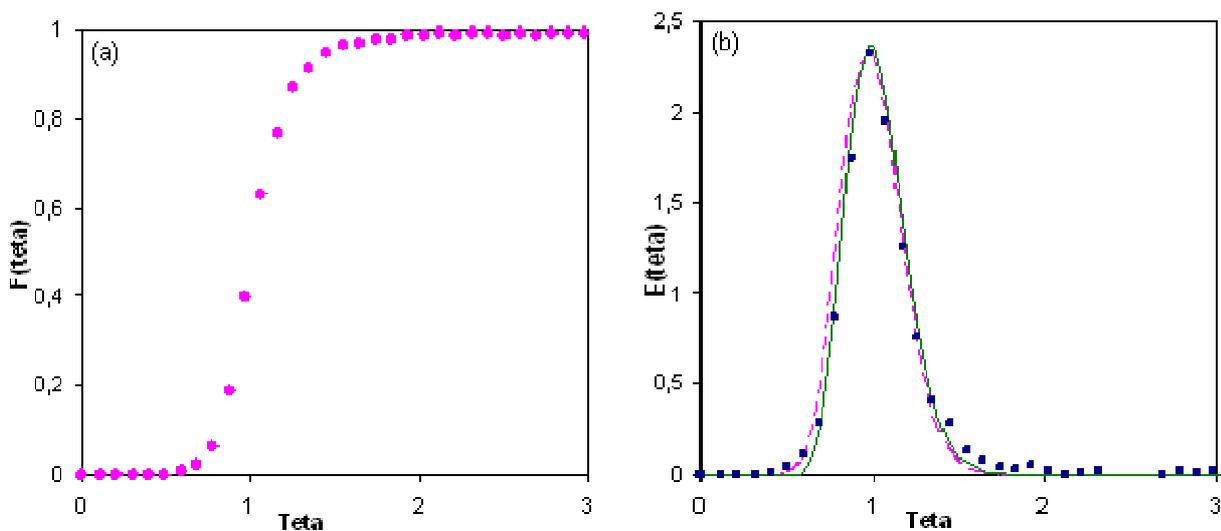


Figure III-4. (a) Réponse à une stimulation échelon de la colonne en lit fixe $F(\theta)$, (b) Courbe de la distribution des temps de séjour $E(\theta)$: distribution expérimentale (\blacklozenge), distribution suivant le modèle de mélangeurs en cascade ($N=33$) (ligne discontinue), distribution suivant le modèle de convection-dispersion ($Pe = 70$) (ligne continue).

Cette DTS expérimentale, permet déjà d'éliminer des anomalies d'écoulement puisqu'elle ne présente pas de pic caractéristique d'un court-circuit, ni de traînée suggérant du fluide stagnant. D'autre part le temps de séjour moyen calculé (210,4 s) est égal au temps de passage τ qui est de 210 s. La variance de la distribution est très faible ($2,8.10^{-3}$). Les modèles des

mélangeurs en cascade et de convection-dispersion ont été appliqués afin de représenter les résultats expérimentaux obtenus. Les résultats théoriques de ces modèles sont comparés dans la figure 4b aux résultats expérimentaux. Ainsi, le coefficient de dispersion axiale peut être estimé à $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$.

IV.3.3. Ecoulement dans la colonne en lit expansé

L'étude expérimentale de la DTS en lit expansé permet le calcul des moments de premier et deuxième ordre. La figure III-5b montre la DTS expérimentale obtenue. Le temps de séjour moyen déterminé à partir des données expérimentales est de l'ordre de 209 s, il est légèrement supérieur à τ , qui est de 204 s. La variance obtenue est de $2,4 \cdot 10^{-2}$. Cette variance reste faible mais elle est plus importante que celle déterminée pour la colonne en lit fixe. L'application du modèle de convection-dispersion a permis de déterminer un nombre de Peclet d'environ 61 soit une dispersion axiale de $1,8 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ (dix fois supérieure à celle du lit fixe).

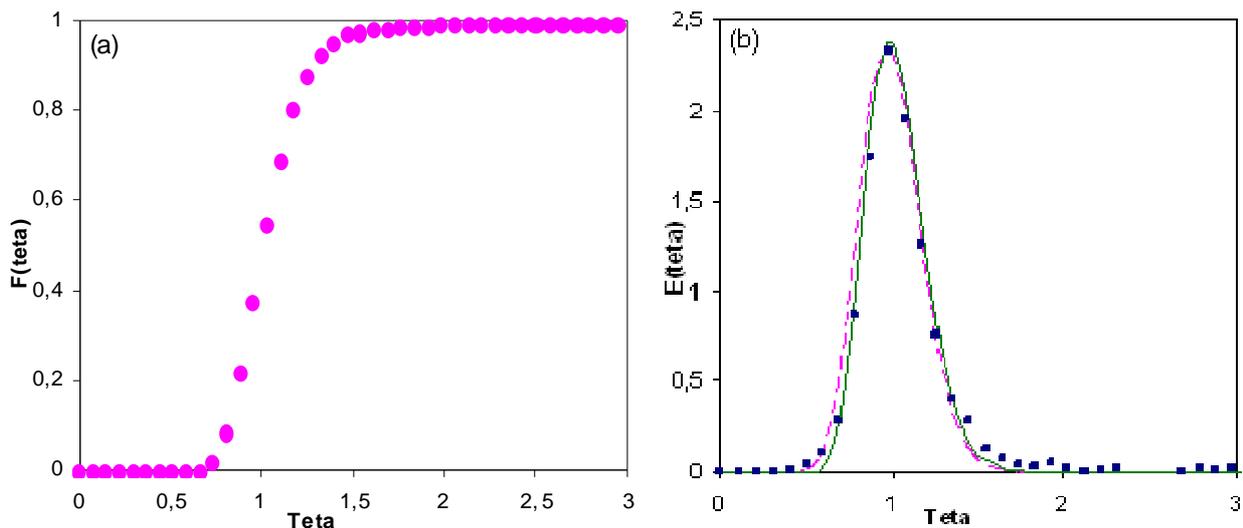


Figure III-5. (a) Réponse à une stimulation échelon de la colonne en lit expansé $F(\theta)$, (b) Courbe de la distribution des temps de séjour $E(\theta)$: distribution expérimentale (\blacklozenge), distribution suivant le modèle de mélangeurs en cascade ($N=30$) (ligne discontinue), distribution suivant le modèle de convection-dispersion ($Pe = 61$) (ligne continue).

La détermination de ces paramètres s'est effectuée sur l'ensemble de la colonne en considérant une porosité moyenne constante). Leur application sera donc d'autant plus correcte que la distribution de porosité dans le lit sera linéaire. De fait, Yun et al. (2004a et b) ont démontré que la distribution de la porosité dans le lit n'est pas tout à fait linéaire, avec une

augmentation un peu plus rapide en bas de la colonne, mais l'évolution générale peut être assimilée à une droite sans trop d'erreur.

En effet, l'application des modèles utilisés pour décrire le comportement hydrodynamique des colonnes en lit fixe au lit expansé a fait l'objet de plusieurs travaux [Thommes, 1997 ; Li et al., 2005]. Néanmoins, cette approche reste assez controversée car les modèles sont liés à la vitesse d'écoulement, à la porosité, à la hauteur du lit, et à d'autres paramètres qui sont en rapport avec l'expansion du lit [Palsson et al., 2001, Fenneteau et al., 2003, Vergnault 2004].

Lorsque des particules bien appropriées à la chromatographie en lit expansé (distribution spécifique de taille et de densité) sont utilisées, une classification s'établit au sein de la colonne. Ceci permet la stabilisation du lit en réduisant la mobilité locale des particules et entraînant un faible degré de mélange dans la phase liquide. Cette classification a été observée au cours des expériences [Bruce et Chase, 2001]. Il a été ainsi constaté que les particules de petites tailles sont localisées en haut de la colonne avec un taux de vide élevé dans cette partie. Ceci implique une porosité qui varie tout le long de la colonne. En plus de la classification, d'autres paramètres comme le débit appliqué, la viscosité et la densité de la phase liquide contribuent à la variation de la porosité. Cette variation de porosité affecte la dispersion de la phase liquide et le temps de séjour dans la colonne [Chang et Chase, 1996, Palsson et al., 2001].

IV.4. Courbes de percée

IV.4.1. Principe

L'application à l'entrée d'une colonne chromatographique d'un échelon de concentration d'une espèce donnée entraîne une distribution interne des concentrations en fonction de la position dans la colonne à un instant donné t . La représentation de l'évolution de la concentration en fonction du temps (ou du volume) en sortie de la colonne (à $z = H$) est couramment appelée courbe de percée.

Une courbe de percée est caractérisée par son temps (ou volume) de percée appelé aussi temps (ou volume) stœchiométrique. Le temps de percée représente la moyenne de la distribution des temps (ou volumes) de sortie de la concentration entre 0 et C_0 . Le volume stœchiométrique V_s peut être déterminé par l'équation III-1.

$$V_s = \frac{\int_0^{C_0} (V - V_p) dC}{C_0}$$

Equation III-1

Avec V_p , volume poreux du lit dans la colonne, V volume appliqué jusqu'à $C/C_0 = 1$.

IV.4.2. Profil de la courbe

La comparaison d'une courbe de percée réelle (expérimentale) et d'une courbe de percée idéale montre souvent un écart important. Plusieurs phénomènes sont à l'origine des écarts observés sur la courbe de percée réelle. Dans le cas du lit expansé, le premier paramètre qui influe sur l'allure de la courbe de percée est l'hydrodynamique dans la colonne de chromatographie. En effet, plus l'écoulement s'éloigne d'un écoulement idéal (de type piston), c'est-à-dire plus la dispersion de la phase liquide dans la colonne est importante, plus l'écart entre la percée théorique et la percée expérimentale est important.

D'autre part, le partage du soluté entre les deux phases lors du passage du liquide sur le support solide joue un rôle important dans l'allure de la courbe de percée. En effet, la nature du ligand et de son greffage sur les particules, la cinétique et l'équilibre d'interaction protéine / ligand, le transfert de masse interne dans les pores (diffusion dans les pores) et le transfert de masse externe dans la couche limite (transfert externe) ainsi que la dispersion dans les phases liquide et solide, influent sur la rétention en lit expansé [Hjorth et al., 1995].

Wright (2000) a démontré que, quel que soit le degré d'expansion et la viscosité du liquide, la dispersion axiale, les coefficients de transfert de masse (externe et interne) ont un effet moins important sur la forme de la courbe de percée que la vitesse superficielle et le rayon des particules. En outre, tous ces paramètres sont également influencés par d'autres facteurs tels que la verticalité de la colonne, le distributeur, et la présence de cellules dans la charge [Bascoul et al, 1988, Bruce et al, 1999, Fernandez-Lahore et al, 1999].

Ainsi, la modélisation d'une courbe de percée expérimentale est assez complexe mais l'analyse de l'allure de la courbe de percée et des capacités dynamiques peuvent déjà fournir des informations sur les performances du procédé. Bien que la modélisation n'ait pas fait l'objet de ce travail, quelques éléments de base seront analysés dans le chapitre IV.

IV.4.3. Capacité dynamique à 10%

Le tracé de la courbe de percée permet de déterminer la capacité totale de la colonne pour la rétention de la molécule dans les conditions opératoires imposées. Dans les bioséparations, la molécule d'intérêt ayant souvent une valeur économique importante, la fuite maximale admise est de 10%. La capacité dynamique de la colonne à ce point de fonctionnement ($Q_{10\%}$) est donc un paramètre essentiel de dimensionnement.

Cette capacité représente la masse de protéines fixées par masse ou volume de support, lorsqu'en sortie de colonne, une concentration protéique égale à 10% de la concentration de la solution injectée en entrée, est obtenue. La $Q_{10\%}$ est considérée donc comme la capacité utile de la colonne, et se calcule par bilan de matière selon l'équation III-2.

$$Q_{10\%} = \frac{C_0 \times (V_{10\%} - V_p) - \int_0^{V_{10\%}} C \cdot dV}{V_R} \quad \text{Equation III-2}$$

Avec $V_{10\%}$ le volume passé dans la colonne lorsque la concentration en sortie est égale à 10% de C_0 , V_p le volume poreux du lit et V_R le volume de la résine.

L'équation III-2 sera donc utilisée par la suite afin de caractériser le procédé dans les différentes conditions de fonctionnement.

IV.5. Rétention de Rubisco à partir des jus reconstitués centrifugés

Dans le but d'étudier l'influence de la composition, la charge en lit fixe est réalisée avec des jus à des concentrations variables allant de 0,13 à 2,1 g.L⁻¹. Comme cela a été indiqué, le support utilisé est l'échangeur d'anions Q Hyper Z et le débit d'alimentation est de 2,6 mL.min⁻¹ soit une vitesse superficielle d'environ 1,7 cm.min⁻¹ dans une colonne de 1,4 cm de diamètre. Les expériences de charge réalisées en lit fixe sont résumées dans le tableau III-3 :

Tableau III-3. Conditions expérimentales des différentes expériences de charge de Rubisco du jus de luzerne par colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit fixe.

Charge			
	Concentration de Rubisco dans le jus à l'entrée (g.L ⁻¹)	Dilution du jus initial	Vitesse superficielle (cm.min ⁻¹)
Expérience 1	0,13	1:100	1,7
Expérience 2	0,34	1: 40	
Expérience 3	0,67	1:20	
Expérience 4	1,33	1:10	
Expérience 5	2,10	1:6	

La taille de la colonne en lit expansé étant plus importante, les dilutions étudiées se trouvent dans la gamme supérieure des concentrations utilisées en lit fixe. Le support utilisé est le même, Q Hyper Z, et la vitesse superficielle est imposée par le degré d'expansion souhaité. Les concentrations du jus en Rubisco dans les expériences de charge réalisées en lit expansé sont présentées dans le tableau III-4. Une expérience en lit expansé a été réalisée avec le jus reconstitué centrifugé, sans dilution préalable.

Tableau III-4. Conditions expérimentales des différentes expériences de charge de Rubisco du jus de luzerne par colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit expansé.

Charge			
	Concentration de Rubisco dans le jus à l'entrée (g.L ⁻¹)	Dilution du jus initial	Vitesse superficielle (cm.min ⁻¹)
Expérience 1	1,13	1:10	5,3
Expérience 2	1,55	1:8	
Expérience 3	2,20	1:6	
Expérience 4	13,35	1:1	

IV.5.1. Courbes de percée expérimentales

Lors de la mise en contact du jus avec la résine échangeuse d'ions, plusieurs composés présents dans le jus peuvent être fixés. L'intérêt de ce travail étant centré sur la séparation de

la Rubisco, seule sa concentration a été déterminée en sortie de la colonne. Les courbes de percée représentées sont donc spécifiques à cette protéine. Pour toutes les expériences réalisées, la concentration normée (C/C_0) de Rubisco en sortie de la colonne en fonction du nombre de volume poreux (V/V_p) est représentée.

IV.5.1.1 Colonne en lit fixe

La courbe de percée obtenue pour l'expérience 5 est représentée dans la figure III-6. On constate que cette courbe présente une allure particulière. En effet, on observe un premier palier quand la concentration en sortie de la colonne atteint environ 73% de la concentration à l'entrée de la colonne. En poursuivant la charge, la concentration de Rubisco à l'entrée est retrouvée à la sortie de la colonne ($C/C_0 = 1$). Il semblerait donc que différents mécanismes aient lieu dans la colonne avant d'arriver à une saturation complète.

L'échangeur se comporte en effet comme si deux sites d'échange différents co-existent. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer ce comportement :

- 1- L'accessibilité des sites : les différences de comportement des sites de l'échangeur pourraient avoir une origine cinétique car la taille de la Rubisco étant très grande, une saturation rapide des sites d'échange dans la surface des particules est possible, suivie d'une diffusion lente de la molécule à l'intérieur de la particule.
- 2- Une affinité supérieure de la résine pour la Rubisco (en raison de sa grande taille, le nombre des charges de cette molécule est sûrement très important) pourrait aussi expliquer ce comportement : la résine peut retenir différentes biomolécules, dont la Rubisco. Lorsqu'une particule de résine est saturée par différents ions, une situation de compétition entre les espèces peut apparaître : si l'affinité de la résine pour la Rubisco est plus importante, celle-ci peut déplacer de l'échangeur d'autres biomolécules fixées. Le contre-ion étant différent, l'échange suivra des lois cinétiques et d'équilibre différentes.

Si la compréhension exacte de ces mécanismes est difficile, compte tenue de la nature complexe de la solution, l'observation simultanée de l'évolution des concentrations pendant la charge (pour la Rubisco et pour d'autres molécules compétitrices) a été utilisée afin d'apporter quelques éléments de réponse qualitatifs concernant ce phénomène.

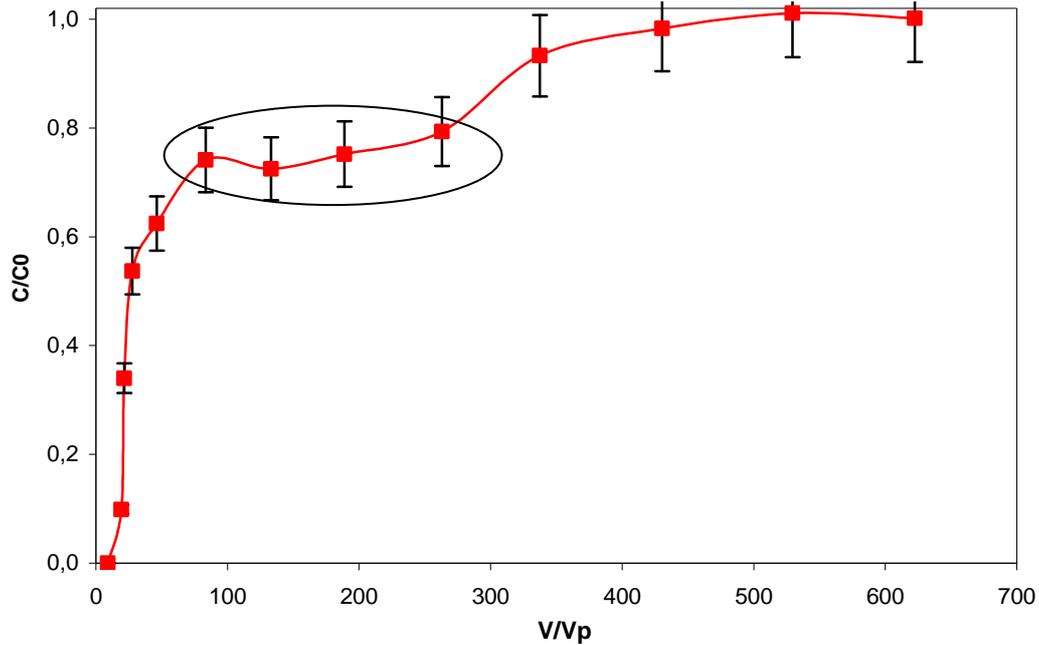


Figure III-6. Courbe de percée expérimentale de la Rubisco déterminée par traitement d'un jus reconstitué centrifugé de luzerne, dilué 6 fois (concentration initiale en Rubisco $2,10 \text{ g.L}^{-1}$) dans une colonne en lit fixe du support Q Hyper Z.

Les chromatogrammes obtenus par l'analyse HPLC SEC des fractions récupérées en sortie de la colonne sont représentés dans la figure III-7 pour les échantillons concernés. Ils permettent en effet de visualiser, pour tous les échantillons analysés, un pic net de la Rubisco et d'autres pics non résolus correspondants à tous les autres éléments du jus absorbant à 280 nm.

Alors que le pic de la Rubisco est utilisé pour la détermination de sa concentration, la détermination de l'aire des autres pics est délicate vu leur étalement, et ne serait pas très intéressante puisqu'il correspond à un mélange de composés mal défini. Toutefois, l'observation de l'allure de ce pic et de ses variations pour les différents échantillons est représentatif du comportement de ces composés du jus dans le temps.

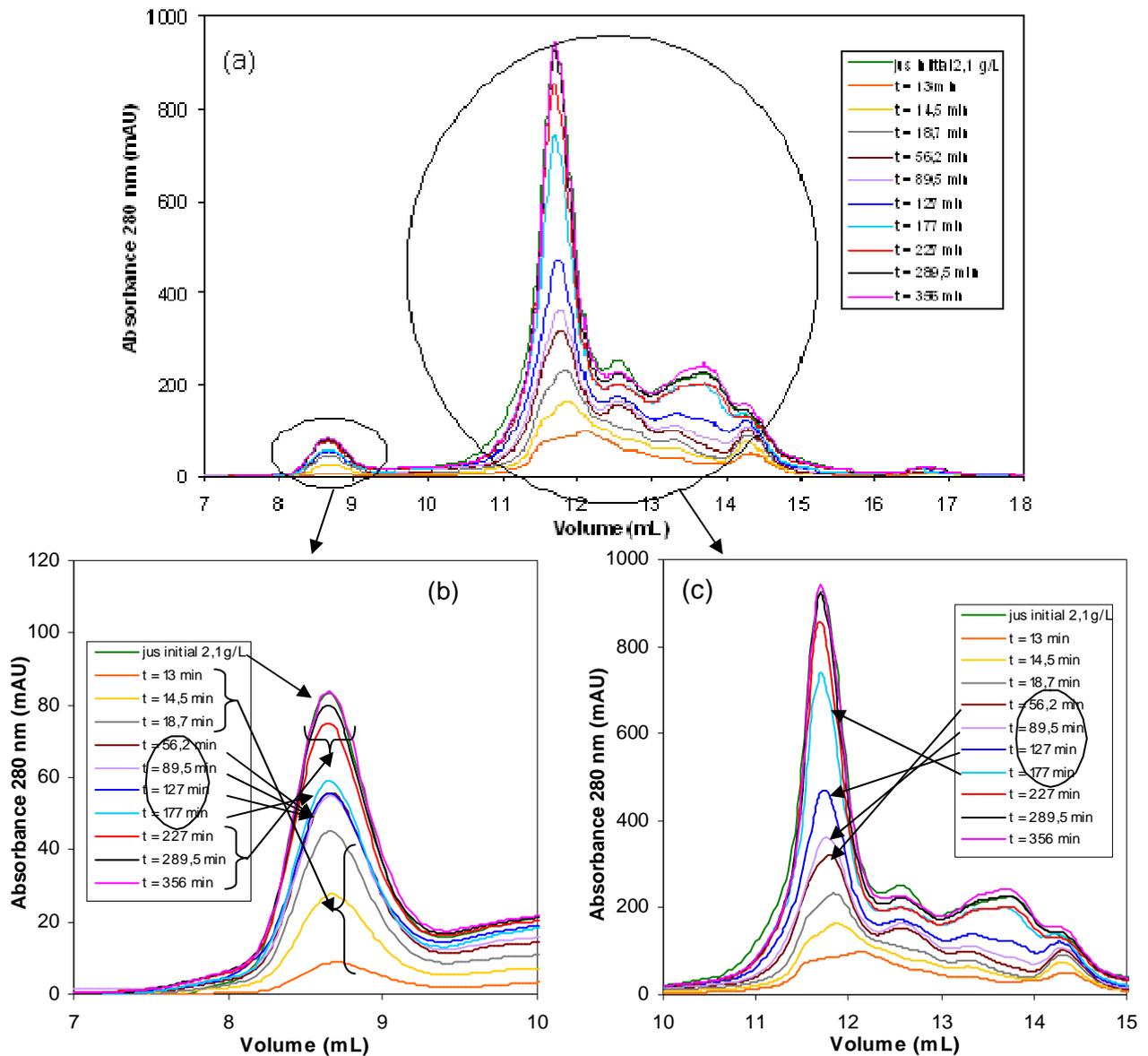


Figure III-7. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC SEC des fractions issues de la charge de la colonne en lit fixe avec un jus de luzerne à une concentration en Rubisco de 2,1 g.L⁻¹. (a) Chromatogrammes entiers, (b) pics de la Rubisco, (c) pics de composés de faible masse moléculaire.

Comparé au pic de Rubisco de la solution d'entrée à la colonne, les premières fractions analysées présentent un pic beaucoup plus faible qui s'explique par la fixation de la Rubisco sur le support (figure III-7b). Ce pic augmente peu à peu dans le temps, se stabilise au niveau des échantillons collectés à $t = 56,2$, $t = 89,5$, $t = 127$ et $t = 177$ min. Ceci explique le premier palier obtenu sur la courbe de percée à $C/C_0 = 0,73$. Dans un deuxième temps, le pic de Rubisco augmente à nouveau jusqu'à atteindre le pic du jus initial (échantillon final). On a

alors une concentration finale en Rubisco égale à sa concentration initiale à l'entrée de la colonne, ce qui se traduit par le palier au niveau de la courbe de percée où $C/C_0 = 1$.

En parallèle, l'observation des autres pics dans la figure III-7c montre que leur niveau est très faible pour les premiers échantillons sortis de la colonne. Ceci confirme bien que d'autres composés du jus se fixent sur le support Q Hyper Z en même temps que la Rubisco. Par la suite, Ces pics augmentent au fur et à mesure de la charge, jusqu'à atteindre l'intensité du pic du jus initial. On obtient ainsi, pour la dernière fraction, un chromatogramme identique à celui du jus initial. On observe ici des pics superposés comme c'est le cas de la Rubisco. Par ailleurs, on peut affirmer que la colonne est complètement saturée puisqu'elle ne retient plus aucun composé du jus.

Si l'on s'intéresse davantage aux fractions collectées à $t = 56, 2$, $t = 89,5$, $t = 127$ et $t = 177$ min, on remarque que le pic de Rubisco pour ces fractions est constant, alors que les pics d'autres composés continuent à augmenter. Ceci veut dire que la Rubisco continue à se fixer au détriment des autres composants. On peut donc conclure que, dans les conditions de cette expérience, à partir de 56 minutes de charge (probablement le temps nécessaire à l'élimination de tous les contre ions initialement présents sur le support), il y a une sélectivité certaine de l'échangeur pour la Rubisco. Il est probable par ailleurs que malgré cette sélectivité, d'autres composés du jus se retiennent initialement dans l'échangeur de part leur taille plus petite, qui leur permet de diffuser plus rapidement et d'occuper de sites difficilement accessibles dans l'échangeur, alors que la Rubisco se fixera davantage en surface. Une fois la charge de surface épuisée, les molécules de Rubisco diffusent lentement à l'intérieur des particules, libérant de nouveaux sites.

Les courbes de percée obtenues pour les différentes expériences réalisées en lit fixe (tableau III-2) sont présentées sur la figure III-8. Seule la courbe de percée de l'expérience 5 ($C_0 = 2,1 \text{ g.L}^{-1}$), étudiée ci-dessus, atteint le palier $C/C_0 = 1$. Les autres expériences n'ont pas été poursuivies jusqu'à la saturation complète de la colonne d'une part parce que cela nécessiterait un temps de charge de plus de 8 heures (vu les concentrations initiales faibles), d'autre part, seule la première partie de la courbe de percée nous intéresse pour l'évaluation de la capacité utile de la colonne (calcul de $Q_{10\%}$).

La figure III-8 montre que pour toutes les concentrations initiales de Rubisco testées, C/C_0 atteint ce palier à environ 0,75 ($\pm 0,05$). L'hypothèse de la dégradation ou la dénaturation de la Rubisco au cours du temps de l'expérience a été écartée puisque l'analyse par HPLC SEC d'un jus fraîchement préparé et du même jus conservé 8 heures à température ambiante montre que l'aire du pic de la Rubisco est inchangée, par conséquent sa concentration dans le jus reste constante. Ceci semble alors conforter l'hypothèse d'une occupation, dans un premier temps, de tous les sites disponibles de la résine par la Rubisco et d'autres composés, puis une compétition de la Rubisco avec d'autres molécules.

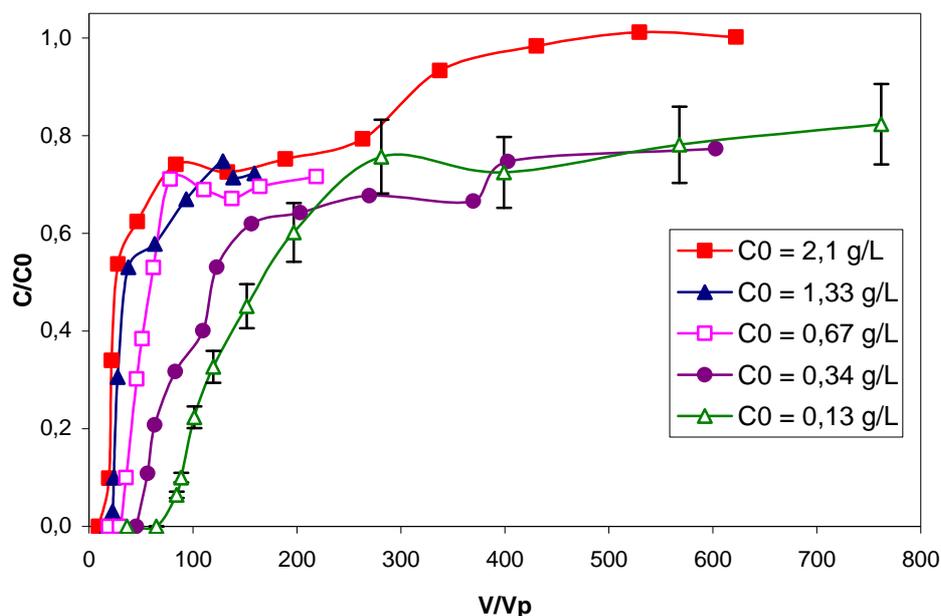


Figure III-8. Courbes de percée de la Rubisco déterminées expérimentalement par traitement des jus reconstitués centrifugés de luzerne, dilués de 6, 10, 20, 40 et 100 fois, dans une colonne en lit fixe du support Q Hyper Z.

A faible concentration initiale (expériences 1 et 2), des limitations au transfert dans le film semblent encore plus limitantes, de sorte que le palier reste observable mais le passage du premier au deuxième palier est moins marqué.

IV.5.1.2 Colonne en lit expansé

Les courbes de percée obtenues pour les différentes expériences réalisées en lit expansé (tableau III-3) sont présentées sur la figure III-9. Les aspects de séparation proprement dits sont ainsi similaires à ceux de la séparation en lit fixe, puisque le support et la protéine en question sont les mêmes. Seules les conditions hydrodynamiques sont modifiées ce qui

pourrait modifier les capacités pour un cas ou pour un autre. On observe bien que les courbes de percée présentent la même allure avec un premier palier à C/C_0 voisin de 0,75.

Par ailleurs, quel que soit le mode de contact, on constate que les concentrations élevées se déplacent dans la colonne plus rapidement que les faibles concentrations.

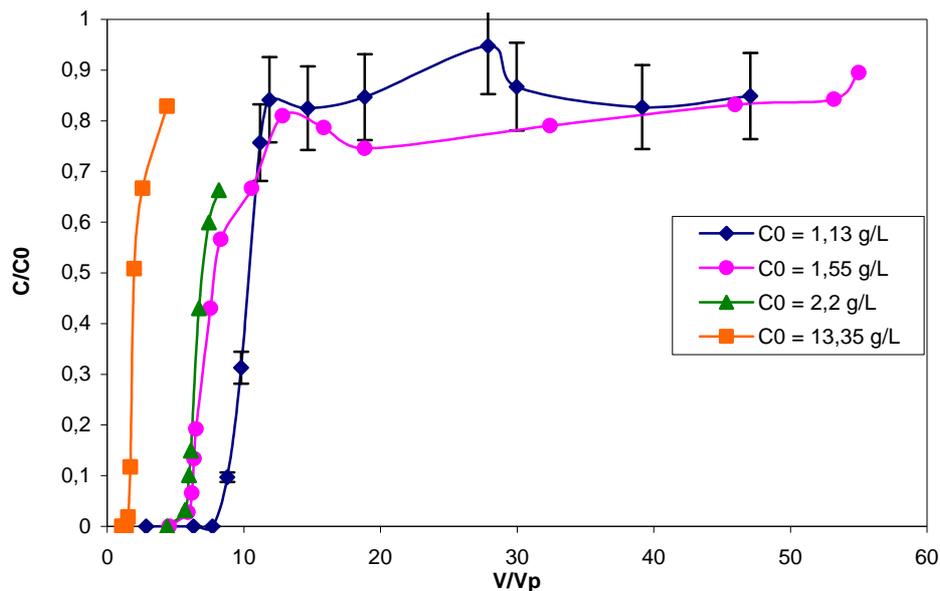


Figure III-9. Courbes de percée de la Rubisco déterminées expérimentalement par traitement des jus reconstitués centrifugés de luzerne, dilués de 1, 6, 8, et 10 fois, dans une colonne en lit expansé du support Q Hyper Z.

IV.5.2. Evaluation de la capacité dynamique

Les capacités dynamiques à 10% sont calculées à partir de ces courbes expérimentales de percée pour les différentes concentrations initiales du jus réalisées en lit fixe (tableau III-5) et en lit expansé (tableau III-6). Ces tableaux présentent également les conditions de conductivité et les concentrations initiales de chaque expérience.

Tableau III-5. Capacités dynamiques à 10% obtenues à partir des expériences de charge d'une colonne en lit fixe sur support Q Hyper Z avec un jus de luzerne à différentes concentrations initiales.

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4	Expérience 5
Concentration de Rubisco dans le jus à l'entrée (g.L ⁻¹)	0,13	0,34	0,67	1,33	2,1
Conductivité (mS.cm ⁻¹)	0,21	0,38	0,92	1,21	2,17
Q _{10%} (mg.mL ⁻¹)	10,2	16,4	19,5	23,9	28,6

Tableau III-6. Capacités dynamiques à 10% obtenues à partir des expériences de charge d'une colonne en lit expansé sur support Q Hyper Z avec un jus de luzerne à différentes concentrations initiales.

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4
Concentration de Rubisco dans le jus à l'entrée (g.L ⁻¹)	1,13	1,55	2,2	13,3
Conductivité (mS.cm ⁻¹)	1,22	1,43	2,11	17,00
Q _{10%} (mg.mL ⁻¹)	20,1	19,2	24,8	17,8

Pour les expériences réalisées en lit fixe, on constate que la Q_{10%} augmente quand la concentration initiale en Rubisco augmente malgré l'augmentation de la conductivité. La capacité dynamique à 10% maximale est obtenue dans le cas de l'expérience 5 menée avec un jus de conductivité égale à 2,17 mS.cm⁻¹ et une concentration initiale de Rubisco de 2,1 g.L⁻¹. Cette Q_{10%} maximale de 28,6 mg.mL⁻¹ est un peu plus faible que ce qu'on peut trouver dans la littérature. En effet, pour le même support Q Hyper Z, on trouve dans la littérature des valeurs de Q_{10%} de 35,9 mg.mL⁻¹ [Vergnault, 2004] ou 37 mg.mL⁻¹, [Xia et al., 2007a]. Ces capacités sont déterminées pour une protéine différente, plus petite la BSA, ce qui pourrait expliquer l'écart observé.

Les Q_{10%} obtenues dans le cas des expériences réalisées en lit expansé, présentent une même tendance sauf dans le cas de l'expérience menée avec le jus non diluée où on remarque que la Q_{10%} diminue. Ceci est dû probablement à la forte conductivité du milieu et donc à la compétition de la Rubisco avec les sels présents dans le jus pour la fixation sur le support. Ceci avait été soulevé par les travaux de Vergnault (2004) qui montrent que la Q_{10%} de cette

même résine Q Hyper Z pour la rétention de la BSA diminue de 50% en présence de 50 mM de NaCl (l'équivalent d'une conductivité d'environ 5 mS.cm⁻¹). Il est toutefois difficile de rendre compte de l'effet de la force ionique sur cette capacité dans cette étude car la concentration C₀ varie aussi d'une expérience à l'autre. Cependant, les courbes de percée présentées ont toutes été réalisées dans une gamme de faibles conductivités par rapport à celle du jus initial. En effet, les jus utilisés dans ces expériences correspondent à des dilutions du jus initial de 6 à 100 fois ce qui réduit considérablement la conductivité du milieu (tableau III-5). Pour rendre compte de l'effet de la conductivité sur la Q_{10%}, il serait nécessaire d'établir les courbes de percée en utilisant des jus à une même concentration initiale en Rubisco et des conductivités variables. Cela impliquerait nécessairement un ajustement de la conductivité par ajout de sel. Par ailleurs, l'étude de l'effet de la concentration initiale en Rubisco sur Q_{10%}, en gardant la conductivité constante, aurait lui nécessité un dopage du jus en Rubisco pure, dont on ne dispose pas.

Par ailleurs, en comparant les expériences 2 et 3 réalisées en lit expansé et les expériences 4 et 5 réalisées en lit fixe, on remarque que pour une même concentration initiale du jus, les Q_{10%} déterminées pour la séparation de la Rubisco en lit expansé sont globalement légèrement inférieures à celle obtenues en lit fixe (figure III-10). On peut toutefois dire que les Q_{10%} déterminées pour la Rubisco dans les conditions du lit expansé ou du lit fixe sont dans le même ordre de grandeur que les valeurs de la littérature.

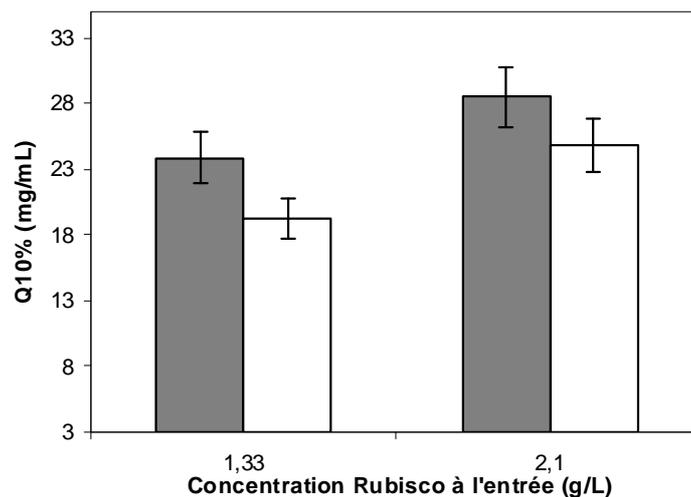


Figure III-10. Comparaison des Q_{10%} pour la Rubisco sur Q Hyper Z obtenues avec deux modes de contact différents : en lit fixe (gris) et en lit expansé (blanc) pour deux concentrations d'alimentation différentes.

IV.6. Elution

IV.6.1. Conditions d'élution dans la colonne en lit fixe

L'élution de la Rubisco fixée sur le support est réalisée par un flux ascendant de NaCl à un débit de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ soit une vitesse de $0,65 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$. L'élution est réalisée par palier de concentration de NaCl 0,5 et $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Comme il sera montré par la suite la solution de NaCl à $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ permet d'éluer la totalité de la Rubisco fixée, toutefois, il est nécessaire de poursuivre l'élution avec une force ionique plus importante pour assurer l'élution des autres composés fixés au support. Le tableau III-7 résume les conditions des différentes expériences en lit fixe.

Tableau III-7. Conditions expérimentales d'élution pour les expériences de charge de Rubisco du jus de luzerne réalisées en colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit fixe.

	Charge		Elution	
	Concentration de Rubisco dans le jus à l'entrée ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Vitesse superficielle ($\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$)	Concentration de NaCl ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Vitesse superficielle ($\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$)
Expérience 1	0,13	1,7	0,5 puis 1	0,65
Expérience 2	0,34			
Expérience 3	0,67			
Expérience 4	1,33			
Expérience 5	2,1			

IV.6.2. Conditions d'élution dans la colonne en lit expansé

Deux protocoles d'élution ont été testés lors des expériences en lit expansé. Dans le premier, le mode de contact a été conservé. Dans le deuxième, l'élution s'est faite en lit fixe afin de réduire le volume d'éluat et d'augmenter le temps de contact. Les conditions d'élution appliquées pour chaque expérience sont résumées dans le tableau III-8.

L'élution en lit expansé est réalisée par un flux ascendant de NaCl à un débit de $13 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ soit une vitesse de $2,65 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ par palier de concentration de NaCl 0,5 et $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cette vitesse d'élution est préconisée par le fournisseur de la résine (Pall Corporation).

Pour effectuer l'élution en mode lit fixe, l'adaptateur mobile est baissé au niveau H_0 et la colonne est alimentée avec la solution de NaCl par palier de concentration à 0,5 et 1 mol.L⁻¹ :

- soit à un débit de 3,2 mL.min⁻¹ qui correspond à une vitesse de 0,65 cm.min⁻¹, équivalente à celle appliquée dans le cas de la colonne en lit fixe,
- soit à un débit de 2 mL.min⁻¹ permettant d'avoir une vitesse de 0,4 cm.min⁻¹.

Pour les deux modes de contact, l'élution est suivie par analyse HPLC SEC des fractions collectées. Le profil du chromatogramme donne quant à lui une idée de la pureté de chaque fraction.

Tableau III-8. Conditions expérimentales d'élution pour les expériences de charge de Rubisco du jus de luzerne réalisées en colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit fixe.

	Charge		Elution	
	Concentration de Rubisco dans le jus à l'entrée (g.L ⁻¹)	Vitesse superficielle (cm.min ⁻¹)	Concentration de NaCl (mol.L ⁻¹)	Vitesse superficielle (cm.min ⁻¹)
Expérience 1	1,13	5,3	0,5 puis 1	2,65 (lit expansé)
Expérience 2	1,55			0,65 (lit fixe)
Expérience 3	2,2			0,40 (lit fixe)
Expérience 4	13,35			0,40 (lit fixe)

IV.6.3. Analyse quantitative

IV.6.3.1 Colonne en lit fixe

La courbe d'élution de l'expérience 5, pour laquelle la colonne a été complètement saturée, représentant la concentration de la Rubisco en fonction du temps est représentée dans la figure III-11.

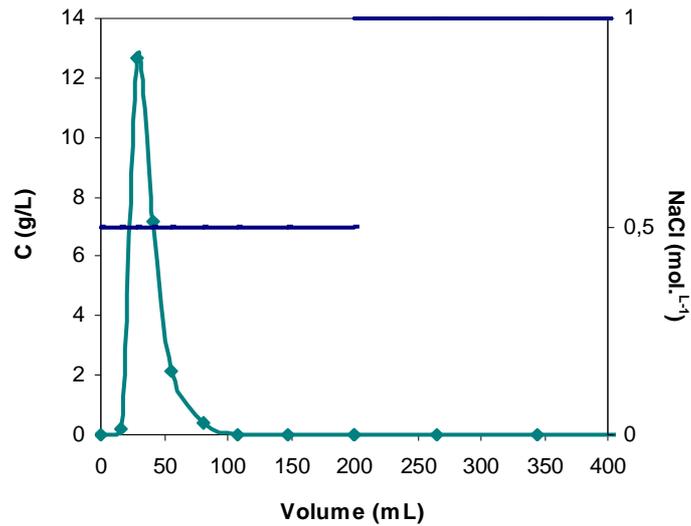


Figure III-11. Courbe d'élution de la Rubisco chargée sur le support Q Hyper Z en colonne lit fixe à partir d'un jus de luzerne à une concentration initiale de Rubisco de $2,1 \text{ g.L}^{-1}$.

Cette figure montre que la concentration maximale de Rubisco obtenue est de l'ordre de 13 g.L^{-1} soit six fois la concentration initiale du jus ayant alimenté la colonne pendant la charge ($2,1 \text{ g.L}^{-1}$ pour cette expérience). De la même manière, les facteurs de concentration maximale des différentes expériences réalisées sont déterminés et recensés dans le tableau III-9. Ainsi, pour les expériences en lit fixe, le facteur de concentration est compris entre 6 et 10. Puisque l'étape d'élution est réalisée avec la même solution et à une même vitesse superficielle pour toutes les expériences, les écarts des facteurs de concentration bien que faibles peuvent être attribués essentiellement aux différences dans le fractionnement de l'éluat.

Un rendement d'élution peut être défini comme le rapport de la masse totale de Rubisco éluee par la masse totale de Rubisco fixée. Pour évaluer ce rendement, des bilans globaux ont été effectués sur la Rubisco dans les deux phases, en charge et en élution. Les valeurs obtenues pour les différentes expériences sont regroupées dans le tableau III-9. Les résultats montrent que les conditions d'élution appliquées permettent de récupérer seulement entre 64,4 et 78,9% de la protéine fixée.

Tableau III-9. Tableau récapitulatif des masses de Rubisco fixées et éluées pour les différentes expériences réalisées en colonne lit fixe sur le support Q Hyper Z.

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4	Expérience 5
Masse totale de Rubisco fixée (g)	0,07	0,14	0,16	0,28	0,38
Masse totale de Rubisco éluée (g)	0,05	0,09	0,12	0,19	0,30
Rendement d'éluéon (%)	71,4	64,4	75,0	67,8	78,9
Facteur de concentration maximale	8,0	6,7	10,1	7,8	6,2

IV.6.3.2 Colonne en lit expansé

D'après la figure III-11, l'éluéon de la Rubisco a lieu lors de l'alimentation de la colonne avec NaCl à 0,5 mol.L⁻¹. Lors de l'application de la solution de NaCl 1 mol.L⁻¹, plus aucun pic de Rubisco n'est détecté dans les éluats. Ainsi, toutes les courbes d'éluéon présentées dans ce paragraphe correspondent aux fractions éluées à 0,5 mol.L⁻¹ NaCl. La figure III-12 montre la courbe d'éluéon de la Rubisco de l'expérience 1, effectuée à une vitesse superficielle de 2,65 cm.min⁻¹. Les figures III-13 et III-14 et III-15 sont les courbes d'éluéons des expériences 2, 3 et 4 réalisées toutes les trois en lit fixe mais à des vitesses différentes.

On constate que certaines fractions éluées ont des concentrations en Rubisco qui vont jusqu'à 60 g.L⁻¹ impliquant ainsi un facteur de concentration élevé particulièrement dans les cas où l'éluéon est réalisée en lit fixe.

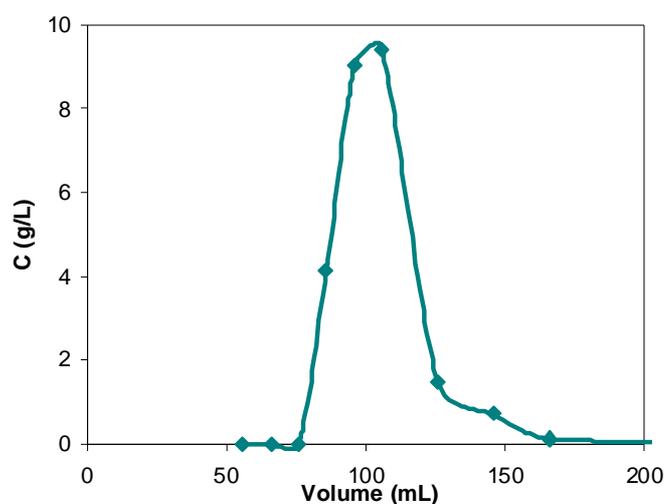


Figure III-12. Courbe d'éluéon de la Rubisco chargée en mode lit expansé (expérience 1). Eluéon en mode lit expansé avec 0,5 mol.L⁻¹ NaCl et vitesse superficielle de 2,65 cm.min⁻¹.

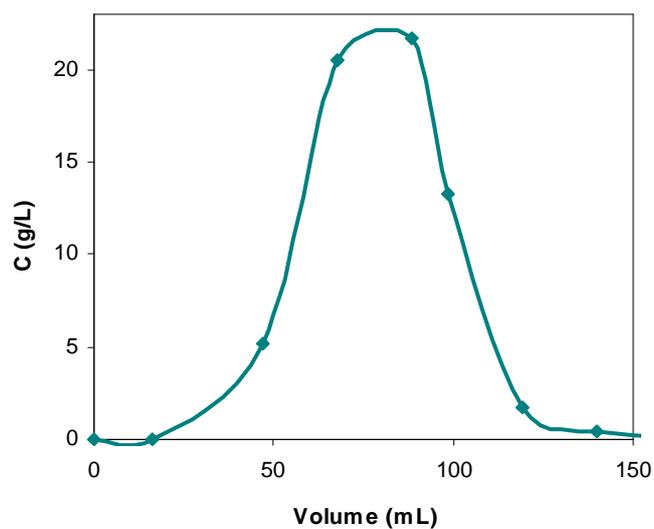


Figure III-13. Courbe d'élution de la Rubisco chargée en mode lit expansé (expérience 2). Elution en mode lit fixe avec $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et vitesse superficielle de $0,65 \text{ cm.min}^{-1}$.

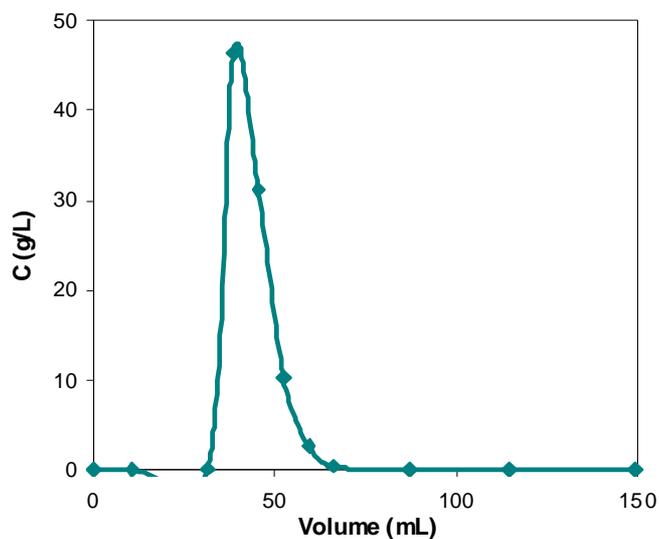


Figure III-14. Courbe d'élution de la Rubisco chargée en mode lit expansé (expérience 3). Elution en mode lit fixe avec $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et vitesse superficielle de $0,40 \text{ cm.min}^{-1}$.

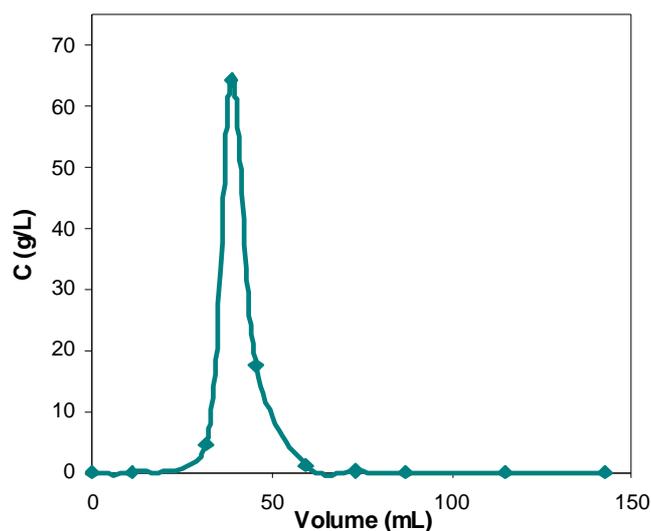


Figure III-15. Courbe d'élution de la Rubisco chargée en mode lit expansé (expérience 4). Elution en mode lit fixe avec $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ NaCl et vitesse superficielle de $0,40 \text{ cm.min}^{-1}$.

Pour faire le bilan sur la Rubisco, la quantité de protéines récupérées et la quantité totale de Rubisco fixée pour chaque expérience sont déterminées. Les rendements de l'étape d'élution ont été ainsi calculés et sont récapitulés dans le tableau III-10.

Tableau III-10. Tableau récapitulatif des masses de Rubisco fixées et éluées pour les différentes expériences réalisées en colonne lit expansé sur le support Q Hyper Z.

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4
Masse totale de Rubisco fixée (g)	1.15	1.76	1.11	1.31
Masse totale de Rubisco éluée (g)	0.32	1.14	1.16	1.34
Rendement d'élution (%)	27.8	64.8	100	100
Facteur de concentration maximale	8,3	14,0	21,0	4,9

En comparant les rendements de Rubisco récupérées pour les différentes expériences, il apparaît que la réduction de la vitesse superficielle de la solution de NaCl permet d'améliorer le taux des protéines éluées. En effet, l'élution en lit fixe à une vitesse superficielle de $0,40 \text{ cm.min}^{-1}$ permet d'augmenter le temps de séjour dans la colonne et de récupérer la totalité de la protéine fixée.

Par ailleurs, les facteurs de concentrations obtenus varient de 4,9 à 21. Même si le fractionnement de l'éluat en sortie de la colonne n'est pas optimisé, on atteint tout de même un facteur de concentration très intéressant, de plus de 20 fois.

D'un point de vue procédé, un rendement global peut être déterminé. Ce rendement correspond au rapport de la quantité de Rubisco éluee par la quantité de Rubisco contenue dans le volume de jus utilisé pour atteindre une concentration en sortie de la colonne égale à 10%. Dans notre cas, le suivi de l'étape de la charge s'est fait par la méthode HPLC SEC qui nécessite un temps d'analyse assez long. Il n'a donc pas été possible d'arrêter la charge à 10% et donc de calculer un rendement global. Un calcul du rendement du procédé à partir de la quantité totale de protéine éluee et la quantité de Rubisco contenue dans le volume total du jus traité n'a pas d'intérêt du point de vue procédé puisqu'une grande quantité de protéine introduite est perdue à partir de 10% de charge.

IV.6.4. Analyse qualitative

IV.6.4.1 Colonne en lit fixe

L'analyse HPLC SEC des fractions éluees fournit des chromatogrammes dont l'allure (nombre et intensité des pics) renseigne sur la pureté des produits de séparations. Les chromatogrammes obtenus pour les fractions éluees de l'expérience 5 sont représentés sur la figure III-16 (les tendances sont similaires pour les différentes expériences).

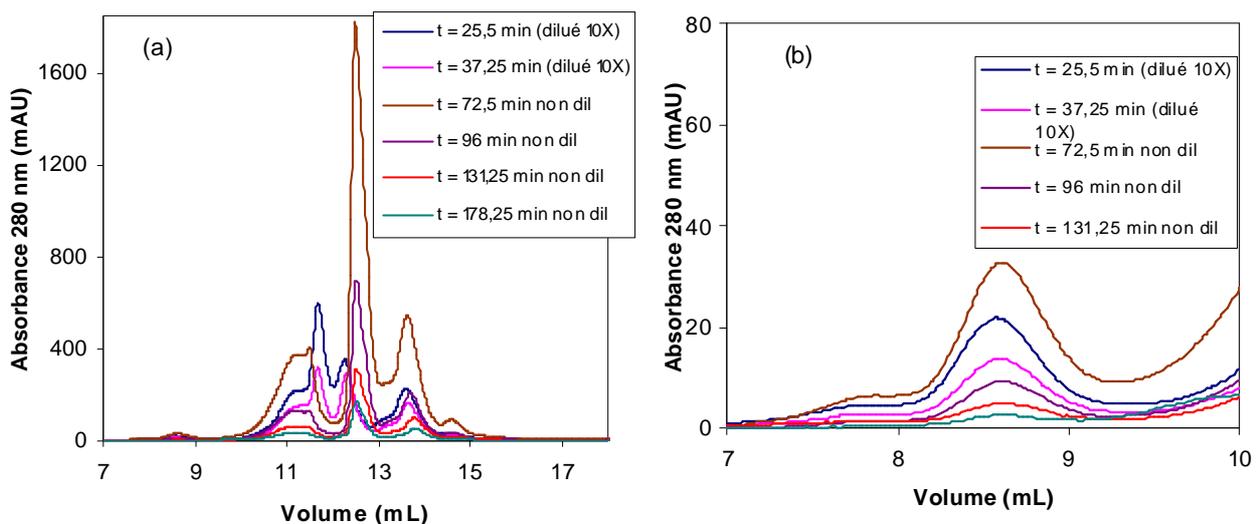


Figure III-16. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC SEC des fractions éluees de la colonne en lit fixe (expérience 5). (a) Chromatogramme complet, (b) pic de la Rubisco.

D'après ces chromatogrammes, l'élution au NaCl permet effectivement d'éluer la Rubisco fixée sur le support puisqu'on observe un pic à 8,7 ml d'élution et qui est plus important que celui du jus initial. La deuxième remarque importante est qu'en plus de la récupération de la Rubisco, l'élution permet aussi de récupérer les autres composés qui se sont fixés à la résine lors de la charge. Cela indique que l'affinité de l'échangeur pour la Rubisco n'induit pas un déplacement total des biomolécules du support, mais plutôt que l'échangeur arrive, à la fin de cette expérience, à un état d'équilibre multi-composant, avec présence sur les particules de différentes espèces.

En conclusion, les fractions produites par ce procédé présentent des taux de concentrations intéressants en protéine d'intérêt par rapport au jus initial allant de 6,2 à 10 (tableau III-8). Cependant la pureté de la Rubisco n'est pas améliorée.

IV.6.4.2 Colonne en lit expansé

L'analyse HPLC SEC des fractions éluées est un outil quantitatif mais aussi qualitatif pour caractériser les produits du procédé de séparation. Les chromatogrammes des fractions éluées de l'expérience 3 sont présentés dans la figure III-17, avec les chromatogrammes complets dans la figure III-17a, et seul le pic correspondant à la Rubisco dans la figure III-17b. Ces chromatogrammes montrent qu'au début de l'élution, les fractions obtenues présentent uniquement le pic correspondant à la Rubisco. Les fractions éluées plus tard présentent en plus de la Rubisco, des composés de tailles moléculaires inférieures à 60 kDa.

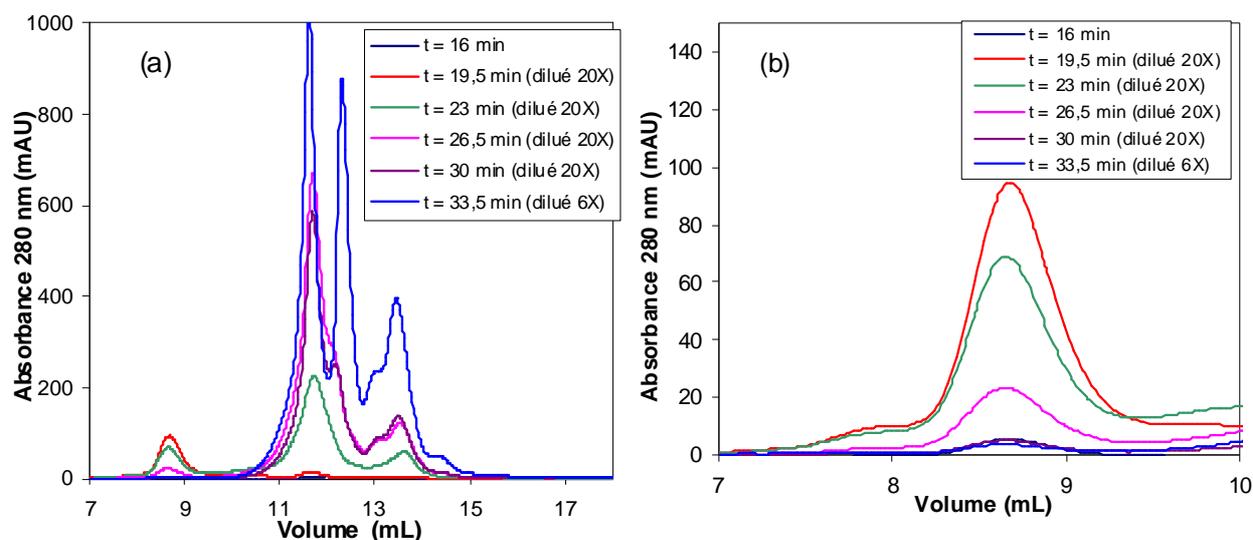


Figure III-17. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC SEC des fractions éluées de la colonne en lit expansé (expérience 3). (a) Chromatogramme complet, (b) pic de la Rubisco.

Il est important de rappeler que dans ces expériences la charge est arrêtée lorsque la concentration de Rubisco en sortie de colonne atteint le premier palier, ce que nous avons considéré comme correspondant à une charge plutôt en surface de la Rubisco, et une saturation des sites internes de la résine par d'autres biomolécules de plus petite taille. Les résultats de la figure III-17 suggèrent effectivement que l'élution se fait de manière graduelle : la Rubisco est éluée en premier, probablement parce qu'elle est fixée davantage dans les sites facilement accessibles. Ensuite, quand on poursuit l'élution, la Rubisco continue à être éluée de la colonne mais les autres composés de poids moléculaire plus faibles commencent aussi à être récupérés en solution. Ainsi, en fin d'élution, les fractions collectées sont des fractions très concentrées en polypeptides et autres composés du jus, et contiennent peu de Rubisco.

Cette élution graduelle permet d'obtenir des fractions de pureté très élevée. En effet, la comparaison du chromatogramme de la fraction éluée à 19,5 min avec le chromatogramme obtenu par l'analyse de la Rubisco commerciale montre clairement que ce procédé produit des fractions de Rubisco beaucoup plus pures (figure III-18).

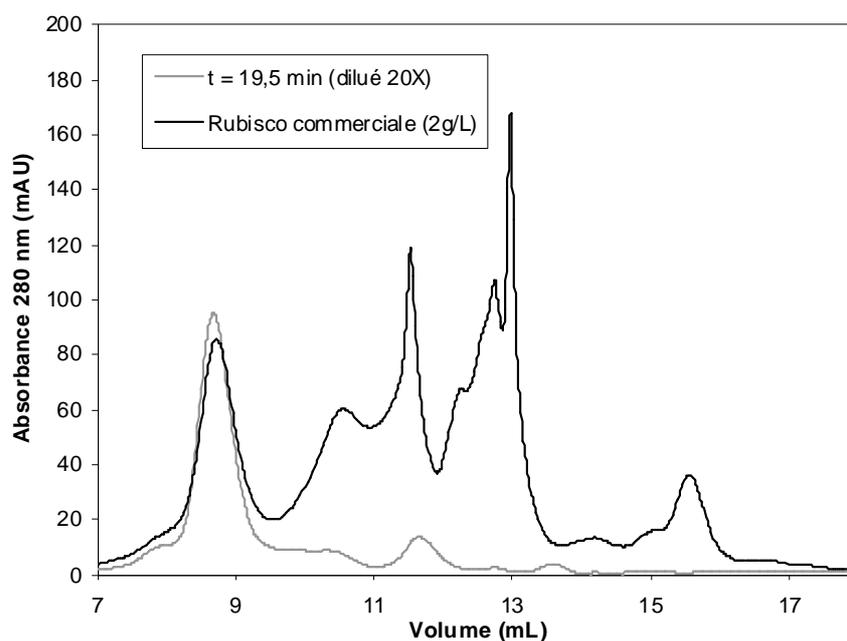


Figure III-18. Chromatogrammes obtenus par analyse HPLC SEC d'une solution de Rubisco d'épinard commerciale à $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (en vert) et de la fraction obtenue à 19,5 min par élution en lit fixe de la résine chargée lors de l'expérience 3 en lit expansé (en rouge).

V. Conclusion

Le traitement industriel de certains végétaux dont la luzerne, conduit à la production de volumes importants de jus caractérisés par une teneur élevée en pigment, vitamines protéines etc. Dans ce chapitre l'application d'un procédé d'échange d'ions à des jus de luzerne reconstitués et centrifugés a été étudiée. Dans un premier temps, le jus a été caractérisé selon les paramètres physico-chimiques globaux (pH, conductivité, azote total ...) et la teneur en Rubisco a été déterminée selon le protocole mis en œuvre (Chapitre II) par HPLC SEC. La concentration en Rubisco du jus, objet de ce travail, est estimée à environ $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$, soit 73 % des protéines blanches.

Compte tenu de l'incertitude sur le pI de la protéine, des tests préliminaires permettant de sélectionner la résine la plus adaptée à la séparation ont été conduits. En outre le pH du jus est proche des valeurs de pI recensées dans la littérature. La protéine d'intérêt au pH du milieu est retenue par la résine anionique Q Hyper Z, indiquant une majorité de charges négatives, nette ou spécifiquement distribuée en surface de la structure moléculaire.

Deux modes de contact ont été étudiés : le lit fixe et le lit expansé. Afin d'étudier l'effet de la concentration initiale en Rubisco sur le procédé, des dilutions du jus reconstitué centrifugé initial ont été réalisées, dans deux gammes différentes pour le contact en lit fixe et en lit expansé, avec des plages communes de travail, servant de référence. Cela implique que dans les différentes expériences réalisées la force ionique n'a pas pu être maintenue constante. L'impossibilité de disposer de la molécule purifiée (ou semi-purifiée) commercialement a représenté une limitation importante pour la maîtrise de conditions opératoires.

La caractérisation hydrodynamique des colonnes en lit fixé et en lit expansé à l'échelle de laboratoire montre globalement des valeurs de dispersion axiale faibles, mais supérieures dans le système en lit expansé. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, car les problèmes de dispersion axiale élevée dans les colonnes en lit expansé sont essentiellement signalés pour des diamètres de colonne supérieurs à 5 cm. Par ailleurs, l'observation du lit expansé montre une distribution claire de la porosité dans le lit, signalant une organisation des particules en fonction de leur taille.

Des courbes de percée ont été déterminées expérimentalement. Elles présentent toutes systématiquement un palier correspondant à une concentration en Rubisco d'environ 75% de celle d'alimentation. Cela met en évidence des mécanismes complexes de rétention de la Rubisco, pour lesquels des explications sont proposées. Ces mécanismes peuvent avoir une nature cinétique, mais ils mettent clairement en évidence une certaine sélectivité de la résine pour la Rubisco, au détriment d'autres molécules.

Globalement les capacités dynamiques à 10% obtenues en lit fixe sont supérieures à celles obtenues en lit expansé, mais qui restent dans le même ordre de grandeur. Les raisons de ce résultat n'ont pas été déterminées dans le cadre de ce travail. Néanmoins, malgré la complexité du milieu et surtout sa conductivité, les capacités dynamiques à 10% de la Rubisco sur le support Q Hyper Z obtenues sont dans le même ordre de grandeur que celles trouvées dans la littérature pour la BSA [Vergnault, 2004, Xiat et al., 2007]. Cette capacité dynamique diminue plus nettement lorsque le jus traité est non dilué, c'est-à-dire pour une conductivité 8 fois supérieure (17 mS.cm^{-1} , soit l'équivalent de 180 mmol.L^{-1} de NaCl). Du point de vue du procédé, ceci pourrait suggérer qu'une étape de dilution du jus avant son traitement est nécessaire, comme c'est souvent proposé dans la littérature. Il reste néanmoins possible de traiter le jus non dilué avec une capacité dynamique correcte.

Une fois chargée, la Rubisco est facilement éluée par modification de la force ionique. L'éluion étant facile, la réduction du débit d'alimentation de l'éluant permet à la fois d'augmenter le temps de séjour dans la colonne, nécessaire à la diffusion de la molécule, et de réduire fortement le volume d'éluion. Ainsi, l'éluion avec NaCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ à une vitesse de $0,4 \text{ cm.min}^{-1}$ permet de récupérer la totalité des protéines fixées et d'obtenir des facteurs de concentration très élevés jusqu'à 21 fois la concentration initiale. Outre la production de fractions très concentrées, un fractionnement adéquat de l'éluat en sortie de la colonne permet de récupérer des fractions d'une pureté beaucoup plus importante que celle de la Rubisco commerciale.

Enfin, les résultats obtenus dans ce chapitre montrent donc que le procédé de chromatographie d'échange d'ions avec Q Hyper Z peut être mis en œuvre en lit fixe ou en lit expansé pour la séparation de la Rubisco à partir du jus de luzerne centrifugé, permettant d'obtenir des fractions de concentration et de pureté élevées.

CHAPITRE IV.
ASPECTS FONDAMENTAUX DE
LA RETENTION DE RUBISCO

Sommaire

I. Aspects théoriques de la séparation chromatographique	147
I.1. Equilibre d'adsorption	150
I.1.1. Isotherme de Langmuir	151
I.1.2. Loi d'action de masse	152
I.2. Aspects cinétiques de l'échange d'ions	155
I.3. Théorie de l'équilibre	156
II. Isotherme d'échange d'ions de Rubisco dans le support Q Hyper Z	159
II.1. Protocole expérimental	159
II.2. Résultats	160
II.3. Application de la théorie de l'équilibre aux courbes de percée	163
II.3.1. Lit fixe	164
II.3.2. Lit expansé	166
II.4. Conclusion	168
III. Cinétique de rétention	169
III.1. Principe de détermination des constantes cinétiques	169
III.1.1. Bilans	170
III.1.2. Nombre de Sherwood	172
III.1.3. Coefficient de diffusion de la Rubisco en solution à dilution infinie	173
III.2. Protocole expérimental	173
III.3. Résultats	174
III.3.1. Observations générales	174
III.3.2. Estimation de k_f et D_s	175

I. Aspects théoriques de la séparation chromatographique

La performance d'un procédé de purification de protéines peut être en général caractérisée par le rendement d'extraction et la pureté de la protéine. Dans le cas d'une opération primaire de purification des critères supplémentaires comme la clarification et la réduction du volume total (la concentration de la protéine d'intérêt) sont importants pour l'efficacité du procédé.

Les procédés chromatographiques étant essentiellement dynamiques, lors de leur application quel que soit le mode de contact, la solution change de composition au cours de son passage à travers le lit de résine, en raison de la rétention des espèces. L'évolution des fronts de concentration le long de la colonne (et donc les courbes de percée), dépendent des propriétés des échangeurs d'ions (forme ionique, capacité, degré de polymérisation...), de la composition de la solution à l'entrée (complexité, charges, taille et concentration des molécules...), des conditions opératoires (débit d'alimentation, température, mélange...) et bien évidemment des interactions entre les différents constituants du système, autant à l'équilibre que dans leurs aspects dynamiques (cinétique).

L'objectif de la modélisation est donc de connaître le comportement des constituants au cours du procédé afin de prévoir quand aura lieu la fuite du constituant que l'on cherche à fixer au cours du procédé, les conditions et les temps d'élution de différentes espèces, la qualité de la séparation ... Ainsi, la modélisation permet de prédire les performances de séparation d'un système donné et de déterminer les conditions optimales de fonctionnement du procédé, nécessaires pour le changement d'échelle. La compréhension des mécanismes par la simulation des expériences, en réduisant notamment les coûts importants générés par celles-ci, est aussi un objectif majeur de la modélisation.

Néanmoins, le choix des modèles se fait sur la base de la compréhension des mécanismes de rétention élucidés expérimentalement et de l'évaluation des facteurs et des paramètres qui ont le plus d'influence sur le procédé. Ainsi, divers approches ont été développées dont les plus importantes sont la théorie de l'équilibre, la théorie des plateaux et les modèles basés sur les transferts, de part leurs apports, leur application pratique et leur capacité à être appliqués sur des milieux biochimiques complexes.

Le modèle de l'équilibre, un des premiers développés, permet de décrire le transport de solutés en colonne avec l'hypothèse que l'équilibre est atteint en tout point de la colonne et à tout instant, en ne prenant ainsi en compte que l'équation de l'isotherme d'équilibre. La théorie de l'équilibre est basée sur l'équation dite de propagation obtenue à partir d'un bilan de matière différentiel qui donne la vitesse à laquelle un front de concentration C se déplace dans la colonne. Cette vitesse est fonction de la dérivée partielle $\frac{\partial q}{\partial C}$, qui est la pente de l'isotherme. Cette théorie a été largement utilisée dans le cas de l'échange d'ions. Elle reste souvent appliquée et intéressante dans les procédés chromatographiques complexes [Nicolaos et al., 2001a et b], mais paradoxalement a été peu appliquée dans le domaine de bioproduits [Helfferich, 1995] malgré la complexité de description des mécanismes impliqués.

La théorie des plateaux, classiquement appliquée dans les opérations unitaires de transfert de matière, consiste à schématiser la colonne par une cascade de plateaux théoriques équivalents dans lesquels le rapport volumique de la phase liquide par la phase solide est constant, et pour lesquels l'équilibre est atteint instantanément (aucune limitation cinétique n'est prise en compte). La phase liquide est ainsi considérée comme une séquence de volumes finis qui, en se déplaçant dans le lit, atteignent une série d'équilibre chacun à un plateau. Le nombre de plateaux est alors un critère d'efficacité de la colonne. Il est ainsi possible de déduire le temps de rétention d'un soluté et le pouvoir de résolution de la colonne [Helfferich, 1995]. Ces théories ont été en outre appliquées à la chromatographie en lit expansé [Palsson et al., 2001].

Les modèles précédents considèrent que l'équilibre entre les phases est atteint instantanément et que l'écoulement dans la colonne est de type piston. En réalité, on n'observe pas les transitions nettes prévues lorsque l'on prend en compte ces approches. Les modèles dits cinétiques permettent de prendre en considération non seulement les limitations imposées par les transferts lents aux interfaces et dans les particules (notamment pour les molécules de grande taille, comme les protéines), mais aussi la dispersion que l'écoulement subit lors du déplacement de la solution dans la colonne. Ces modèles restent donc les plus intéressants et réalistes, bien que leur résolution nécessite des moyens de calcul beaucoup plus importants et surtout la connaissance approfondie de mécanismes cinétiques caractéristiques de chaque système analysé.

Finalement, cette approche revient à résoudre simultanément les bilans sur l'espèce d'intérêt dans les deux phases, liquide et solide, compte tenu des conditions aux limites imposées par le transfert de matière, et en considérant que localement les concentrations de l'espèce fixée et en solution sont à l'équilibre. Leur application à la chromatographie en lit expansé demande des adaptations pour prendre en compte la variation de porosité du lit [Li et al., 2004 ; Yun et al. 2005] ou la dispersion axiale particulière [Tong et al., 2003], mais reste difficile de par le besoin de prendre en compte correctement les mécanismes complexes de la rétention dans les milieux biologiques bruts.

La modélisation des procédés chromatographiques a ainsi été largement et finement développée dans la littérature suivant ces différentes théories et approches [Guiochon, 2002]. La plupart de ces modèles sont essentiellement utilisés pour décrire la rétention de biomolécules dans des conditions « idéales », c'est-à-dire, des milieux modèles synthétiques ou à des milieux biologiques ayant déjà subi une purification primaire.

Ainsi, un procédé de séparation de protéines par chromatographie en lit fixe sur un adsorbant poreux, est essentiellement déterminé, et donc modélisé, par la prise en compte de :

- L'équilibre du système,
- La cinétique des processus impliqués
- Le comportement hydrodynamique dans la colonne.

En général, pour étudier l'équilibre d'échange d'ions et déterminer l'(s) étape(s) de transfert limitante(s), la protéine pure d'intérêt est utilisée. Dans notre cas, il a été déjà indiqué que la seule Rubisco commerciale disponible est issue des épinards et est caractérisée par un point isoélectrique différent de la Rubisco de luzerne. De plus, elle n'est que partiellement purifiée, produite par précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Il a fallu ainsi produire la Rubisco de luzerne pure à partir du jus afin de réaliser ces caractérisations.

Le procédé de séparation de la Rubisco par échange d'ions a permis d'obtenir une fraction de Rubisco de luzerne pure à concentration élevée (cf Chapitre III, paragraphe IV.6.3). Ainsi, des expériences réalisées avec cette Rubisco produite ont permis d'aborder, dans une petite mesure des aspects plus fondamentaux de l'échange, comme l'équilibre et la cinétique. Ils aideront à comprendre les résultats obtenus lors de l'application du procédé. Dans cette

optique, et compte tenu du petit nombre d'essais qui ont pu être réalisés, notre première approche a consisté à utiliser la théorie de l'équilibre comme un outil de base pour appréhender les mécanismes de la séparation dans le milieu complexe qui est le jus de luzerne reconstitué et centrifugé.

I.1. Equilibre d'adsorption

Quel que soit le mode de contact entre la phase liquide et la phase solide (en lit fixe, en lit expansé ou en réacteur agité), la purification des protéines par un procédé chromatographique d'échange d'ions dépend entre autres de l'équilibre établi entre les deux phases. La description de cet équilibre comme distribution des espèces entre le support solide et la solution dans des conditions opératoires constantes (essentiellement température, pH et force ionique) est appelée isotherme d'adsorption. On notera q la concentration de la protéine sur le support et C sa concentration en solution.

L'équilibre d'adsorption des protéines fait toujours l'objet de nombreuses études [Iyer et al., 1999, Lim et al., 2005, Ladiwala et al., 2005, Su et Sun 2006] car dans le cas des milieux biologiques complexes, de nombreux paramètres restent mal connus. En effet, la charge de la protéine dépend du milieu dans lequel elle se trouve et ne peut être déterminée avec précision, une protéine occupe un nombre de sites variable en fonction de son orientation, des limitations stériques peuvent limiter le nombre de sites accessibles à la protéine... D'autre part, la nature hétérogène de la réaction établit des limitations cinétiques qui vont conditionner les capacités réelles de fonctionnement. Dans le cas des protéines, ces limitations peuvent être d'autant plus importantes que la molécule est grande, comme c'est le cas pour la Rubisco.

La modélisation des isothermes d'adsorption dans les milieux complexes trouve dans la littérature des approches franchement différentes quant à leur difficulté de traitement et d'application, comme dans leurs fondements. A côté du fort développement de modèles phénoménologiques, complexes, à caractère prédictif, d'autres modèles très classiques, simples d'application mais sans caractère prédictif, sont toujours régulièrement utilisés.

Les modèles phénoménologiques sont capables de prendre en compte des effets divers liés à la nature physico-chimique des solutions biochimiques et notamment la présence des

concentrations en sels variables. Parmi les premiers modèles à caractère prédictif on peut citer les modèles de déplacement stœchiométriques simples (basés sur la loi d'action de masse) [Fernandez et Carta, 1996] ou les modèles prenant en compte les interactions entre protéines fixées proches [Li et Pinto, 1994], considérées comme ayant un rôle important dans l'équilibre. Des modèles basés sur la théorie des colloïdes [Bowen et al., 1998] permettent le calcul, à priori, des constantes d'équilibre à partir des paramètres mesurables comme la taille de la protéine, le potentiel zêta de la protéine et de l'échangeur et la concentration d'électrolyte. Actuellement, des modèles dits thermodynamiques sont développés. Ces modèles sont basés sur la description statistique des interactions électrostatiques entre la protéine et la particule [Su et Sun, 2006]. Ils sont capables de décrire l'équilibre d'échange d'ions des protéines et de prendre en compte les interactions entre protéines. Enfin, le modèle d'action de masse stérique (SMA) [Brooks et Cramer, 1992] est devenu un des modèles de base dans la description des équilibres d'échange des protéines dans des milieux à force ionique élevée. Cependant, son application reste controversée [Chen et al., 2006, Barz et al., 2010] malgré l'extension croissante de son utilisation. Des améliorations nécessaires continuent à être apportées à ce modèle comme par exemple la prise en compte des limitations stériques de la protéine en solution [Lim et al, 2005].

Dans tous les cas, il est nécessaire de signaler que la plupart de ces modèles ont été développés dans des milieux synthétiques, très simplifiés par rapport aux milieux biologiques, notamment en ce qui concerne le nombre de biomolécules présentes. Par ailleurs, la quasi-totalité des travaux a été faite sur l'albumine de sérum bovin (BSA) comme protéine modèle et l'application aux milieux réels reste rare. Ainsi, dans de nombreuses études sur les applications de la chromatographie d'échange d'ions aux milieux biochimiques, les isothermes classiques de Langmuir et Freundlich restent très utilisées [Chang et al. 2006 ; Bayramoglu et al., 2007] bien qu'elles ne soient pas considérées en général comme décrivant un comportement physique quelconque (malgré leur origine fondée) mais plutôt comme de simples descriptions mathématiques.

I.1.1. Isotherme de Langmuir

Ce modèle décrit l'adsorption non linéaire d'un composé (équation IV-1). D'origine phénoménologique, il a été développé par Langmuir en prenant les hypothèses suivantes :

- La surface du support solide est uniforme

- L'adsorption se fait en monocouche, avec une capacité maximale Q
- Il n'y a pas d'interactions entre les molécules adsorbées : une molécule par site

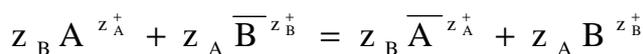
$$q = \frac{Q \cdot K_L \cdot C}{1 + K_L \cdot C} \quad \text{Equation IV-1}$$

K_L la constante d'équilibre d'adsorption spécifique au composé et à l'adsorbant en question.

Cette isotherme a été très utilisée dans la littérature de par sa capacité à représenter mathématiquement l'isotherme favorable, y compris dans les systèmes multicomposants [Costa et Rodrigues, 1985] bien que souvent les hypothèses de base ne soient pas respectées. De ce fait, ce modèle reste très limité en termes de prédiction et d'extrapolation, les paramètres du modèle Q et K_L devant être déterminés pour chaque condition opératoire. Depuis quelques années, sa généralisation mathématique aux isothermes défavorables (dites anti-Langmuir) [Nowak et al., 2007 ; Pedruzzi et al. 2008] a par ailleurs l'avantage de s'adapter facilement à la description de tout type de système mono et multi-composants [Mazotti, 2006].

I.1.2. Loi d'action de masse

En chromatographie d'échange d'ions l'équilibre peut être représenté par la loi d'action de masse : les charges portées par l'échangeur d'ions sont compensées par des contre-ions de charge opposée et en nombre suffisant pour assurer l'électroneutralité du système. Au contact d'une solution contenant des ions de même charge que les contre-ions, le solide va fixer ces ions en libérant ses propres contre-ions. Pour satisfaire les conditions d'électroneutralité, un équivalent ion libéré par l'échangeur doit être remplacé par un équivalent ion de la solution. L'échange se fait de façon stœchiométrique. Si on considère un échange binaire entre A (contre-ion) et B (ion en solution de même charge que A), la réaction s'écrit pour des cations :



Sur le solide En solution Sur le solide En solution

Où z_A et z_B représentent respectivement les valences des ions A et B et où les espèces surlignées représentent les ions fixés sur le support solide.

La constante d'équilibre de cette réaction est donnée par l'équation IV-2, dans un milieu considéré idéal (coefficients d'activité égaux à 1).

$$K_{A/B} = \frac{\overline{C_A}^{z_B} \times C_B^{z_A}}{\overline{C_B}^{z_A} \times C_A^{z_B}} = \frac{\left(\frac{\overline{C_A}}{C_A}\right)^{z_B}}{\left(\frac{\overline{C_B}}{C_B}\right)^{z_A}} \quad \text{Equation IV-2}$$

$K_{A/B}$ est défini aussi comme un coefficient de sélectivité qui peut être exprimé en utilisant les fractions molaires.

En travaillant à température et pression constantes, les deux variables qui décrivent le système sont la concentration de la solution et la répartition des espèces entre les deux phases. Pour l'espèce A, les fractions molaires sont données par les équations IV-3 et IV-4 et pour B par les équations IV-5 et IV-6 :

$$x_A = \frac{C_A}{C_0} \quad \text{Equation IV-3}$$

$$y_A = \frac{\overline{C_A}}{Q} \quad \text{Equation IV-4}$$

$$x_B = \frac{C_B}{C_0} \quad \text{Equation IV-5}$$

$$y_B = \frac{\overline{C_B}}{Q} \quad \text{Equation IV-6}$$

Avec C_0 égale à la concentration totale de la solution ($C_0 = C_A + C_B$) et Q la concentration totale des ions fixés ($Q = \overline{C_A} + \overline{C_B}$) sur le support solide. Ainsi on obtient :

$$K_{A/B} \left(\frac{Q}{C_0}\right)^{z_A - z_B} = \left(\frac{y_A}{x_A}\right)^{z_B} \left(\frac{x_B}{y_B}\right)^{z_A} \quad \text{Equation IV-7}$$

Dans le cas d'un échange binaire entre deux ions monovalents on a $z_A = z_B = 1$. Par ailleurs, $x_A + x_B = y_A + y_B = 1$. L'équation IV-7 devient alors :

$$y_A = \frac{K_{A/B} x_A}{1 + x_A (K_{A/B} - 1)} \quad \text{Equation IV-8}$$

La figure IV-1 représente y_A en fonction de x_A pour différentes valeurs de $K_{A/B}$. On parle d'isotherme favorable pour $K_{A/B} > 1$ qui est de forme concave, linéaire pour $K=1$ et défavorable pour $K_{A/B} < 1$ avec une forme convexe.

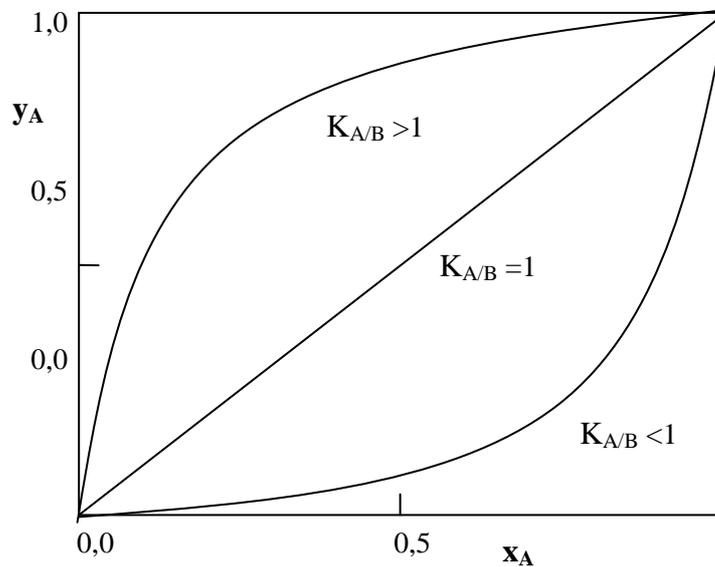
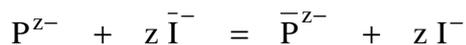


Figure IV-1. Effet du coefficient de sélectivité $K_{A/B}$ sur la forme de l'isotherme d'échange d'ions.

Dans le cas plus complexe des protéines, un échange entre la protéine P de charge négative z^- et un contre-ion monovalent I^- est décrit par la réaction suivante :



L'application de la loi d'action de masse donne :

$$K_{P/I} = \frac{q \cdot C_I^z}{C \cdot \bar{C}_I^z} \quad \text{Equation IV-9}$$

Si l'on définit la capacité du support en équivalent ion q_s tel que $q_s = z \times q + \overline{C_I}$ et le nombre maximum de protéines qui peuvent se fixer par q_z tel que $q_z = \frac{q_s}{z}$, on peut alors exprimer la concentration de la protéine en solution C (à partir de l'équation IV-9) en fonction de la concentration de la protéine sur le support solide et la concentration en solution du contre-ion C_I .

$$C = \frac{q \cdot C_I^z}{K_{P/I} \cdot z^z \cdot (q_z - q)^z} \quad \text{Equation IV-10}$$

Ce modèle est un des plus simples permettant d'avoir un certain caractère prédictif, notamment par une prise en charge de la concentration de contre-ions présents dans le milieu [Fernandez et Carta, 1996].

I.2. Aspects cinétiques de l'échange d'ions

Au cours du passage de la solution dans la colonne, l'équilibre entre les phases mobile et stationnaire n'est pas instantané. Comme dans tout processus hétérogène, la vitesse contrôlant le partage est celle de l'étape la plus lente, parmi les étapes de transfert et de réaction impliquées. La figure IV-2 représente des particules poreuses, dans un lit chromatographique. Les différents mécanismes de transfert possibles ainsi que leur localisation dans le lit et au sein des particules, sont indiqués sur cette figure.

Si les mécanismes de transport externe sont assez bien connus, et le modèle de gradient linéaire est couramment utilisé dans tous les modèles, le transport à l'intérieur de la particule peut répondre à des mécanismes différents, dépendant entre autre du type de particule. Les modèles appliqués dans la chromatographie en lit expansé [Tong et al., 2003 ; Li et al., 2004 ; Yun et al., 2005] sont équivalents à ceux développés pour les systèmes en lit fixe. Ainsi le transfert pourrait avoir lieu à travers les pores du solide (le gradient de concentration étant donné par la différence de concentration de l'espèce en solution dans les pores de l'échangeur), de site en site de l'échangeur (le gradient étant alors donné par les différences de concentration des molécules fixées), ou considérant la particule comme un milieu pseudo-homogène où la molécule diffuserait avec un coefficient de diffusion intra-particulaire. Cette

dernière approche est une des plus fréquentes en adsorption des protéines [Tsou et Graham, 1985, Graham et al., 1987 , Fernandez et Carta, 1996].

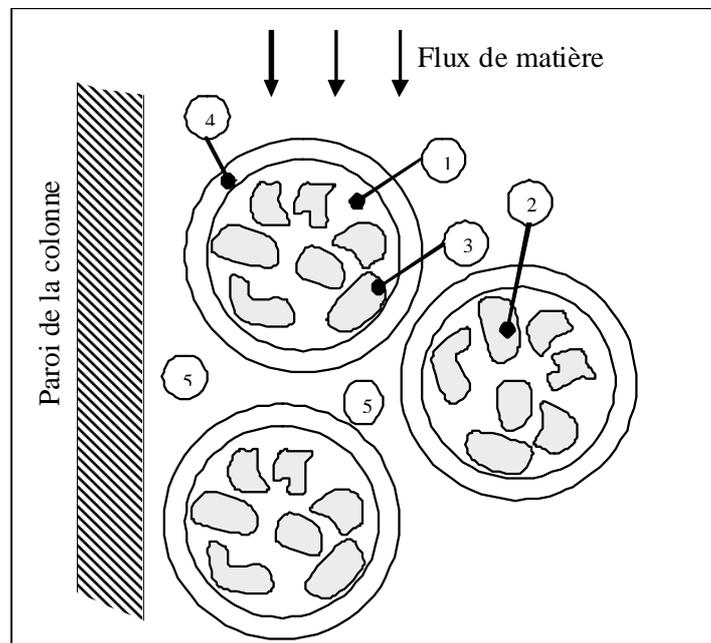


Figure IV-2. Représentation schématique des particules disposées en colonne chromatographique montrant les différents mécanismes de transport et leur zone de localisation : (1) diffusion à travers les pores, (2) diffusion dans la phase solide, (3) réactivité chimique sur les sites de la phase solide, (4) transfert de matière externe et (5) zone de mélange liquide-liquide.

Par ailleurs, les vitesses de réaction sont toujours considérées instantanées par comparaison aux mécanismes de transfert et donc sans intérêt pour la description du système. Cela est d'autant plus vrai que les espèces concernées sont des protéines, molécules de grande taille et donc caractérisées par des coefficients de diffusion faibles.

I.3. Théorie de l'équilibre

Dans le cadre de ce travail, les résultats préliminaires obtenus de l'isotherme seront utilisés dans la théorie de l'équilibre afin d'apporter une première analyse aux courbes de percée obtenues expérimentalement. Les principales hypothèses du modèle sont donc :

- Les équilibres d'échange d'ions sont atteints instantanément en tout point de la colonne,
- Le volume du lit est constant (pas de gonflement),
- L'écoulement de la solution dans la colonne est de type piston,

- Le système est isotherme.

Avec ces hypothèses, pour une colonne chromatographique d'échange d'ions de porosité ε , traversée par une solution, à une vitesse d'écoulement interstitielle u , qui échange de la matière avec le support, le bilan de matière pour une biomolécule donnée dans une tranche de la colonne de hauteur ∂z , s'écrit :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad \text{Equation IV-11}$$

Où C est la concentration de l'espèce en solution et q sa concentration sur la phase solide. A partir de l'équation IV-11 il est possible de déduire la vitesse u_c à laquelle se déplace un front de concentration constante donnée dans la colonne :

$$u_c = \left(\frac{\partial z}{\partial t} \right)_c = \frac{u}{1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{\partial q}{\partial C}} \quad \text{Equation IV-12}$$

Pour une porosité ε constante le long de la colonne, l'équation IV-12 montre que la vitesse de propagation d'une onde de concentration C dépend de $\frac{\partial q}{\partial C}$, donc de la relation d'équilibre

$q = f(C)$, dont $\frac{\partial q}{\partial C}$ est la pente.

Ainsi, en réponse à l'application d'une solution de concentration C en entrée de colonne, le système développe en général une onde encadrée de deux paliers qui va se propager tout le long de la colonne. La distribution interne des concentrations dans la colonne à un instant donné $C_t = f(z)$, est appelée profil de concentration dans la colonne. L'histoire des concentrations est une représentation de l'évolution de C en fonction du temps (ou du volume passé), pour une position donnée z de la colonne. Quand l'histoire est représentée en sortie de colonne, on parle donc de courbe de percée.

L'évolution de la distribution des concentrations dans la colonne peut donc être déduite de la relation $q = f(C)$ donnant lieu à trois sortes de profils représentés dans la figure IV-3 :

- Pour une isotherme linéaire, $\frac{\partial q}{\partial C}$ est une constante, ainsi toutes les concentrations se déplacent dans la colonne à la même vitesse. Le profil de concentration ne se déforme pas et reste identique à celui de l'injection. La forme du front dans ce cas ne dépend que des aspects hydrodynamiques et de transfert (figure IV-3a).

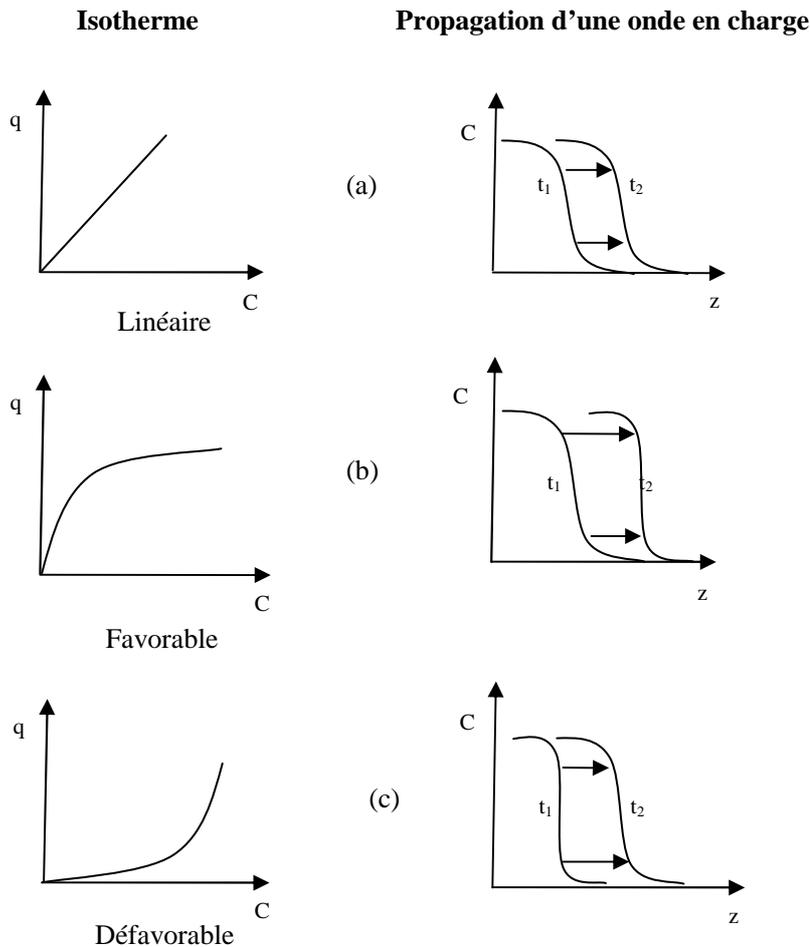


Figure IV-3. Schéma de propagation d'une onde lors de l'étape de charge d'une colonne chromatographique : Représentation du profil de concentration à deux instants successifs t_1 et $t_2 > t_1$, en fonction du profil de l'isotherme d'adsorption [Helfferich, 1993].

- Pour une isotherme défavorable, $\frac{\partial q}{\partial C}$ augmente avec la concentration et la vitesse du front diminue avec la concentration, c'est-à-dire que les fortes concentrations ont des vitesses plus faibles, le profil a ainsi tendance à s'étaler. On parle comportement dispersif (figure IV-3c)

- Pour une isotherme favorable, $\frac{\partial q}{\partial C}$ diminue avec la concentration et inversement la vitesse de propagation augmente avec la concentration c'est-à-dire que les fortes concentrations se déplacent plus rapidement que les faibles, on parle de comportement compressif (figure IV-3b).

II. Isotherme d'échange d'ions de Rubisco dans le support Q Hyper Z

Pour déterminer le modèle qui décrit l'équilibre entre la Rubisco de luzerne et le support anionique Q Hyper Z, l'isotherme d'adsorption expérimentale est réalisée en batch. Pour cela, un échantillon très pur de Rubisco concentrée produit par le procédé de séparation en lit expansé et par élution en lit fixe à faible vitesse superficielle a été utilisé. La concentration initiale et la salinité de l'échantillon mère sont ainsi bien connues.

II.1. Protocole expérimental

La détermination expérimentalement de l'isotherme d'échange d'ions a été réalisé en batch. Pour cela, plusieurs récipients contenant un volume de solution connu et de masses croissantes de résine sont utilisés. Ce mode de travail permet d'assurer une force ionique équivalente dans tous les contacteurs. Ainsi des masses bien connues (allant de 0,025 à 0,25 g) du support échangeur d'anions Q Hyper Z préalablement réhydraté et filtré, sont pesées à l'aide d'une balance de précision et placées dans des tubes à essai.

La solution de Rubisco utilisée pour la détermination de l'isotherme et l'étude de la cinétique est obtenue par dilution de la fraction de Rubisco purifiée à partir du procédé d'échange d'ions en lit expansé (Chapitre III, paragraphe IV.6.3). Cette fraction étant très concentrée (65 g.L⁻¹), elle a donc été diluée 30 fois, à l'eau ultra-pure, avant d'être utilisée. Elle a été ensuite analysée par la méthode HPLC-SEC pour déterminer sa nouvelle concentration en Rubisco. La solution ainsi obtenue est caractérisée par une concentration en Rubisco de 2,2 g.L⁻¹. Compte tenu de l'origine de cette fraction et de la dilution effectuée, sa concentration en NaCl peut être estimée à 0,016 mol.L⁻¹. Un volume de 4,00 mL précisément mesuré est alors ajouté dans chaque tube. Les tubes sont ensuite placés 6 heures sur une table d'agitation tournante. L'expérience est réalisée à température ambiante. Dans le tableau IV-1, l'ensemble des conditions opératoires sont recensées.

Tableau IV-1. Conditions expérimentales de la solution de Rubisco utilisée pour la détermination en batch de l'isotherme d'équilibre de la Rubisco avec le support Q Hyper Z.

Concentration initiale de Rubisco en solution (g.L⁻¹)	2,2
Concentration en NaCl estimée à partir de la dilution (mol.L⁻¹)	0,016
Conductivité (mS.cm⁻¹)	1,02
pH	6
Volume de la solution de Rubisco/tube (mL)	4,00
Masse Q Hper Z/tube (g)	0,025 à 0,25

La solution de Rubisco utilisée dans ces expériences étant assez pure, un essai de suivi des concentrations par mesure directe de l'absorbance à 280 nm et, simultanément, par HPLC-SEC a été effectué (cf paragraphe III.4.1). Ainsi, l'absorbance mesurée est corrélée à la concentration par une droite d'étalonnage donnée par l'équation IV-13.

$$Abs_{280nm} = 1,8 C_{Rubisco} \quad \text{Equation IV-13}$$

Au bout de 6 heures de contact, l'équilibre a été considéré atteint, les deux phases sont séparées et la concentration de Rubisco dans la solution mesurée. La quantité fixée q a été déterminée par bilan de matière (équation IV-14).

$$q = \frac{V_L}{V_R} (C_0 - C_f) \quad \text{Equation IV-14}$$

Avec V_L, V_R les volumes de solution et d'adsorbant et C_0 et C_f concentrations initiale et finale de Rubisco dans la solution.

II.2. Résultats

La figure IV-4 représente la concentration de Rubisco fixée dans la résine en fonction de la concentration en solution à l'équilibre. L'allure de cette isotherme montre que l'adsorption de la Rubisco dans ces conditions est favorable et qu'elle ne présente pas de comportements permettant de supposer la présence de différents types d'interactions. Sur la même figure, une

isotherme théorique basée sur le modèle de Langmuir est aussi représentée. Les paramètres du modèle, obtenus par approximation paramétrique de la courbe théorique aux résultats expérimentaux, sont la capacité maximale d'adsorption Q ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ d'échangeur) et la constante de d'adsorption K_L ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$). On trouve ainsi une capacité maximale $Q = 224 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et $K_L = 21 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$.

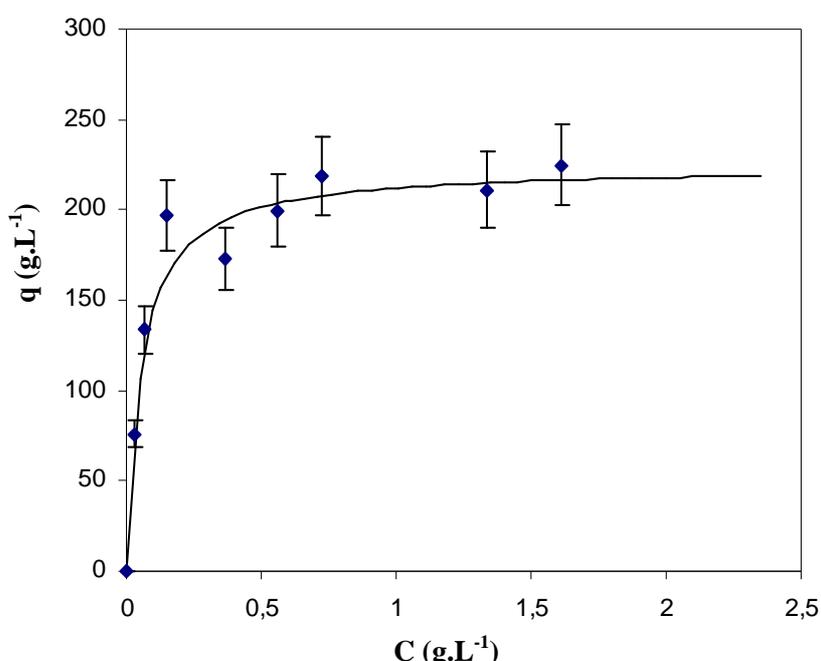


Figure IV-4. Isotherme d'adsorption de la Rubisco de luzerne pure sur l'échangeur anionique Q Hyper Z. Détermination en batch à partir d'une solution de Rubisco pure à $C_0 = 2,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ et une concentration en NaCl $0,016 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (conductivité de $1,02 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$) à température ambiante et à pH 6.

La capacité maximale du support Q Hyper Z déterminée expérimentalement dans ces conditions est supérieure à la capacité maximale du même support pour la fixation de la BSA donnée par le fournisseur de la résine ou celles trouvées dans la littérature, qui est plutôt de l'ordre de $85 \text{ g}_{\text{BSA}}/\text{L}_{\text{Q Hyper Z}}$ [Vergnault 2004, Xia et al., 2007]. Cet écart pourrait être expliqué par la différence du poids moléculaire des deux protéines (66 kDa pour la BSA, 570 kDa pour la Rubisco) et la différence du nombre de charges portées par l'une et l'autre dans les conditions de pH de l'expérimentation.

Les résultats présentés dans le chapitre précédent montraient que pour toutes les courbes de percée déterminées expérimentalement, un palier de concentration de Rubisco est atteint en sortie de colonne à environ $C/C_0 = 0,75 (\pm 0,5)$, et ce quelle que soit la concentration initiale

en Rubisco du jus. L'allure de ces courbes ne peut pas donc être représentée par une seule relation d'équilibre et devrait prendre en compte la compétitivité des différentes espèces dans le jus pour les sites de l'échangeur (par exemple, par l'utilisation d'une isotherme de Langmuir multi-composant). Or la complexité du milieu rend impossible l'identification de toutes les espèces compétitives et, donc, le calcul des isothermes d'équilibres correspondants. A partir de cette constatation, une courbe reliant la concentration de Rubisco dans la résine en fonction de la concentration en solution a été établie à partir des courbes de percée obtenues en lit fixe, et en considérant uniquement la masse de Rubisco chargée lors de l'atteinte du palier de concentration ($\frac{C}{C_0} = 0,75 \pm 0,5$). Elle est représentée dans la figure IV-5.

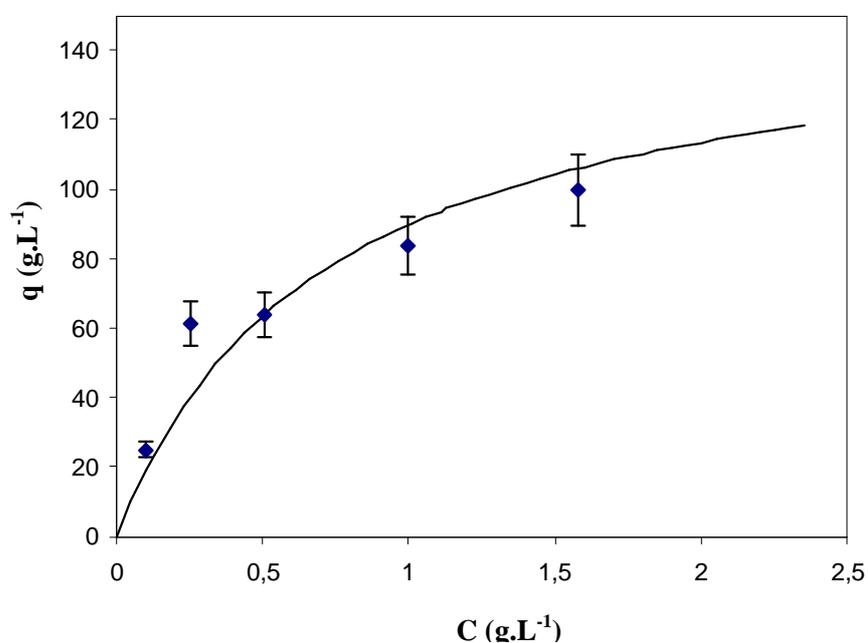


Figure IV-5. Courbe représentant la masse de Rubisco fixée dans la résine en fonction de la concentration de Rubisco en sortie de colonne. La masse fixée est déterminée à partir des courbes de percée expérimentales en lit fixe lorsque la concentration de Rubisco en sortie de colonne atteint 75% de la concentration d'alimentation.

Bien évidemment, cette courbe ne peut pas être définie comme une pseudo-isotherme, puisque la force ionique dans les différents points qui la composent n'est pas la même (ni le reste de la composition de la solution). Tout de même, elle permet d'apercevoir la compétition entre les différentes biomolécules dans le milieu, qui est probablement supérieure à celles des sels (dans les conditions de travail). Ainsi la figure IV-5 montre que :

- Pour la solution à $2,2 \text{ g.L}^{-1}$: la rétention de Rubisco à partir du jus vert est inférieure à celle déterminée par l'isotherme théorique (figure IV-4).

- Pour les solutions de concentration inférieure à 1 g.L^{-1} : les solutions sont préparées par dilution du jus reconstitué centrifugé (tableau IV-2). Leur conductivité est donc fortement réduite, elle est même inférieure à celle de la solution pure utilisée pour la détermination de l'isotherme théorique (tableau IV-2). Cependant, la quantité de Rubisco retenue dans les conditions réelles d'application du procédé est très inférieure à la charge théorique donnée par l'isotherme, représentée dans la figure IV-4. Cela indique nécessairement que d'autres molécules que les sels sont en compétition forte avec la Rubisco pour les sites de la résine.

Tableau IV-2. Comparaison des conditions de concentration et de conductivité de la solution de Rubisco pure utilisée pour l'isotherme théorique et du jus à différentes dilutions utilisé dans les expériences de charge en lit fixe.

	Dilution	Concentration de Rubisco (g.L^{-1})	Conductivité (mS.cm^{-1})
Jus de luzerne reconstitué centrifugé	1:100	0,13	0,21
	1: 40	0,34	0,38
	1:20	0,67	0,92
	1:10	1,33	1,21
	1:6	2,10	2,17
Fraction éluée de Rubisco pure	1:30	2,2	1,02

Ainsi, et malgré le manque de justification théorique, l'ajustement de la courbe de la figure IV-5 à une équation de type Langmuir permet de déterminer deux paramètres $Q=152 \text{ g. L}^{-1}$ échangeur et $K=1,4 \text{ L.g}^{-1}$. Bien évidemment, ces paramètres n'ont aucune valeur physique stricte. Néanmoins, tout comme l'isotherme d'équilibre, ils seront utilisés dans le cadre de la théorie de l'équilibre afin de déterminer les temps stœchiométriques théoriques de chaque essai et les comparer aux résultats expérimentaux.

II.3. Application de la théorie de l'équilibre aux courbes de percée

En disposant des paramètres décrivant l'équilibre d'échange de Rubisco sur la résine Q Hyper Z et la rétention de Rubisco sur le support solide dans les conditions du procédé, il est intéressant d'analyser les écarts qu'on peut avoir entre les résultats prédits par l'isotherme d'équilibre et ceux qui considèrent la complexité du milieu. Le fait de ne pas disposer de la

protéine pure en quantité suffisante, ne permet pas de comparer en soit les courbes de percée réelles, obtenues avec les jus, et celles qu'on pourrait obtenir avec des solutions synthétiques, comme il est habituellement fait dans la littérature. A ce titre, la théorie de l'équilibre est utilisée pour interpréter les principales limitations de la séparation dans le cas de solutions réelles.

L'approche est toujours la même : dans un premier temps, les fonctions $q = f(C)$ sont utilisées pour calculer la dérivée. Puis, les vitesses des fronts de concentration sont déterminées et appliquées au calcul du temps nécessaire à la percée, en fonction de la hauteur de la colonne. L'étude est réalisé sur les courbes de percée obtenues en lit fixe et celles déterminées en lit expansé.

II.3.1. Lit fixe

Les temps de percée calculés pour les différentes concentrations utilisées dans les expériences de charge en lit fixe sont regroupés dans le tableau IV-3. Comme les deux courbes de rétention de la Rubisco sont favorables, on constate que $\frac{\partial q}{\partial C}$ diminue quand la concentration augmente, c'est-à-dire, que les fortes concentrations se déplacent plus rapidement que les faibles. Cela est observable sur les courbes de percée en lit fixe, bien que les effets des limitations au transfert puissent aussi justifier ce comportement.

Tableau IV-3. Temps de percée théorique déterminé à partir de la théorie de l'équilibre pour les expériences de charge en lit fixe avec des concentrations de Rubisco différentes (H=0,03 m, cf Chapitre III, paragraphe IV.1).

C_0 (g.L ⁻¹)	$\partial q / \partial C$ (*)		Temps de percée (min)	
	Isotherme d'équilibre	Valeurs déterminées à partir des courbes de percée en lit fixe	Isotherme d'équilibre	Valeurs déterminées à partir des courbes de percée en lit fixe
0,13	311,8	149,1	330,8	158,6
0,34	73,0	98,9	78,1	105,4
0,67	21,0	57,6	23,0	61,7
1,33	5,45	25,7	6,5	28,0
2,10	2,3	13,7	3,1	15,2

(*) Valeurs déterminées par dérivation de la courbe théorique et pour chaque concentration donnée

On constate que les temps de percée déterminés à partir de l'isotherme d'équilibre vont de 330,8 à 3,1 minutes montrant ainsi des valeurs très élevées pour les faibles concentrations et

des valeurs très faibles pour les fortes concentrations. Ceci s'explique par la forme très favorable, presque « rectangulaire » de l'isotherme d'équilibre (figure IV-4). Dans le cas de la courbe établie avec les rétentions obtenues en lit fixe, l'écart entre les temps de percée des différentes concentrations est moins important puisque l'allure la courbe (figure IV-5) correspond à une affinité moindre. Physiquement les différences entre les temps de percée calculés par l'une ou l'autre des courbes sont dues aux écarts entre la quantité la plus importante de Rubisco que la résine peut retenir dans chaque cas, qui est forcément plus importante en absence de composés compétiteurs (cas de l'isotherme), et à l'affinité de la résine pour la Rubisco, qui est fortement diminuée par la présence de plusieurs composés dans le milieu. Ainsi, contrairement aux conditions « idéales » de l'isotherme d'équilibre, les paramètres déterminés à partir des courbes de percée prennent en compte la présence d'autres composés et la salinité du milieu, ce qui les diminue considérablement.

Lorsqu'on superpose ces temps de percée théoriques calculés, avec les courbes de percée expérimentales, les prédictions de l'isotherme d'équilibre sont très loin des conditions réelles (figure IV-6). Bien évidemment, les valeurs obtenues par l'utilisation de la courbe $q = f(C)$ sont plus cohérentes (puisque directement déduites), mais il faut les considérer uniquement comme une référence.

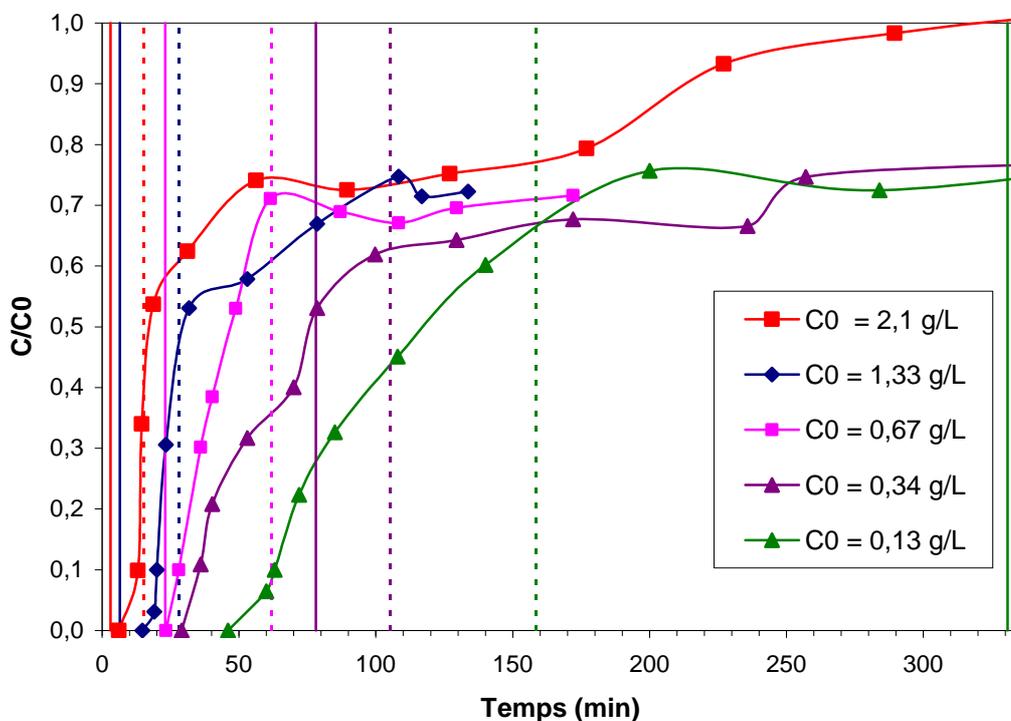


Figure IV-6. Courbes de percée de Rubisco expérimentales, déterminées avec des jus de luzerne reconstitués centrifugés à différentes dilutions sur une colonne de Q Hyper Z en lit

fixe. En ligne continue : temps de percée théoriques déterminés avec l'isotherme d'équilibre ; en ligne discontinue : temps de percée de référence (déterminés à partir de valeurs de rétention réelles).

Enfin, la détermination de l'isotherme d'équilibre a été réalisée à une force ionique de $1,02 \text{ mS.cm}^{-1}$ (tableau IV-1). Par conséquent, on pourrait s'attendre à ce que le temps de percée de la courbe déterminée dans ces conditions de conductivité (donc la courbe de percée du jus à $0,67 \text{ g.L}^{-1}$, d'après le tableau IV-2) soit bien représenté. Or les résultats montrent un écart important entre la courbe de percée expérimentale et le temps de percée déterminée par l'isotherme (figure IV-6). Ceci conforte l'idée que ce n'est pas l'effet des sels, mais plus celui des autres biomolécules qui altère le comportement du système par rapport aux conditions « idéales ».

II.3.2. Lit expansé

La détermination de la vitesse de propagation, et du temps de percée théorique, pour les conditions étudiées en lit expansé se fait de la même façon. Néanmoins, dans le cas du lit expansé, il a été constaté qu'un profil de porosité est établi tout le long du lit, qui résulte de la classification des particules (cf Chapitre III, paragraphe IV.3). Ainsi dans l'expression de vitesse de propagation d'une concentration donnée (équation 12), le terme $\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}$ varie en fonction de la position dans le lit. La vitesse de propagation d'une concentration de Rubisco donnée, en lit expansé peut être calculée soit :

- En considérant une porosité moyenne sur tout le lit qui est déterminée par la différence entre le volume totale du lit expansé et le volume de résine introduite rapportée au volume total du lit expansé.
- En subdivisant le lit en éléments de volume, de hauteur Δz , caractérisés par une porosité croissante avec la hauteur. Le temps de percée de la concentration est alors calculé pour chaque plateau et la somme donne le temps de percée théorique à la hauteur finale du lit. Celui-ci est comparé à la courbe de percée expérimentale. Dans une première approche, nous avons considéré une variation linéaire de la porosité. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV-4.

Tableau IV-4. Temps de percée théorique déterminé à partir de la théorie de l'équilibre pour les expériences de charge en lit expansé avec des concentrations de Rubisco différentes ($H=0,21$ m, cf Chapitre III, paragraphe IV.1).

C_0 (g.L ⁻¹)	Temps de percée			
	Porosité moyenne		Porosité variable	
	Isotherme d'équilibre	Valeurs déterminées à partir des courbes de percée en lit fixe	Isotherme d'équilibre	Valeurs déterminées à partir des courbes de percée en lit fixe
1,13	12,0	42,5	11,9	41,9
1,55	7,9	29,5	7,8	29,1
2,20	5,6	20,0	5,5	19,8
13,3	2,7	16,9	2,8	16,7

Globalement, on observe la même tendance que pour les expériences en lit fixe. En effet pour ces concentrations relatives fortes, les temps de percée calculés à partir des valeurs de q déterminées des courbes de percée sont plus élevés que les temps de percée déterminés à partir de l'isotherme d'équilibre.

Par ailleurs, on constate que les temps de percée théoriques calculés en tenant compte de la variation de la porosité dans le lit sont légèrement inférieurs à ceux déterminés avec une porosité moyenne. Il peut être facilement prouvé que cet écart dépend de la loi de variation de la porosité considérée dans le lit. Dans le cas de ce travail, une variation linéaire a été considérée conduisant aux écarts minima. Yun et al. (2004a et b) ont montré que la distribution est proche de la linéarité, mais la porosité augmente plus rapidement en bas de la colonne qu'en haut.

Comme précédemment, les temps de percée déterminés sont comparés aux courbes de percée expérimentales. On a considéré les valeurs trouvées avec un taux de porosité moyen vu le faible écart constaté. La figure IV-7 permet de visualiser les résultats expérimentaux et théoriques.

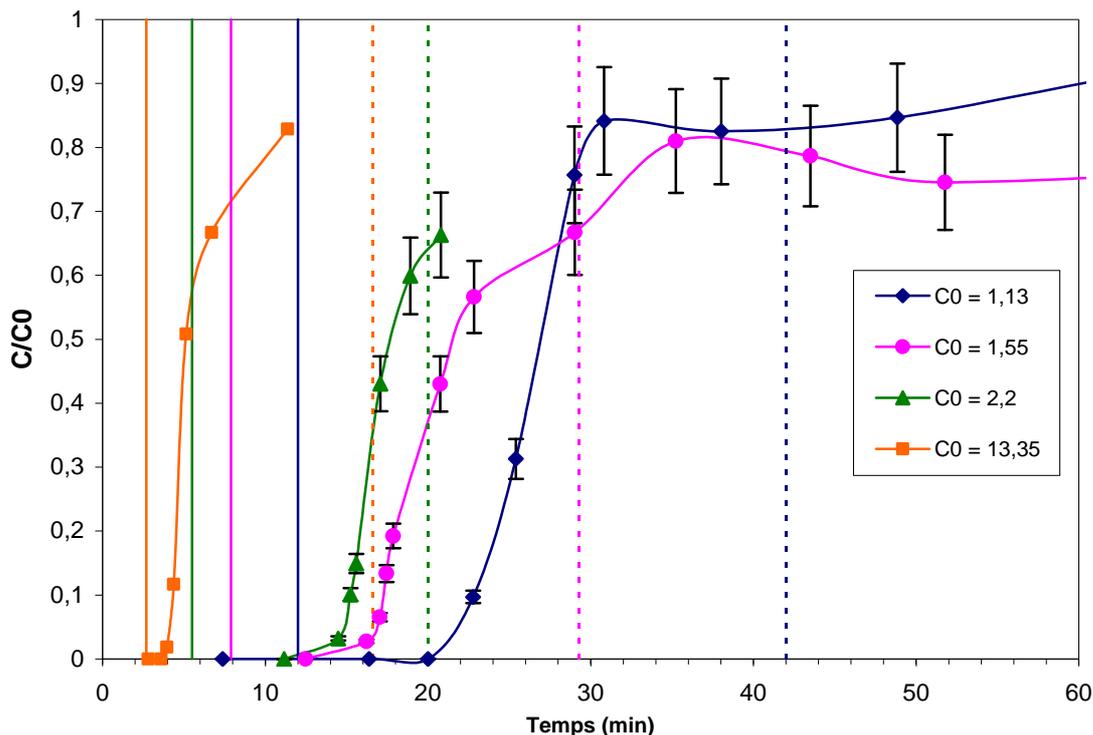


Figure IV-7. Courbes de percée expérimentales de la Rubisco du jus vert de luzerne sur une colonne de chromatographie d'échange d'ions en lit expansé remplie du support Q Hyper Z. En ligne continue temps de percée théorique dans les conditions de l'équilibre, en ligne discontinu temps de percée théorique dans les conditions de pseudo-saturation.

II.4. Conclusion

Les résultats obtenus aussi bien dans le cas du lit expansé que dans le cas du lit fixe montrent l'incapacité de l'isotherme d'équilibre de rendre compte des courbes de percée expérimentales. Ce résultat banal a priori souligne la difficulté de simuler le comportement des milieux réels et ce en considérant uniquement les modèles les plus élémentaires. La présence d'autres biomolécules, peut être plus que la présence de sel, limite la capacité du support pour la protéine d'intérêt mais modifie aussi l'affinité du support (très grande en milieu synthétique) pour la Rubisco.

L'utilisation de la théorie de l'équilibre à partir d'une courbe $q = f(C)$ déterminée expérimentalement en lit fixe permet, évidemment, de mieux rendre compte des résultats, montrant l'applicabilité du modèle à ces milieux dès lors que les paramètres alimentés sont cohérents avec les phénomènes observés. Les temps de percée théoriques ainsi déterminés pour le lit expansés sont moins adaptés que ceux pour le lit fixe, mais restent proches des

réels, indiquant que les échanges sont essentiellement les mêmes dans les deux types de colonne, dans les conditions de travail utilisées.

La prise en compte de la variation de la porosité dans le lit expansé peut modifier légèrement ces résultats, voire les améliorer. Le facteur $\frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}$ est par ailleurs beaucoup plus petit dans le cas du lit expansé (diminuant de 0,8 en bas de colonne jusqu'à 0,2 en haut) que dans le lit fixe (normalement constant et égal à 1,5). Cela a comme conséquence des vitesses de fronts qui sont systématiquement plus élevées en lit expansé qu'en lit fixe mais aussi une légère dissymétrie des courbes de percée en lit expansé puisque la vitesse d'un front de concentration varie avec la hauteur dans le lit différemment selon la concentration. En effet, à partir de l'isotherme de la Rubisco, il a été constaté que la vitesse d'un front de faible concentration triple sa valeur entre le bas et le haut de la colonne, alors que la vitesse d'un front de concentration élevée multiplie sa valeur par 1,5.

III. Cinétique de rétention

L'étude de la cinétique de rétention de Rubisco dans le support Q Hyper Z a été initiée. Compte tenu que l'on dispose d'un petit volume de Rubisco purifiée, un seul essai a été réalisé. Il aurait fallu disposer d'une plus grande quantité de molécule pour déterminer parfaitement les mécanismes cinétiques limitants et leurs paramètres associés. La méthode utilisée est le réacteur agité où les particules de support et la solution de Rubisco sont mises en contact et la concentration de la Rubisco en solution est mesurée à différents temps.

III.1. Principe de détermination des constantes cinétiques

Le transfert de la protéine jusqu'au support est donc régi par plusieurs étapes, dont les plus lentes sont en général les transferts externe et interne. Le transfert de la molécule depuis la solution jusqu'à la particule, à travers la couche limite, est souvent négligé dans les réacteurs agités, par considération des conditions hydrodynamiques adéquates. La validité de cette hypothèse peut être délicate lorsque le gradient de concentration est très faible (donc pour les solutions diluées). Toutefois cette hypothèse est d'autant plus applicable que l'isotherme est très favorable, car dans ce cas la concentration des protéines à l'interface reste très faible puisque la majorité se trouve fixée. Dans la plupart des cas, les deux résistances restent du même ordre de grandeur et doivent être prises en compte [Fernandez et Carta, 1996].

III.1.1 Bilans

L'écriture et la résolution des bilans de matière dans les deux phases en contact permet de remonter aux paramètres cinétiques caractéristiques de ces phénomènes. Dans un réacteur agité, les bilans s'écrivent :

Bilan sur une particule :

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \cdot D_s \cdot \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \cdot \frac{\partial q}{\partial r} \right) \quad \text{Equation IV-15}$$

$$\text{Condition initiale : } t = 0, q = 0 \quad \text{Equation IV-16}$$

$$\text{Conditions aux limites : } r = 0, \frac{\partial q}{\partial r} = 0 \quad \text{Equation IV-17}$$

$$r = R_p, D_s \cdot \frac{\partial q}{\partial r} = k_f \cdot (C - C_i) \quad \text{Equation IV-18}$$

Bilan sur le liquide :

$$\frac{d\bar{C}}{dt} = -\frac{3 \cdot k_f \cdot V_R}{R_p \cdot V_L} \cdot (C - C_i) = -\frac{V_R}{V_L} \cdot \frac{dq}{dt} \quad \text{Equation IV-19}$$

$$\text{Condition initiale : } t = 0, C = C_0 \quad \text{Equation IV-20}$$

\bar{q} représente la concentration moyenne de protéine dans la particule, R_p le rayon de la particule, V_R le volume d'adsorbant, V_L le volume de solution, D_s le coefficient effectif de diffusion de la protéine dans la particule et k_f le coefficient de transfert externe. C et C_i sont, respectivement, les concentrations en protéine au sein de la solution et dans la solution à l'interface liquide-solide. En supposant l'équilibre local entre les phases, la concentration en phase liquide à l'interface peut être reliée à la concentration fixée par l'isotherme d'équilibre :

$$q_i = \frac{Q \cdot K_L \cdot C_i}{1 + K_L \cdot C_i} \quad \text{Equation IV-21}$$

Aux temps courts, la résistance au transfert externe est souvent dominante [Graham et Fook, 1982]. L'intégration de ces bilans conduit aux équations IV-22 pour la concentration de la protéine en solution et 23 pour la concentration de la protéine dans le support :

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left(-\frac{3 \cdot k_f \cdot V_R}{R_p \cdot V_L} \cdot t\right) \quad \text{Equation IV-22}$$

$$\bar{q} = \frac{V_L \cdot C_0}{V_R} \left(1 - \exp\left(-\frac{3 \cdot k_f \cdot V_R}{R_p \cdot V_L} \cdot t\right)\right) \quad \text{Equation IV-23}$$

Ces deux expressions peuvent être utilisées pour déterminer le coefficient de transfert externe k_f à partir des données expérimentales.

Pour des temps de contact plus longs, le transfert intra-particulaire devient limitant. Dans ces conditions, la concentration de protéine à l'interface des particules q_i peut être assimilée à la capacité totale du support. L'équation IV-22 peut ainsi être intégrée donnant l'équation IV-24 [Helfferich, 1995], dont l'équation IV-25 est une approximation [Helfferich et Pesselt, 1958].

$$\frac{\bar{q}}{Q} = 1 - \frac{6}{\Pi^2} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{1}{k^2} \exp\left(-\frac{k^2 \cdot \Pi^2 \cdot D_s}{R_p^2} \cdot t\right) \quad \text{Equation IV-24}$$

$$\frac{\bar{q}}{Q} = \left[1 - \exp\left(\Pi^2(-\tau + 0,960 \cdot \tau^2 - 2,92 \cdot \tau^3)\right)\right]^{1/2} \quad \text{avec} \quad \tau = \frac{D_s \cdot t}{R_p^2} \quad \text{Equation IV-25}$$

Ainsi les coefficients k_f et D_s peuvent être déterminés respectivement, par ajustement paramétrique de l'expression IV-22 ou IV-23 aux données expérimentales d'adsorption de la protéine en fonction du temps sur un intervalle de temps très court (où la résistance au transfert externe est dominante) et par ajustement de l'équation IV-25 aux données expérimentales sur des temps de contact beaucoup plus longs (où la résistance au transfert interne est dominante).

III.1.2. Nombre de Sherwood

La détermination de k_f peut aussi être abordée par les aspects hydrodynamiques, par calcul du nombre de Sherwood (Sh) à l'aide des corrélations de la littérature.

$$\text{Sh} = \frac{k_f \cdot d_p}{D} \quad \text{Equation IV-26}$$

Avec d_p diamètre moyen des particules et D le coefficient de diffusion moléculaire de la protéine dans la solution à dilution infinie.

Armenante et Kirwan (1989) ont mené une étude étendue de transfert de matière dans des particules fines en suspension dans un réacteur agité. Leurs données comprennent de larges gammes de tailles de particules (de 6 à 427 μm) et de nombres de Schmidt ($420 < \text{Sc} < 130\,000$) incluant ainsi les paramètres de nos expériences avec le support Q Hyper Z. La corrélation empirique suggérée par cette étude, pour prédire le nombre de Sherwood dans les réacteurs agités est :

$$\text{Sh} = 2 + 0,52 \cdot \left(\frac{\bar{\varepsilon}^{-1/3} \cdot d_p^{4/3} \cdot \rho_l}{\eta_l} \right) \cdot \text{Sc}^{1/3} \quad \text{Equation IV-27}$$

Avec $\bar{\varepsilon}$ puissance de l'agitation par unité de masse du liquide, ρ_l et η_l masse volumique et viscosité dynamique de la solution de protéine, et $\text{Sc} = \frac{\mu_{\text{liq}}}{\rho_{\text{liq}} \cdot D}$, nombre de Schmidt.

Selon Armenante and Kirwan (1989), la puissance de l'agitation, $\bar{\varepsilon}$, est estimée à partir de corrélations établies par Uhl et Grey (1966). Cette estimation reste peu exacte, mais vu le faible impact de $\bar{\varepsilon}$ sur la valeur de Sh (équation IV-27), même si l'erreur sur $\bar{\varepsilon}$ est importante la valeur de k_f sera très faiblement affectée. De plus, pour des agitations fortes, $\bar{\varepsilon}$ varie très peu. La puissance d'agitation est souvent estimée entre 250 et 450 $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-3}$ [Fernandez et Carta, 1996]. Dans le cas de notre travail, on a choisi d'utiliser pour nos calculs $\bar{\varepsilon} = 300 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-3}$, comme valeur moyenne.

III.1.3. Coefficient de diffusion de la Rubisco en solution à dilution infinie

Le coefficient de diffusion moléculaire de la Rubisco de luzerne est estimé à $2,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [Tomimatsu, 1980, Hood et al., 1981]. Cette valeur est cohérente avec les valeurs qu'on peut trouver dans la littérature pour d'autres protéines. Tyn et Gusek (1990) ont recensé les coefficients de diffusion moléculaires d'un grand nombre de protéines. On peut par exemple citer à titre comparatif le coefficient de diffusion moléculaire de la myosine (dont la masse moléculaire est proche de celle de la Rubisco = 500 kDa) qui est de l'ordre de $2,9 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, celui de la BSA (66 kDa) est de $5,7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, pour l'ovalbumine (44 kDa) il est de $7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et pour la β -lactalbumine (16 kDa) $D = 10 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Comme prédit par la théorie, il apparaît clairement que ce coefficient est plus élevé pour les protéines de plus petite taille. On pourrait ainsi s'attendre à ce que les paramètres de transfert de la Rubisco soient plus faibles que ceux des protéines pré-citées (même si cela dépend aussi du solide considéré).

III.2. Protocole expérimental

La cinétique de la rétention de la Rubisco par le support anionique Q Hyper Z est réalisée dans des récipients fermés agités. Le principe de la méthode consiste à mettre en contact une masse précise de l'échangeur avec un volume donné d'une solution de Rubisco pure bien caractérisée. Pour cela, le support est hydraté et filtré avant d'être pesé. Plusieurs tubes contenant la même masse du support précisément connue et un volume précis de solution sont préparés. La concentration en Rubisco de la solution est mesurée au bout d'un certain temps.

La solution de Rubisco utilisée pour l'étude de la cinétique de la rétention est préparée de la même manière que celle utilisée pour la détermination de l'isotherme. En effet, cette solution est obtenue par dilution (1 :30) de la fraction de Rubisco purifiée à partir du procédé d'échange d'ions en lit expansé (Chapitre III, paragraphe IV.6.3). Les caractéristiques de la solution de Rubisco pure ainsi obtenue avaient déjà été résumées dans le tableau IV-1.

Les tubes sont mis sous agitation dans une table tournante, puis à chaque intervalle de temps, l'agitation est arrêtée, un tube est prélevé, les deux phases sont séparées par filtration afin d'arrêter l'échange. Le temps d'arrêt de l'agitation est minimisé à 8 secondes. L'absorbance à 280 nm est ensuite mesurée pour chaque solution filtrée. La cinétique d'adsorption est terminée lorsque la valeur de l'absorbance à 280 nm devient constante. La détermination de la

concentration finale de la Rubisco en solution, est réalisée par une droite d'étalonnage préalablement établie.

La solution de Rubisco étant purifiée, la mesure de l'absorbance à 280 nm a été considérée acceptable. Néanmoins, afin de valider cette hypothèse, certains échantillons ont été analysés aussi par HPLC SEC.

III.3. Résultats

III.3.1. Observations générales

La figure IV-8 présente les résultats expérimentaux obtenus comme la concentration adimensionnelle en solution C/C_0 en fonction du temps. On constate d'abord que la mesure de la concentration de Rubisco en solution par spectrophotométrie et par analyse HPLC-SEC donne le même résultat, ce qui permet de valider la méthode de mesure de l'absorbance à 280 nm pour le dosage de cette solution.

La figure IV-8 montre par ailleurs que, globalement, l'équilibre est atteint après environ 5 heures de contact entre les deux phases, bien que l'évolution reste très faible après 150 min. Enfin, on peut observer deux zones, jusqu'à environ 40 minutes de contact, C/C_0 diminue fortement, puis elle diminue plus lentement et semble se stabiliser.

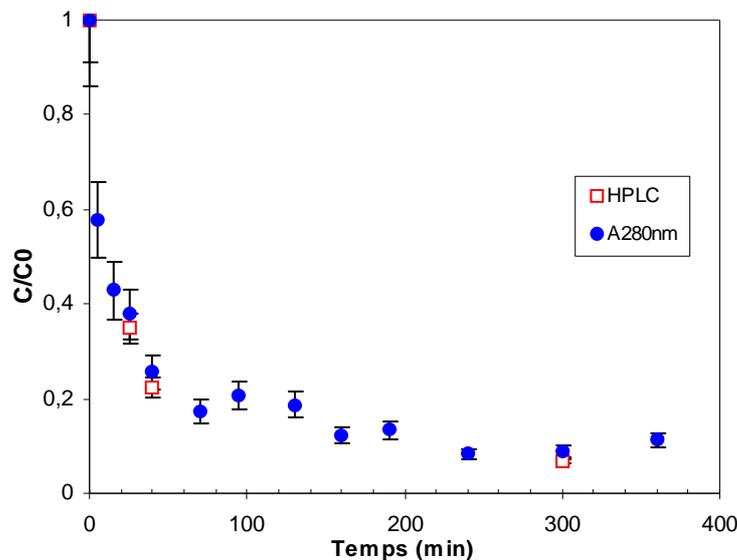


Figure IV-8. Evolution de la concentration de Rubisco avec le temps dans un réacteur batch en présence de l'échangeur Q Hyper Z à température ambiante. Concentration initiale de Rubisco en solution $2,2 \text{ g.L}^{-1}$. Rapport Liquide/Solide 11 (v/v).

III.3.2. Estimation de k_f et D_s

La détermination des paramètres cinétiques à partir des données expérimentales est d'abord effectuée par ajustement paramétrique de la courbe expérimentale de la cinétique d'échange avec les équations IV-22 et IV-25. Les résultats théoriques sont comparés aux valeurs expérimentales dans la figure IV-9.

L'équation IV-22 est utilisée pour déterminer k_f lors des premières minutes de la réaction d'échange (avant $t = 40$ min). Le coefficient de transfert externe k_f ainsi déterminé est de $2.10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$ ($\pm 1.10^{-4}$). Comme le montre la figure IV-9a, au delà de ce temps l'évolution de la concentration prédite par le modèle ne correspond plus au comportement réel.

La figure IV-9b montre par ailleurs les mêmes résultats expérimentaux exprimés, cette fois, comme la quantité de Rubisco fixée par rapport à la maximale, q/Q , en fonction du temps. L'ajustement de l'équation IV-25 à ces résultats donne un coefficient de diffusion effectif D_s de la Rubisco dans le support Q Hyper Z, de $5.10^{-10} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ ($\pm 1.10^{-10}$).

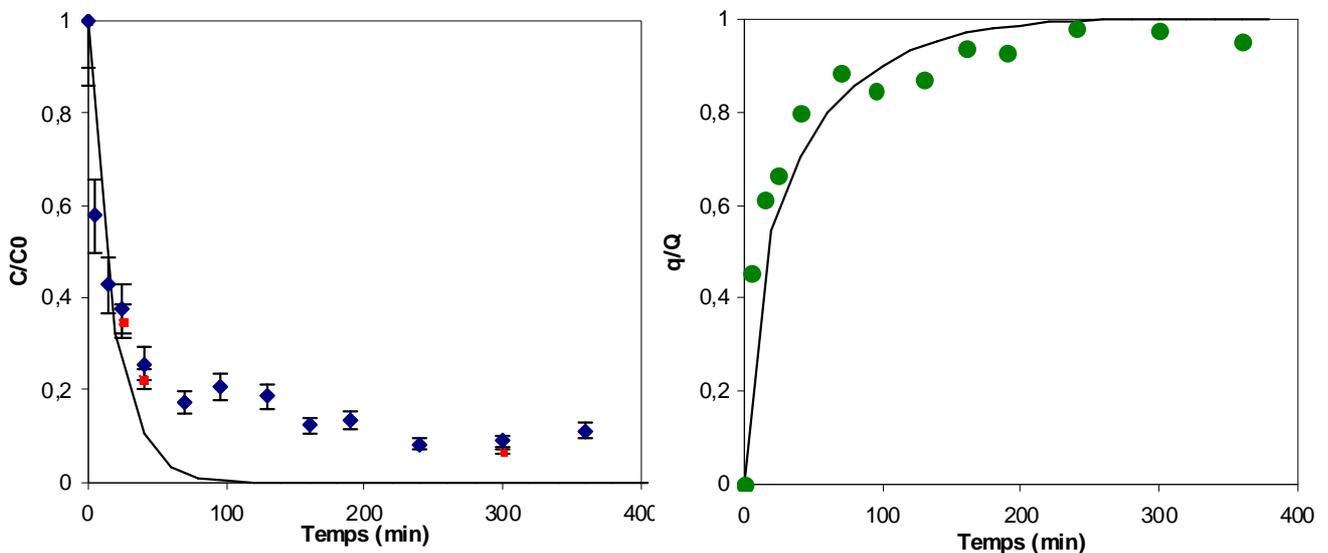


Figure IV-9. Evolution de la fixation de Rubisco de luzerne sur le support Q Hyper Z avec le temps. A gauche, évolution de la concentration en solution. A droite, évolution de la concentration fixée. Les traits continus ont été calculés à partir de l'équation IV-22 (à gauche) pour les temps courts, et à partir de l'équation IV-25 (à droite), pour les temps plus longs.

L'utilisation de la corrélation du nombre de Sherwood permet de comparer la valeur de k_f déterminée expérimentalement avec les travaux dans la littérature. En considérant la corrélation pour un réacteur agité fermé (équation IV-27), dans les conditions d'agitation indiquées précédemment, on trouve une valeur de k_f de l'ordre de $6,2 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ($\pm 1 \cdot 10^{-4}$). L'incertitude est estimée pour des valeurs extrêmes de la vitesse d'agitation, seul paramètre qui n'est pas bien connu dans notre cas. La valeur théorique est dans le même ordre de grandeur que celle estimée par cette expérience.

Lorsqu'on compare les valeurs de k_f et D_s avec d'autres proposées dans la littérature on observe qu'elles sont globalement inférieures. Cela s'explique probablement par la taille de la Rubisco, plus grande que celle des molécules habituellement étudiées. Par exemple, Fernandez et Carta (1996) ont étudié les mécanismes de transfert de la BSA, l'ovalbumine et la β -lactalbumine dans l'échangeur Q Hyper D. Cet échangeur présente une matrice différente de celle de Q Hyper Z, mais remplie du même polymère d'acrylate. Il est également caractérisé par une distribution granulométrique similaire à celle de Q Hyper Z.

Les coefficients de transfert externe k_f estimés expérimentalement dans cette étude sont de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la BSA, $1,9 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'ovalbumine et $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la β -lactalbumine. Ces résultats qui confirment l'influence de la taille de la molécule et donc du coefficient de diffusion moléculaire sur k_f sont confirmés dans le cas de la Rubisco, représentative d'une taille de protéine très supérieure.

Par ailleurs, selon la même étude, les coefficients de diffusion effectifs de ces protéines ont été estimés à $9 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ pour la BSA, $15 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ pour l'ovalbumine et $16 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ pour la β -lactalbumine. Ces valeurs sont supérieures au coefficient de diffusion effectif déterminé pour la Rubisco qui est plutôt de l'ordre de $5 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ de part la différence de taille. En effet les rapports, par protéine, des coefficients de diffusion moléculaire et effectif sont tout à fait similaires.

IV. Conclusions

La capacité de simulation des procédés en bioséparation a un double intérêt. Outre l'acquisition des connaissances et la compréhension des mécanismes, le coût économique des expériences avec des produits biologiques à haute valeur ajoutée est très élevé. Pour ces raisons, la modélisation occupe une partie plus qu'importante de la littérature dédiée à ce type

de problème. Enfin, la modélisation nécessite une connaissance approfondie des interactions établies entre les supports de séparation et les molécules d'intérêt. Malheureusement, il est très difficile dans l'état de connaissances actuelle, de caractériser ces interactions dans les systèmes biologiques réels, la plupart des travaux de modélisation traitant des milieux synthétiques, relativement simplifiés.

L'étude et la modélisation de l'équilibre et la cinétique des interactions entre le support Q Hyper Z et la protéine Rubisco ont été initiées. Pour cela, un échantillon de Rubisco pure fortement concentré obtenu par l'application du procédé objet de ce travail a été utilisé. Les résultats obtenus en terme d'isotherme d'adsorption, notamment, ont été comparés aux résultats de rétention réelle déterminée par les courbes de percée dans des conditions d'opération diverses.

L'isotherme d'échange d'ions déterminée dans une solution de force ionique modérée (0,016 mol.L⁻¹ NaCl) montre une affinité importante du support pour la Rubisco. L'utilisation de l'isotherme de Langmuir conduit à des valeurs de capacité totale (220 g.L⁻¹ échangeur) cohérentes avec la littérature. Le coefficient de sélectivité a été estimé à 21 L.g⁻¹.

Une première approche de modélisation a été initiée par l'application de la théorie de l'équilibre aux courbes de percée déterminées expérimentalement, en lit fixe comme en lit expansé. Les prédictions des temps de percée du modèle ne permettent pas de prédire les temps de percée réels, et ce notamment dans les expériences où la concentration en sel de la solution est similaire à celle dans laquelle l'isotherme a été déterminée.

L'application du même modèle avec une fonction quelconque capable de rendre compte de la rétention réelle de protéine dans les conditions du procédé permet, comme c'est logique, une bien meilleure représentation des temps de percée. Cela met en évidence le bienfondé de la démarche, mais l'incapacité de l'isotherme à représenter les interactions plus complexes du système réel, sans que l'effet des sels apparaisse comme le plus important dans les conditions de travail.

L'étude de la cinétique a conduit à des résultats tout à fait cohérents avec ceux de la littérature. La détermination d'un coefficient de transfert dans le film (à partir des résultats obtenus lors des premières minutes) est en cohérence notamment avec la corrélation

d'Armenante et Kirwan (1989). Le rapport du coefficient de diffusion effectif (calculé à partir des résultats obtenus pour les temps longs) au coefficient de diffusion moléculaire de la Rubisco est tout à fait dans le même ratio que pour d'autres molécules.

Que ce soit pour l'équilibre ou pour la cinétique, il ne s'agit ici que des premières valeurs obtenues. Il est cependant intéressant de constater que ces accords montrent un comportement pour la Rubisco tout à fait équivalent à celui d'autres molécules et ce malgré sa grande taille.

CONCLUSION GENERALE

Les protéines sont des polymères naturels qui peuvent avoir des tailles, des structures et des conformations très complexes. Ces propriétés influencent sensiblement leur comportement en solution et les interactions qu'elles peuvent avoir avec différents composés, surtout quand elles se trouvent dans un milieu brut en présence d'une multitude d'autres espèces.

Les extraits bruts végétaux sont caractérisés par leur teneur élevée en protéines. Ces protéines végétales présentent un grand intérêt nutritionnel mais également industriel. Parmi ces protéines, la Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco) est la plus abondante et présente un potentiel de valorisation très important. Les procédés industriels de séparation des protéines, en général, et de Rubisco en particulier, à partir de leur milieu biologique brut se confrontent souvent à des problèmes de coûts et d'impacts environnementaux compte tenu du grand nombre d'étapes. Par conséquent, la mise en œuvre de procédés de séparation mieux adaptés à ces milieux présente un grand intérêt.

La chromatographie d'échange d'ions est l'un des procédés les plus utilisés pour la séparation des protéines, ou d'autres biomolécules préalablement pré-purifiées, de part sa sélectivité et sa capacité à traiter des volumes importants. Néanmoins, l'application de ce procédé à des milieux biologiques complexes reste délicate compte tenu de la grande variété d'espèces présentes dans le milieu, y compris les particules solides pouvant colmater la colonne. La mise en œuvre de la chromatographie d'échange d'ions en lit expansé permet depuis quelques années de combiner dans une seule opération les étapes de clarification, de concentration et de purification par la capture directe des biomolécules à partir de milieux bruts. Cependant, comme la chromatographie en lit fixe, celle-ci reste confrontée à d'autres limitations dues à la complexité du milieu, et la compétition des différentes biomolécules (et éventuellement des solides) du milieu pour le support.

La déshydratation industrielle de certaines biomasses végétales, comme la luzerne, génère des quantités de jus importantes dans lesquels les teneurs en biomolécules, telles que les polyphénols, les pigments, les vitamines ou les protéines, sont élevées. La récupération actuelle des protéines à partir de ces jus nécessite plusieurs étapes caractérisées par une consommation énergétique et impact environnemental importants. Dans ce travail la séparation sélective de la Rubisco à partir du jus de luzerne industriel centrifugé par chromatographie d'échange d'ions a été étudiée. L'étude de ce procédé a été réalisée en

colonne en lit fixe et en lit expansé. Pour comparer les deux modes de contact, les particules solides présentes dans le jus ont été préalablement éliminées par centrifugation.

De part la complexité de la composition du milieu, le jus de luzerne industriel a été dans un premier temps caractérisé par des méthodes analytiques couramment utilisées dans la littérature pour déterminer ses propriétés physico-chimiques générales telles que le pH, la conductivité ou la teneur totale en azote, protéines hydrophiles et hydrophobes. Par ailleurs, il a été nécessaire de mettre au point des méthodes spécifiques à l'identification et la mesure de la Rubisco dans ce milieu, mais également tout au long des étapes du procédé de séparation. Ainsi, une méthode d'analyse qualitative et quantitative de la Rubisco par HPLC d'exclusion stérique a été mise au point. La colonne KW804 permettant l'analyse des protéines dans une large gamme de taille a été utilisée. Cette méthode chromatographique a été couplée à l'électrophorèse SDS-PAGE afin d'identifier le pic correspondant à la Rubisco par identification de ses sous-unités dans les échantillons. Une droite d'étalonnage, validée sur différents milieux et sur 2 types de Rubisco, a permis de déterminer la concentration de la protéine dans les différents essais réalisés.

La mise en œuvre du procédé d'échange d'ions pour la séparation de la Rubisco a nécessité des tests préliminaires. En effet, la charge nette de la Rubisco dans son milieu d'origine n'était pas évidente à prédire car le pH du jus était très proche du point isoélectrique de la Rubisco de luzerne donné dans la littérature. Ces tests ont conduit à choisir un échangeur d'anions, le support Q Hyper Z. Caractérisé par le remplissage de la porosité interne d'un gel d'acrylate, cet échangeur est connu pour conduire à des capacités importantes de travail et une très bonne affinité pour les protéines. Par ailleurs sa matrice à base d'oxyde de titane assure une masse volumique élevée, nécessaire à l'application en lit expansé.

Des études d'équilibre et cinétique d'échange ont été initiées à partir d'une fraction de protéine produite dans ce travail, en réacteur fermé. Le milieu alors purifié ne contient que la protéine et une concentration en NaCl de l'ordre de 0,016 M (1,02 mS.cm⁻¹). Les paramètres de l'équation de Langmuir déterminés pour l'isotherme sont $Q = 220 \text{ g.L}^{-1}$ et $K = 21 \text{ L.g}^{-1}$. La rétention de Rubisco dans le support correspond donc à une isotherme très favorable, et ce malgré la taille de la molécule. L'étude de la cinétique a conduit à des résultats cohérents avec ceux de la littérature. La détermination d'un coefficient de transfert dans le film (à partir des résultats expérimentaux obtenus lors de premières minutes) est en cohérence avec la

corrélation d'Armenante et Kirwan. Le rapport du coefficient de diffusion effectif (calculé à partir des résultats expérimentaux obtenus pour les temps longs) par le coefficient de diffusion moléculaire de la Rubisco est tout à fait dans le même ratio que pour d'autres protéines. Ainsi, alors qu'un effet de limitation stérique plus important aurait pu être constaté pour cette protéine du fait de sa grande taille, cet effet n'a pas été soulevé.

Pour les deux modes de contact étudiés (lit fixe et lit expansé), l'effet de la dilution du milieu sur le procédé a été analysé. Deux gammes différentes de travail ont été définies, pour l'utilisation en lit fixe et en lit expansé, avec des plages communes de travail, servant de référence : alors que le lit expansé accepte des conditions diverses de travail mais utilise des capacités de production plus grandes, le lit fixe est limité par le besoin d'utilisation des solutions de faible viscosité. Les courbes de percée obtenues expérimentalement pour chacune des dilutions ont montré une allure peu commune. Un palier correspondant à une solution en sortie de la colonne d'une concentration en Rubisco d'environ 75% de celle de l'alimentation a été constaté pour toutes les expériences. Ce résultat met en évidence des mécanismes relativement complexes de rétention, qui peuvent résulter sûrement des aspects cinétiques (coefficient de diffusion effectif faible) mais également d'une certaine affinité de la résine pour la Rubisco, par rapport à l'ensemble des composants capables de se fixer. De fait, lors de l'obtention du palier, la seule espèce se fixant sur le support semble être la Rubisco.

D'un point de vue du procédé de séparation, les résultats des expériences de charge ont démontré qu'en absence de particules solides les deux modes de contact permettent de traiter le jus avec une capacité dynamique de rétention à 10% similaire, même si cette capacité de rétention est supérieure en lit fixe. Ces résultats ont démontré ainsi que malgré la complexité du milieu et sa conductivité, les capacités dynamiques à 10% obtenues étaient dans le même ordre de grandeur que celles trouvées dans la littérature. Néanmoins, cette capacité dynamique diminue plus nettement lorsque le jus traité est brut (donc non dilué). Ainsi, une étape de dilution du jus avant son traitement pourrait être envisagée dans le procédé, comme c'est souvent proposé dans la littérature, mais il reste possible de traiter le jus non dilué avec une capacité dynamique correcte.

L'étape de l'élution a montré que la récupération de la Rubisco fixée est facilement réalisée par une solution de chlorure de sodium à 0,5 mol.L⁻¹. La réduction de la vitesse d'alimentation de l'éluant a permis la récupération de la totalité de la Rubisco fixée dans des

volumes réduits. Le procédé a ainsi permis de concentrer le jus initial jusqu'à 21 fois. Les fractions produites sont également caractérisées par un degré de pureté très supérieur à celui de la Rubisco (d'épinard) actuellement commercialisée.

Globalement, le procédé de séparation a été très satisfaisant puisqu'il a permis la production d'une solution concentrée et très pure de Rubisco. Cependant, une optimisation de l'étape d'élution (concentration de la solution de chlorure de sodium) et du fractionnement de l'éluat à la sortie de la colonne permettrait une meilleure maîtrise de la pureté des fractions produites. Outre la pureté de ces fractions, la caractérisation qualitative des fractions pures produites par le procédé chromatographique d'échange d'ions pourrait être complétée. En effet, il serait intéressant de vérifier si l'activité biologique de la Rubisco purifiée est préservée, ce qui assure des voies d'application industrielle plus intéressantes. Dans cette étude plusieurs protocoles de dosage de l'activité enzymatique de la Rubisco ont été testés mais aucun n'a pu être validé sur la Rubisco commerciale, de manière telle que l'activité de la protéine produite n'a pas pu être non plus déterminée. Des travaux sont encore en cours afin de vérifier cette activité.

L'impossibilité d'identifier et caractériser toutes les interactions possibles entre le milieu et le support a conduit à proposer une première analyse théorique du procédé simple, basé sur le modèle de la théorie de l'équilibre. L'adéquation de l'isotherme d'équilibre à la prédiction des temps de percée a ainsi été étudiée, montrant des résultats en net décalage par rapport aux résultats expérimentaux. Ce même modèle appliqué à une fonction $q = f(C)$ déterminée à partir des courbes de percée a donné une meilleure prédiction des temps de percée. La logique de ces résultats a permis donc de valider la démarche.

Les perspectives de ce travail sont très nombreuses. Compte tenu de la complexité de ces systèmes, de nombreux paramètres restent à étudier, comme l'effet dissocié de la concentration, la présence des sels et la présence d'autres biomolécules. Connaître l'effet de la présence des particules dans le milieu (qui apporterait aussi une charge complémentaire des biomolécules qu'y sont souvent associées) sur le procédé serait intéressant, bien que l'utilisation d'une étape de centrifugation préalable semble tout à fait acceptable. Des considérations économiques et environnementales pourraient aussi être utilisées afin de déterminer l'intérêt éventuel de la dilution du jus avant son traitement.

Les travaux réalisés avec la résine Q Hyper Z ont conduit systématiquement à des résultats proches de la Q Hyper D, moyennant les différences propres aux protéines étudiées. Il paraît ainsi intéressant de vérifier si effectivement leur comportement vis-à-vis de la rétention des protéines est similaire, au quel cas, les différences espérées entre un procédé en lit fixe et un procédé en lit expansé appliqués au même milieu seraient uniquement d'ordre hydrodynamique.

La modélisation des systèmes biologiques réels reste un des aspects les plus difficiles, non pas à cause des modèles en soit, mais de part la difficulté voire l'impossibilité d'accéder aux paramètres de ces modèles dans les conditions réelles des procédés. Il faut ainsi les considérer avant tout un outil pour la compréhension, plus que des outils d'optimisation ou de prédiction des procédés industriels

Enfin, vu la capacité du procédé étudié à concentrer et produire la protéine, l'étude du changement d'échelle apparaît réellement intéressante. Les considérations hydrodynamiques seront alors d'une plus grande importance car il semblerait intéressant de réaliser la charge en lit expansé et l'élution en lit fixe.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

AFNOR (1994), Association Française de Normalisation, Qualité de l'eau, in : Recueil de normes françaises (Collection of French standard methods: water quality). Paris, France, (In French).

Al-Dibouni M.R. and Garside J. (1979). Particle mixing and classification in liquid fluidised beds, *Trans.Instn Chem. Engrs*, 57, 94-103.

Amersham Biosciences Protein purification Handbook.

Andrews, T. J. (1988). Catalysis by cyanobacterial ribulose-bisphosphate carboxylase large subunits in the complete absence of small subunits, *J. Biol. Chem.* 263, 12213-12219.

Anspach, F.B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G. and Deckwer, W.D. (1999). Expanded bed chromatography in primary protein purification. *J.Chromatogr.A.* 865, 129 – 144.

Antonov, Y. A. et Soshinsky, A. A. (2000). Interactions and compatibility of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from alfalfa with pectin on aqueous medium. *Int. J. Biol. Macromol.*, 27, 279-285.

Arlabosse, P., Blanc, M., Kerfai, S., Fernandez, A. (2010) Production of green juice with an intensive thermo-mechanical fractionation process. Part I: Effect of processing conditions on the dewatering kinetics, *Chem. Eng. J.*, doi. 10.1016/j.cej.2011.01.027.

Armenante, RM., Kirwan, D.J. (1989) Mass transfer to microparticles in agitated systems. *Chem. Eng. Sci.*, 44, 2781-2796.

B

Bahr, J.T., Bourque, D.P., Smith, H.J. (1977) Solubility properties of fraction I proteins of maize, cotton, spinach, and tobacco, *J. Agric. Food Chem.*, 25, 783-789.

Bailly, E. (1989). L'électricité atout de qualité en déshydratation de luzerne, *Cahiers des industries alimentaires.* 5-10.

Barbeau, W.E., Kinsella, J.E. (1988) Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) from green leaves—Potentials as a food protein, *Food Reviews International*, 4, 93-127.

Bai, Y., Glatz, C.E. (2003a). Capture of a Recombinant Protein from Unclarified Canole Extract Using Streamline Expanded Bed Anion Exchange, *Biotechnol. and Bioeng.*, 81, 855-864.

Bai, Y. et Glatz, C.E. (2003b). Bioprocess Considerations for Expanded-bed Chromatography of Crude Canola Extract: Sample Preparation and Adsorbent Reuse, *Biotechnol. and Bioeng.*, 81, 775-782.

Barbeau, W.E. (1990). Functional properties of leaf proteins: Criteria required in food application. *Italian Journal of Food Science*, 2(4), 213-225.

Barbeau, W. E. et Kinsella, J. E. (1988) Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) from green leaves—Potentials as a food protein. *Food Reviews International*, 4(1), 93–127.

- Barnfield Frej, A.K., Hjorth, R., Hammarström, (1994) A Pilot Scale Recovery of Recombinant Annexin V from Unclarified Escherichia coli Homogenate using Expanded Bed Adsorption. *Biotech. & Bioeng.* 44, 922-929.
- Bartels, C.R., Kleinman, G., Korzon, N.J., Irish, D.B. (1958) A novel ion-exchange method for the isolation of streptomycin. *Chem. Eng.Prog.* 54, 49-52.
- Barza, T., Löfflerb, V., Arellano-Garciaa, H., Woznya, G. (2010) Optimal determination of steric mass action model parameters for β -lactoglobulin using static batch experiments. *J. Chromatogr. A*, 1217, 4267-4277.
- Bascoul, A., Delmas, H. et Couderc, J.P. (1988) Caractéristiques hydrodynamiques de la fluidisation liquide–solide : Influence du distributeur. *Chem.Eng.J.* 37, 11-24.
- Batt, B.C, Yabannavar, V.M., Singh, V. (1995) Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth *Bioseparation*, 5, 41-52.
- Bayramoglu, G., Ekici, G., Besirli, N., Yakup Arica, M. (2007) Preparation of ion-exchange beads based on poly(methacrylic acid) brush grafted chitosan beads: Isolation of lysozyme from egg white in batch system. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 310, 68–77.
- Beghin, V., Bizot, H., Audebrand, M., Lefebvre, J., Libouga, D. G. et Douillard, R. (1993). Differential scanning calorimetric studies of the effects of ions and pH on ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 15 (4), 195-200.
- Belter, P.A., Cunningham, F.L., Chen, J.W. (1973) Development of a recovery process for novobiocin. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 533-549.
- Bertrand, O., Cochet, S., Cartron, J.P. (1998) Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE Streamline. *J Chromatogr* 822:19–28.
- Bettschart, A. (1974) Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate as influenced by various factors. *J. Food. Sci.*, 39 (6), 1110–1115.
- Bhattacharya, S.K. (2001) Conversion of carbon dioxide from ICE (internal combustion engine) exhausts by fixation. U.S. Patent 6,258,335, 1-18.
- Bhattacharya, S., Chakrabarti, S., Bhattacharya, S.K. (2002) Bioprocess for recyclable CO₂ fixation: a general description. In: Bhattacharya SK, Mal T, Chakrabarti S, editors. *Recent research developments in biotechnology and bioengineering* (in press).
- Biazus, J.P.M., Severo, J.B., Santana, J.C.C., Souza, R.R. et Tambourgi, E.B. (2006). Study of amylases recovery from maize malt by ion-exchange expanded bed chromatography, *Process Biochemistry*, doi:10.1016/j.procbio.2006.03.025.
- Bonnerjera, J., Oh, S., Hoare, M., Dunhill, P. (1986). The right step at the right time. *Bio/Technology*, 4, 954-958.
- Born, C., Thommes, J., Biselli, M., Wandrey, C. et Kula, M.R. (1996). An approach to integrated antibody production : coupling of fluidised bed cultivation and fluidised bed adsorption. *Bioprocess Eng.* 15, 21-29.

Bowen, W.R., Pan, L.C., Sharif, A.O. (1998) Predicting equilibrium constants for ion exchange of proteins —a colloid science approach *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 143, 117–131.

Brooks, C.A., Cramer, S.M. (1992) Steric mass-action ion-exchange – Displacement profiles and induced salt gradients. *AIChE J.* 38, 1969-1978.

Bruce, L.J. et Chase, H.A. (2001). Hydrodynamics and adsorption behaviour within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling. *Chem. Eng. Sc.* 56, 3149-3162.

Bruce, L.J. et Chase, H.A. (1999). Evaluation of the effect of in-bed sampling on expanded bed adsorption. *Bioseparation*, 8, 77-83.

Buijs, A., Wesselingh, J.A. (1980). Batch fluidized ion-exchange column for streams containing suspended particles. *J. Chromatogr.* 201, 319-327.

Burns, M.A., Graves, D.J. (1985). Continuous affinity chromatography using a magnetically stabilized fluidized bed. *Biotechnol. Prog.* 1, 95-103.

Burova, T.V., Soshinky, A.A. et Danilenko, A.N. (1989). Conformation stability of ribulose diphosphate carboxylase of alfalfa green leaves according to the data of differential scanning microcalorimetry. *Biofizika*, 34, 545-9.

Bracewell, D.G., Boychyn, M., Baldascini, H., Storey, S.A., Bulmer, M., More, J., Hoare, M. (2008) Impact of clarification strategy on chromatographic separations: preprocessing of cell homogenates. *Biotech. Bioeng.* 100, 941–949.

Bruce, L.J. et Chase, H.A. (1999). Evaluation of the effect of in-bed sampling on expanded bed adsorption. *Bioseparation*, 8, 77-83.

C

Cabanne, C., Noubhani, A.M., Dieryck, W., Hocquellet, A., Santarelli, X. (2004) Evaluation of three expanded bed adsorption anion exchange matrices with the aid of recombinant enhanced green fluorescent protein overexpressed in *Escherichia coli*, *Journal of Chromatography B*, 808, 91–97

Cacace, M.G, Landau, E.M. et Rmsden, J.J. (1997) The Hoffmeister serie :salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q Rev of Biophys*, 30 (3), 241-277.

Chakrabarti, S., Bhattacharya, S., Bhattacharya, S.K. (2002) Immobilization of D-Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase A Step Toward Carbon Dioxide Fixation *Bioprocess*, Wiley Periodicals, Inc, 705-711.

Chang, Y.K. et Chase, H.A. (1996) Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 204-216.

Chang, Y.K., Horng, J.T., Huang, R.Z., Lin, .Y. (2006) Direct recovery of clotting factor IX from unclarified human plasma by expanded bed ion exchange chromatography. *Biochem. Eng. J.* 30, 138-146.

Chang, Y.K., Mc Creath, G.E. et Chase, H.A. (1995). Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates, *Biotechnol. Bioeng.* 48, 355-366.

- Chase, H. A. (1988) Adsorption separation processes for protein purification, in: Down stream processes: Equipments and Techniques, Alan R. Liss, Inc., 159-204.
- Chase, H.A. (1994) Purification of protein by adsorption chromatography in expanded beds, Trends Biotechnol. 12, 296–306.
- Chase, H.A., Draeger, M.N. (1992a) Affinity purification of proteins using expanded beds. J. Chromatogr. 597, 129-145.
- Chase, H.A., Draeger, M.N. (1992b) Expanded bed adsorption of proteins using ion-exchangers. Separation Sci. Technol. 27, 2021-2039.
- Chen, W.D., Hu, H.H, Wang, Y.D. (2010) Analysis of steric mass-action model for protein adsorption equilibrium onto porous anion-exchange adsorbent. Chem. Eng. Sci. 61, 7068-7076.
- Chen, W., Qiu, Y. (2003) Leaf protein's utilization status and its prospect. Food Science. 24, 158-161.
- Chen, W.D., Wang, Y.D., Hu, H.H., Su, Z.G. (2007). Hydrodynamics in an expanded bed of large size ion-exchange resin, and natural product adsorption, J. chem. Technol. and biochech. 82, 135-142.
- Chetty, A.S, Burns, M.A. (1991) Continuous protein separation in a magnetically stabilized fluidised bed using nonmagnetic supports. Biotechnol. Bioeng. 38, 963-971
- Costa, C., Rodrigues, A. (1985). Intraparticle diffusion of phenol in macroreticular adsorbents: Modeling and experimental study of batch and CSTR adsorbers. Chemical Engineering Science, 40, 983.
- Costes C. (1981). Biochimie des protéines foliaires, in : Gauthier-Villars, Costes (Eds), Protéines foliaires et alimentation, Ed. Bordas, Paris, 1-37.
- Curling, J.M., Brummelhuis, H.G.J. (1980) Methods of Plasma Protein Fractionation, Ed.; Academic Press: London, UK, 117-128.

D

- Daday, H. V. et Whitecross, M. I. (1983) Isoelectric focusing of ribulose biphosphate carboxylase from Lucerne and spinach. Sci. Tools, 30, 11-14.
- D'Alvise, N.P., Lesueur-Lambert, C., Fertin-Bazus, A., Fertin, B., Dhulster, P., Guillochon, D. (2004) Continuous enzymatic solubilisation of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor, Enzyme Microb. Technol., 34, 380-391.
- Dasari, G., Prince, I., Hearn, M.T.W. (1993) Physical characterisation of fluidized-bed behaviour of chromatographic packing materials. J. Chromatogr. 631.
- De Luca, L., Hellenbroich, D., Titchener-Hooker, N.J. et Chase, H.A. (1994). A study of the expansion characteristics and transient behaviour of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations. Bioseparation. 4, 311 – 318.
- Demarquilly, C., Journet, M., Beranger, C. (1973) Influence de la déshydratation et du mode de conditionnement sur la valeur alimentaire et l'utilisation des fourrages déshydratés, Fourrages, 55, 217-235.

Di Felice, R. (1995). Review article: Hydrodynamics of liquid fluidisation. *Chem Eng Sci.* 50, 1213-1245.

Dilly, J. D. et De Mathan, O. (1978). L'extraction des protéines de luzerne. *Ind. Agric et Alim*, 2, 65-72.

Donato, P.Di, Anzelmo, G., Tommonaro, G., Nicolaus, B., Poli, A. (2009) Vegetable wastes as suitable biomass feedstock for biorefineries, *New Biotechnol.*, doi:10.1016/j.nbt.2009.06.575.

Douillard, R. (1996). Les protéines de feuilles de RuBisCO, « Les protéines végétales ». Ed. Godon, Lavoisier, Technique et Documentation, 173-222.

Douillard, R. (1985). Propriétés biochimiques et physicochimiques des protéines des feuilles, in : *Protéines Végétales*, B. Godon (Eds), Technique et Documentation (Lavoisier), 44-211.

Douillard, R. et De Mathan, O. (1994) Leaf proteins for food use: Potential of RUBISCO. In B. J. Hudson (Ed.), *New and developing sources of food proteins*. London: Chapman & Hall, 307-342.

Douillard, R. et Songrillay Kongphet, T. (1990) Propriétés tensioactives de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase de luzerne native et maltolysée. *Sci. Aliments.* 10, 175-87.

Draeger, M.N., Chase, H.A. (1990) Liquid fluidized beds for protein purification. I. *Chem. Eng. Symp. Ser. No. 118*: 12.1- 2.12.

Draeger, M.N., Chase, H.A (1991) Liquid fluidized bed adsorption of proteins in the presence of cells. *Bioseparations* 2, 67-80.

E

Ellis, R. J. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*, 4, 241-244.

F

Fairburn, R., Alli, I., Baker, B. E. (1988) Proteolysis associated with the ensiling of chopped alfalfa. *J. Dairy Sci.* 71:152.

Fargues, C. (1993) *Chromatographie des protéines appliquée à la purification de la protéine acylase. Modélisation de la colonne d'adsorption sur un gel d'hydroxyapatite. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine.*

Fenneteau, F., Aomari, H., Chahal, P., Legros, R. (2003) Modeling of scaledown effects on the hydrodynamics of expanded bed adsorption columns. *Biotech.Bioeng.* 81, 790-799.

Fernandez, M., Carta, G. (1996) Characterization of protein adsorption by composite silica-polyacrylamide gel anion exchangers I. Equilibrium and mass transfer in agitated contactors. *J. Chromatogr. A.* 746, 169-183

Fernandez-Lahore, H.M., Kleef, R., Kula, M.R., Thommes, J. (1999) The influence of complex biological feedstock in expanded bed adsorption. *Biotech.Bioeng.* 64, 484-496.

Fremery, D. De, Miller, R.E., Edwards, R.H., Knuckles, B.E., Bickoff, E.M., Kohler, G. (1973) Centrifugal separation of white and green protein fractions from alfalfa juice following controlled heating, *J. Agr. Food Chem.*, 28, 886-889.

Finette, G.M.S., Mao, Q.M. and Hearn, M.T.W. (1996) Studies on the expansion characteristics of fluidised beds with silica-based adsorbents used in the purification of proteins. *J.Chromatogr*, 743, 53-73.

G

Gailliot, F.P., Gleason, C., Wilson, J.J., Zwarick, J. (1990) Fluidized bed adsorption for whole broth extraction. *Biotechnol. Prog.* 6, 370-375.

Gastineau, G., Mathan, O. (1981) La préparation industrielle de la protéine verte de luzerne. *Protéines foliaires et alimentation*, Ed. Bordas, Paris, 159-182.

Gilchrist, G. R., Burns, M. T., Lyddiatt, A. (1994) Solid phases for protein adsorption in liquid fluidized beds, in: D.L. Pyle (Ed.), *Separations for Biotechnology 3*, Royal Society of Chemistry, London, 186.

Godessart, N., Pares, R., Juarez, A. (1987) Microbial Coagulation of Alfalfa Green Juice, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2206-2211.

Graham, E.E., Fook, C.F. (1982) Rate of protein adsorption and desorption on cellulosic ion exchangers. *AIChE J.* 28, 245-250.

Graham, E.E., Pucciani, Pinto, A., N.G. (1987) A comparative study of models to predict protein adsorption. *Biotech. Progress.* 3, 141-145.

Grau, N.C. (2009) Energy balances in biomass dewatering processes, Master's Thesis report, Ecole Des Mines d'Albi-Carmaux, France, p. 165.

Griffith, C.M., Morris, J., Robichaud, M., Annen, M.J., Mc Cormick, A.V. et Klickinger, M.C. (1997) Fluidization Characteristics of and Protein Adsorption by Porous Zirconium Oxide Particles in a Fluidized-Bed. *J. Chrom.* 776: 179-195.

Guiochon, G. (2002) Preparative liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 965, 129–161.

H

Hall, N.P., McCurry, D., Tolbert, N.E. (1981) Storage and maintaining activity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase, *Plant Physiol.*, 67, 1220-3.

Hamm, M. (2001) Déshydratation industrielle de la Luzerne : Effet du séchage thermique sur le réseau pariétal. PhD Thesis. INRA Université de Reims Champagne-Ardenne.

Hanson, M., Stahl, S., Hjorth, R., Uhlen, M. et Moks, T. (1994) Single-step recovery of a secreted recombinant protein by expanded bed adsorption. *Bio/Technology.* 12, 285-288.

Helfferich, F.G. (1995) Ion exchange. Dover Publications Inc. p-640.

Helfferich, F.G. (1993) Non-linear waves in chromatography I. Waves, shocks, and shapes. *J. Chromatogr. A.* 629, 97-122.

Helfferich, F., Plesset, M.S. (1958) Ion exchange kinetics. Nonlinear diffusion problem. *J. Chem. Phys.* 28, 418-424.

Hjorth, R., Kampe, S. et Carlsson, M. (1995) Analysis of Some Operating Parameters of Novel Adsorbents for Recovery of Proteins in Expanded Beds. *Bioseparations.* 5, 217- 223.

Hood, L.L., Cheng, S.G., Koch, U., Brunner, J.R. (1981) Alfalfa proteins:isolation and partial characterisation of the major component-Fraction I protein. *J. Food Sci.* 46,1843-1850

Hubbich, J., Thommes, J. & Kula, M. (2005) Biochemical engineering aspects of expanded bed adsorption. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 92, 101-123.

I

Incamps, A., Hély-Joly, F., Chagvardieff, P., Rambourg, J.-C., Dedieu, A., Linares, E., Quéméneur, E. (2005) Industrial Process Proteomics: Alfalfa Protein Patterns During Wet Fractionation Processing. *Biotechnol. Bioeng.*, 91, 447-459.

Iyer, H., Tapper, S., Lester, P., Wolk, B., Van Reis, R. (1999) Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development. *J. Chromatogr. A.* 832, 1-9..

J

Jahanshahi, M., Ghoreishi, A.A., Vasheghani-F, E., Khavarpour, M., Abedijaber, A. (2009a) Comparative study of hydrodynamic behaviour of liquid expanded bed adsorption: mathematical and short-cut methods. *Brazilian J. Chem. Eng.* 26, 299-306.

Jahanshahi, M., Najafpour, G., Ebrahimpour, M., Hajizadeh, S., Shahavi, M.H. (2009b) Evaluation of hydrodynamic parameters of fluidized bed adsorption on purification of nano-bioproducts. *Physica status solidi C- Current topics in solid state physics.* 6, 2199-2206.

Jones, W. T. et Mangan, J. L. (1976) Large scale isolation of fraction 1 leaf protein (18S) from lucerne (*Medicago Sativa L.*). *J. Agric. Sci.*, 86, 495-501.

K

Kaczmariski, K. (2004) Modelling of expanded bed adsorption process. *Inzynieria Chemiczna I Procesowa.* 25, 1035-1040.

Kaczmariski, K., Bellot, J.C. (2004). Theoretical Investigation of Axial and Local Particle Size Distribution on Expanded Bed Adsorption Process. *Biotechnol.Prog.* 20, 786- 792.

Kamm, B., Schonicke, P., Kamm, M. (2009) Biorefining of green biomass - Technical and energetic considerations, *Clean*, 37, 27-30.

Kang, Y, Nah, J.B, Min, B.T (1990) Dispersion and fluctuation of fluidized particles in a liquid-solid fluidized bed, *Chem. Eng. Comm.*, 97, 197-208.

Kapel, R., Chabeau, A., Lesage, J., Riviere, G., Ravallec-Ple, 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 Chem.*, 98, 120-126.

Karau, A., Benken, C. Thommes, J. et Kula, M-R. (1997). The influence of particle size distribution and operating conditions on the adsorption performance in fluidized beds. *Biotechnol Bioeng.* 55, 54-64.

Kedem, O., Bromberg, L. (1993) Ion-exchange membranes in extraction processes. *J. Memb. Scie.* 78, 255-264.

Keller, K., Friedmann, T., Boxman, A. (2001) The bioseparation needs for tomorrow. *Trends in Biotechnol.* 19, 438-441.

Knight, S., Andersson, I. et Branden, C. I. (1990) Christallographic analysis of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution. Subunit interactions and active site. *J. Mol. Biol.*, 215, 113-160.

Knuckles, B. E. et Kohler, G. O. (1982) Functional properties of edible protein concentrates from alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(4), 748-752.

Kohler, G.O. (1972) Review of leaf protein concentrate. Production and projected uses, 11 th Tech. Alfalfa, ARS 74.60.

Kohler, G.O., Knuckles, B.E. (1977) Edible protein from leaves, *food technol.*, 31, 191.

Kopaciewicz, W., Pounds, M.A., Regnier, F.E., (1983) Retention model for high performance ion-exchange chromatography. *J of Chrom*, 266, 3-21.

Koschuh, W., Povoden, G., Thang, V.H., Kromus, S., Kulbe, K.D., Novalin, S., Krotscheck, C. (2004) Production of leaf protein concentrate from ryegrass (*Lolium perenne* x *multiflorum*) and alfalfa (*Medicago sativa* subsp, *sativa*). Comparison between heat coagulation/centrifugation and ultrafiltration, *Desalination*, 163, 253-259.

Koutsoukos, P.G, Mumme-Young, C.A, Norde, W. Lyklema, J. (1982) Effect of the nature of the substrate on the adsorption of human plasma albumin, *Colloids and surfaces*, 5, 93-104.

Kromus, S., Kamm, B., Kamm, M., Fowler, P., Narodslawsky, M., (2006) Biorefineries – Biobased Industrial Processes and Products. Status Quo and Future Directions, Wiley- VCH, Weinheim, 1, 253-294.

L

Ladiwala, A., Rege, K., Breneman, C.M., Cramer, S.M. (2005) A priori prediction of adsorption isotherm parameters and chromatographic behavior in ion-exchange systems. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America.* 102, 11710-11715.

Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-5.

Lamarche, F. et Landry, L. (1992). Les nouvelles protéines alimentaires à base végétale, *Interface*, 22-32.

Lamsal, B. P., Koegel, R. G., Gunasekaran, S. (2007) Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins *LWT*, 40, 1520-1526.

Levesque, D., Rambourg, J.C. (2002) Method for processing the raw juice produced from pressing a protein-leaf rich material such as alfalfa, patent WO 02/058482.

Levenspiel, O. (1972). *Chemical Reaction Engineering*. 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Lewis, E.W; Bowerman, E.W. (1952). Fluidization of solid particles in liquids. *Chem. Eng. Prog.* 48, 603.

Li, G.L., Mao, H., Ruan, X., Xu, Q., Gong, Y., Zhang, X. et Zhao, N ; (2002). Association of heat-induced conformational change with loss of Rubisco. *Biochem. Biophys. Res. Comm*, 290, 1128-1132.

Li, J., Chase, H.A. (2009) Characterization and evaluation of a macroporous adsorbent for possible use in the expanded bed adsorption of flavonoids from *Ginkgo biloba* L. *J. of Chrom. A.* 1216, 8730-8740.

Li, P., Xiu, G.H., Rodrigues, A.E. (2004) A 3-zone model for protein adsorption kinetics in expanded beds. *Chem. Eng. Sc.* 59, 3837-3847.

Li, P., Xiu, G., Rodrigues, A.E. (2005) Experimental and Modelling study of Protein Adsorption in Expanded Bed, *AIChE journal*, vol 5 (n°11), 2965 - 2977.

Li, Y.L., Pinto, N.G. (1994) Influence of lateral interactions on preparative protein chromatography I. Isotherm behaviour. *J. Chromatogr. A*, 658, 445-457.

Libouga, D.G., Aguié-Béghin, V., Douillard, R. (1996) Thermal denaturation and gelation of rubisco: effects of pH and ions *International Journal of Biological Macromolecules*, 19, 271-277.

Lightfoot, E.N., Moscariello, J.S. (2004) *Bioseparations in Wiley InterScience*. DOI:10.1002/bit.20111.

Lima, Y.I., Jørgensen, .B., Kim, I.H. (2005) Computer-aided model analysis for ionic strength-dependent effective charge of protein in ion-exchange chromatography. *Biochem. Eng. J.* 25, 125-140

Lusueur-Lambert, C., Prévot-D'Alvise, N., Bazus, A.F., Fertin, B., Dhulster, P. (2003) Development of a pilot process for the production of alfalfa peptide isolate, *J. Chem. Technol. Biotechnology*, 78, 518-528.

M

Mahmoud, A., Arlabosse, P., Fernandez, A. (2010) Application of a thermally assisted dewatering process to biomass, *Biomass Bioenerg.*, doi:10.1016/j.biombioe.2010.08.037.

Mahmoud, A., Fernandez, A., Chitu, T., Arlabosse, P. (2008) Thermally-Assisted Mechanical Dewatering (TAMD) of Suspensions of Fine Particles: Analysis of the influence of the operating conditions using the response surface methodology, *Chemosphere*, 72, 1765-1773.

Mauriès, M. (1994) *La Luzerne aujourd'hui: produire mieux*. Paris: Editions France Agricole.

Mazotti, M.(2006) Equilibrium theory based design of simulated moving bed processes for a generalized Langmuir isotherm. *J. Chromatogr. A.* 1126, 311–322.

McCabe, W. L., Smith, J. C. et Harriott, P. (1985) *Unit Operations of Chemical Engineering*, 4e édition, McGraw-Hill.

McCreath G. E., H. A. Chase , R. O. Owen, Lowe, C. R. (1995). Expanded bed affinity chromatography of dehydrogenase from baker's yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. *Biotechnol. Bioeng.* 48, 341-354.

Miao, Z.J., Lin, D.Q., Yao, S.J. (2005) Preparation and characterization of cellulose-stainless steel powder composite particles customized for expanded bed application. *Ind. & eng. Chem. Research.* 44, 8218-8224.

N

Ng, MY.T., Tan, W.S., Abdullah, N., Ling, T.C., Tey, B.T. (2008) Effect of different operating modes and biomass concentrations on the recovery of recombinant hepatitis B core antigen from thermal-treated unclarified *Escherichia coli* feedstock. *J. of Biotechnol.* 138, 3-4.

Nicolaos, A., Muhr, L., Gotteland, P., Nicoud, R.M., Bailly, M. (2001a) Application of equilibrium theory to ternary moving bed configurations (four+four, five+four, eight and nine zones). I. Linear case. *J. Chromatogr. A.* 908, 71-86.

Nicolaos, A., Muhr, L., Gotteland, P., Nicoud, R.M., Bailly, M. (2001b) Application of the equilibrium theory to ternary moving bed configurations (4+4, 5+4, 8 and 9 zones). II. Langmuir case. *J. Chromatogr. A.* 908, 87-109.

Nixon, L., Koval, C.A., Xu, L., Noble, R.D., Slaff, G.S. (1991). The effects of magnetic stabilization on the structure and performance of fluidized beds. *Bioseparations* 2, 217-230.

Nowak, J., Gedicke, K., Antos, D., Pi,atkowski, W., Seidel-Morgenstern, A. (2007) Synergistic effects in competitive adsorption of carbohydrates on an ion-exchange resin. *J. Chromatogr. A.* 1164, 224-234.

O

Ozyurt, S., Kirdar, B., Ulgen, K.O. (2002). Recovery of antithrombin III from milk by expended bed chromatography, *Journal of Chromatography A*, 944, 203-210.

P

Palsson, E., Axelsson, A., Larsson, P.O. (2001) Theories of chromatographic efficiency applied to expanded beds. *J.Chromatogr. A.* 912, 235-248.

Palsson, E., Nandakumar, M.P., Mattiasson, B. et Larsson, P.O. (2000). Miniaturised expanded-bed column with low dispersion suitable for fast flow-ELISA analyses. *Biotechnol. Lett.* 22, 245-250.

Pedruzzi, I., Borges da Silva, E.A., Rodrigues, A.E. (2008) Selection of resins, equilibrium and sorption kinetics of lactobionic acid, fructose, lactose and sorbitol. *Separation and Purification Technology*. 63, 600-611.

Poux, N. (1962) Nouvelles observations sur la nature et l'origine de la membrane vacuolaire des cellules végétales. *J. Microscopic*. 1, 55.

Pirie, N.W. (1969) The present position of research on the use of leaf protein as a human food, *Pl. Fds. Hum. Nutr.*, 1, 237-246.

Prévot d'Alvise, N., Lesueur-Lambert, C., Fertin-Bazus, A., Fertin, B., Dhulster, P. (2003). Development of a pilot process for the production of alfalfa peptide isolate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78, 518-528.

Prévot d'Alvise, N., Lesueur-Lambert, C., Fertin-Bazus, A., Fertin, B., Dhulster, P., Guillochon, D. (2004). Continuous enzymatic solubilisation of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 380-391.

R

Ramos, A., Acien, F.G., Fernandez-Sevilla, J.M., Gonzalez, C.V., Bermejo, R. (2010) Large-scale isolation and purification of C-phycoerythrin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. *J. chem. Technol and biochem.* 85, 783-792.

Regnier, F.E. (1987) The role of protein structure in chromatographic behaviour, *Science*, 238, 319-323.

Richardson, J.F. et Zaki, W.N. (1954) Sedimentation and fluidization : Part I. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 32, 35-52.

Roush, D.J. and Lu, Y. (2008) Advances in primary recovery: centrifugation and membrane technology. *Biotechnol. Prog.* 24, 488-495.

Rounds, M.A., Kopaciewicz, W., Regnier, F.E. (1986) Factors contributing to intrinsic loading capacity in silica-based packing materials for preparative anion-exchange protein chromatography. *Journal of Chromatography*, 362, 187-196.

S

Sandgate, A., Tippe, D., Dilsen, S., Meens, J., Halfar, M., Weyster- Botz, D., Freudl, R., Thommes, J., Kula, M.R. (2003) Production of a human calcitonin precursor with *Staphylococcus carnosus*: secretory expression and single-step recovery by expanded bed adsorption. *Process Biochem.* 38, 1351-1363.

Sauveur, B. (1988) Structure, composition et valeur nutritionnelle de l'oeuf in reproduction des volailles et production d'oeuf. Paris, INRA, 347-74.

Schügerl, K., Jürgen, H. (2005) Integrated bioprocesses. *Current Opinion in Microbiology*. 8, 294-300.

Sheen, S.J. (1991) Comparison of chemical and functional properties of soluble leaf proteins from four plant species. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 39(4), 681-685.

Shi, F., Lin, D.Q., Phottraithip, W., Yao, S.J. (2011) Preparation of Cellulose-Tungsten carbide composite beads with ionic liquid for expanded bed adsorption application. *J. of applied polymer Sc.* 119, 3453-3461.

Sissel, H., Valentina, B.V., Edward, H., Kjell, A. (1999) The crystal structure of rubisco from *Alcaligenes eutrophus* reveals a novel central eight-stranded β -barrel formed by β -strands from four subunits. *Journal of Molecular Biology*, 288, (4), 609-621.

Slater, M.J. (1992) Axial mixing and flow abnormalities. The principles of ion exchange technology. Ed Butterworth-Heinemann, Oxford, England, 41-49.

Stahmann, M.A. (1978) Anaerobic fermentation for coagulation of plant juice protein and preservation of protein and fibrous residues. In Proc. 2nd Int. Green Crop Drying Congress. University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 42-49.

Starke, I., Holzberger, A., Kamm, B., Kleinpeter, E. (2000) Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in green juices (wild mix grass and alfalfa) from a green biorefinery by gas chromatography / mass spectrometry. *Fresenius, J. Anal. Chem.*, 367, 65-72.

Streatkvern, K.O., Schwarz, J.G., Wiesenborn, D.P., Zafirakos et E., Lihme, A. (1999) Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice. *Bioseparation*, 7, 333-345.

Su, X.L., Sun, Y. (2006) Thermodynamic model for nonlinear electrostatic adsorption equilibrium of protein *AIChE J.* 52, 2921-2930.

T

Telek, L., Graham, H.D. (1983) Leaf Protein Concentrates, AVI Publishing Company, Westport, Connecticut.

Theodossiou, I., Elsner, H.D., Thomas, O.R.T. et Hoble, T.J. (2002) Fluidisation and dispersion behaviour of small high density pellicular expanded bed adsorbents. *J.chromatogr. A.* 964, 77 – 89.

Thommes, J. (1997) Fluidized Bed Adsorption as a primary recovery step in protein purification. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 58, 185-230.

Thommes, J., Halfar, M., Gieren, H., Curvers, S. and Takors, R. (2001) Human Chymotrypsinogen B production from *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 2. Protein recovery. *Biotechnol. Prog.* 17, 503-512.

Thommes, J., Halfar, M., Lenz, S. et Kula, M.R. (1995a) Purification of monoclonal antibodies from whole hybridoma fermentation broth by fluidised bed adsorption. *Biotechnol.Bioeng.* 45, 203-211.

Thommes J, Weiher M, Karau A, Kula MR (1995b) Hydrodynamics and performance in fluidised bed adsorption. *Biotechnol. Bioeng.* 48, 367- 374.

Tomimatsu, Y. (1980) Macromolecular properties and subunit interactions of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase from alfalfa. *Biochim. Biophys.* 622, 85-93.

Tong, X.D., Dong, X.Y. et Sun, Y. (2002) Lysozyme adsorption and purification by expanded bed chromatography with a small-sized dense adsorbent *Biochem.Eng.J.* 12, 117-124.

Tong, X.D. et Sun, Y. (2002) Particle size and density distributions of two dense matrices in an expanded bed system. *J.Chromatogr. A.* 977, 173-183.

Tong, X.D., Xue, B., Sun, Y. (2003) Modeling of expanded-bed protein adsorption by taking into account the axial particle size distribution. *Biochem Eng J.* 16, 265-272.

Thornber, J. P. 1975. Chlorophyll-proteins: Light-harvesting and reaction center components of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26, 127-158.

Tsou, H.S., Graham, E.E. (1985) Prediction of adsorption and desorption of protein on dextran based ion-exchange resins. *AIChE J.*, 31, 1959.

Tyn, M.T., Gusek, T.W. (1990) Prediction of diffusion coefficients of proteins. *Biotech and Bioeng.* 35, 327-338.

U

Uhl, V.W., Grey, J.B. (1966) *Mixing: Theory and Practice*, Vol. I, Academic Press, New York, 111-172.

V

Van Der Meer, A.P., Blanchard, C.M.R.J.P., Wesselingh, J.A. (1984) Mixing of particles in liquid fluidised beds. *Chem.Eng.Des.Res.* 64, 214-222.

Vanecek, G., Regnier, F. E. (1980) Variables in the high-performance anion-exchange chromatography of proteins. *Analytical Biochemistry*, 109, 345-353.

Vergnault, H. (2004) Etude et amélioration de la chromatographie en lit expansé. Thèse de doctorat Université de Toulouse n° 753.

Villiermaux, J. (1993) *Génie de la Réaction Chimique. Conception et fonctionnement des réacteurs.* 2nd Ed., Lavoisier Tec&Doc.

Voet, D., Voet, G.J. (2005) *Biochimie.* 2eme édition De Boeck et Larcier, Bruxelles, traduction de la 3eme édition americaine par Guy rousseau et Lionel Domenjoud.

W

Wang, J. C. et Kinsella, J. E. (1976) Functional properties of novel protein: Alfalfa leaf proteins. *Journal of Food Science*, 41(2), 286-292.

Wee, C.C. (2008) *Chromatographic purification strategies for recombinant human transferring from Spodoptera Frugiperda.* Universiti Teknologi Malaysia

Wildman, S. G. et Bonner, J. (1947) The proteins of green leaves. 1. Isolation, enzymatic properties and auxin content of Spinach cytoplasmic proteins. *Arch. Biochem.*, 14, 381-413.

Wohlgemuth, R. (2009) The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotechnology.* 25, 204-213.

Wright, P. (2000) The effect of mass transfer and hydrodynamics on fluidized bed adsorption of proteins. PhD thesis, University of New Brunswick, New-Brunswick, Canada.

X

Xia, H. F., Lin, D.Q. & Yao, S.J. (2007a). Evaluation of new high-density ion exchange adsorbents for expanded bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography A*, 23, 58-66.

Xia, H.F., Lin, D.Q., Yao, S.J. (2007b) Preparation and characterization of macroporous cellulose-tungsten carbide composite beads for expanded bed applications, *J. of Chrom.* 1175, 55-62.

Xin, Z., Bo, X., Shu, B., Yan, S. (2002) Macroporous polymeric ion exchanger of high capacity for protein adsorption. *Biochem. Eng. J.* 11, 13-17.

Xu, T. (2005) Ion exchange membranes: State of their development and perspective. *J. Memb. Scie.* 263, 1-29.

Y

Yamamoto, S., Akazari, N., Kaltenbrunner et Walter, P. (1999). Factors affecting dispersion in expanded bed chromatography. *Bioseparation.* 8, 33-41.

Yap, W.B., Tey, B.T., Alitheen, N.B.M., Tan, W.S. (2010) Purification of His-tagged hepatitis B core antigen from unclarified bacterial homogenate using immobilized metal affinity-expanded bed adsorption chromatography, *J. of Chrom. A*, 1217, 3473-3480.

Yun, J., Lin, D.Q., Yao, S.J. (2005) Predictive modeling of protein adsorption along the bed height by taking into account the axial nonuniform liquid dispersion and particle classification in expanded beds. *J. Chromatogr. A*, 1095,16-26.

Yun, J.X., Lin, D.Q., Lu, M.H., Zhong, L.N., Yao, S.J. (2004b) Measurement and modeling of axial distribution of adsorbent particles in expanded bed: taking into account the particle density difference. *Chem. Eng. Sc.* 59, 5873-5881.

Yun, J., Yao, S.J., Lin, D.Q., Lu, M.H. et Zhao, W.T. (2004a). Modeling axial distributions of adsorbent particles size and local voidage in expanded bed. *Chem. Eng. Sc.* 59, 449-457.

Z

Zafirakos, E., Lihme, A. EBA '96, First International Conf. on Expanded-Bed Adsorption, Cambridge, UK, O.12.

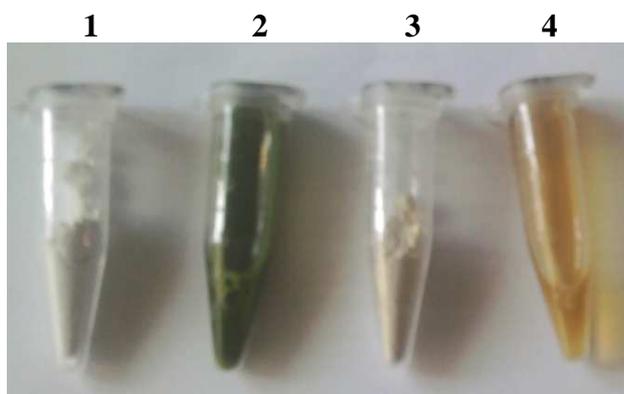
Zhao, J., Lin, D.Q., Wang, Y.C., Yao, S.J. (2010) A novel beta-cyclodextrin polymer/tungsten carbide composite matrix for expanded bed adsorption: Preparation and characterization of physical properties, *Carbohydrate Polymers.* 80, 1085-1090.

ANNEXES

Annexe 1

Observations générales des interactions du jus de luzerne avec l'échangeur d'ions

- Cas de l'échangeur anionique



Légende

1 : Q Hyper Z avant contact avec le jus

2 : Jus de luzerne reconstitué

3 : Q Hyper Z filtrée après 2 heures de contact avec le jus

4 : Fraction obtenue après 1 heure de contact entre le support chargé et une solution NaCl 0,5 mol.L⁻¹

- Cas de l'échangeur cationique



Légende

1 : Jus de luzerne reconstitué

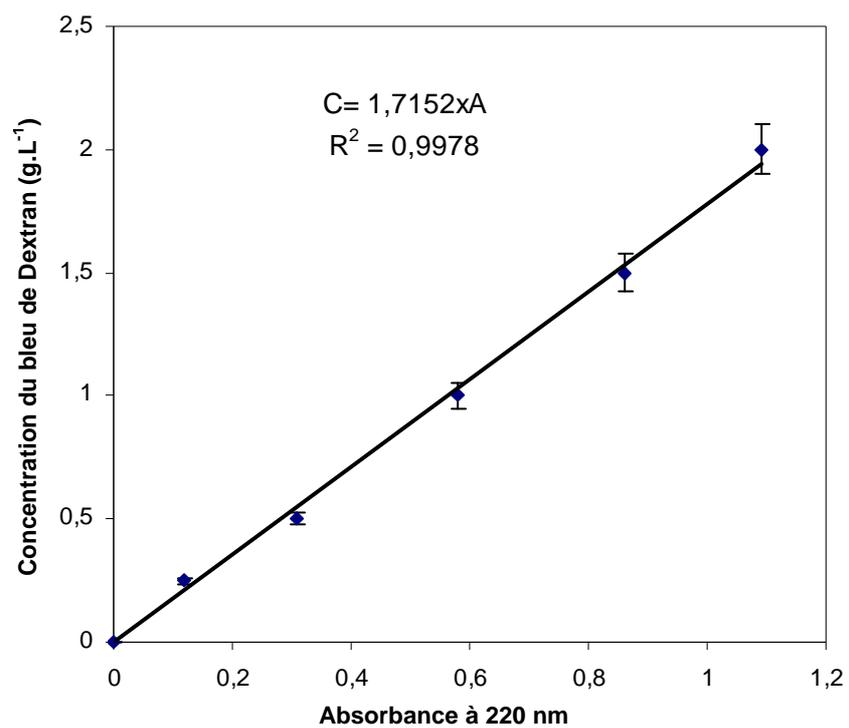
2 : CM Hyper Z avant contact avec le jus

3 : Fraction obtenue après 1 heure de contact entre le support chargé et une solution NaCl 0,5 mol.L⁻¹

4 : CM Hyper Z filtrée après 2 heures de contact avec le jus

Annexe 2

Représentation de la concentration en bleu de Dextran en fonction de l'absorbance à 220 nm



Résumé

Les milieux biologiques bruts, provenant des opérations de transformation de biomasse sont souvent caractérisés à la fois par leur caractère polluant et par un potentiel de valorisation important. Le développement de procédés adaptés au traitement de tels milieux complexes présente ainsi beaucoup d'intérêt. Les jus verts générés par la déshydratation de la luzerne (*Medicago Sativa*) sont caractérisés par une forte teneur en protéines. Outre leur valeur nutritionnelle importante, ces protéines ont des applications potentielles dans plusieurs domaines, notamment environnemental de part leur teneur élevée en Ribulose 1,5 Bisphosphate Carboxylase Oxydase (Rubisco), enzyme responsable de la fixation du CO₂ chez les plantes. Dans ce travail la séparation sélective de la Rubisco à partir du jus de luzerne industriel centrifugé par chromatographie d'échange d'ions a été étudiée. Dans un premier temps une méthode d'analyse qualitative et quantitative a été mise au point pour la détection et la quantification de la Rubisco en solution et ainsi le suivi du procédé de séparation. Dans un deuxième temps, le procédé de séparation a été étudié en colonne, en lit fixe et en lit expansé, en utilisant le support échangeur d'anions Q Hyper Z et l'effet de la dilution du milieu sur la capacité dynamique du procédé a été analysé dans les deux cas. Les résultats obtenus ont montré que les deux modes de contact permettent d'avoir des capacités dynamiques de rétention du même ordre de grandeur que celles de la littérature. Après élution, la Rubisco a été concentrée jusqu'à 21 fois et les fractions produites étaient caractérisées par un grand degré de pureté. Par ailleurs, des études d'équilibre et cinétique d'échange ont été initiées dans ce travail et ont démontré que malgré la taille importante de la protéine d'intérêt (560 kDa) les limitations stériques à son transfert ne sont pas plus importantes que dans le cas de protéines plus simples et plus petites et que le support Q Hyper Z présente effectivement une grande affinité pour la protéine. Enfin une première approche théorique a été conduite pour la compréhension des interactions entre la protéine et l'échangeur dans ce milieu complexe. Elle a permis de confirmer l'importance de la prise en compte de la présence d'autres biomolécules dans le milieu sur la rétention de la Rubisco, peut être même plus que celle des sels.

Mots-clés : Procédés chromatographiques, Echange d'ions, Lit expansé, Rubisco, Milieu brut, Milieu complexe, Valorisation sous-produits agricoles

Abstract

Biological raw material derived from bio-refinery processes, is often considered a source of pollution but it seems also to be a promising alternative to potential material recovery. The development of suitable processes for handling such complex biological material has so many concerns. Green juice produced from mechanical dehydration of Alfalfa (*Medicago sativa*) is an excellent source of protein with high nutritional quality. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) is the most abundant protein in the green juice, with potential applications in many fields, such as human nutrition, pharmaceuticals, environmental... The aim of this study is to isolate and recover Rubisco produced from an industrial alfalfa green juice, by ion exchange chromatography process. First of all, a qualitative and quantitative analytical method was developed to provide reliable information about Rubisco content monitoring in the separation process. In a second step, the separation process was performed in fixed and expanded bed, using the anion exchanger Q Hyper Z. In both cases, the effect of the dilution of the green juice on the dynamic capacity of the columns was studied. The results showed that the dynamic capacity retention was similar in both columns to those reported in literature. After elution step, Rubisco was concentrated 21 times and produced with high level of purity. Furthermore, kinetic of ion exchange study was initiated. Despite the large size of the protein (560 kDa), steric limitations to mass transfer were not very significant when compared to those of conventional small proteins. The support Q Hyper Z showed an excellent affinity for the protein recovery. Finally, a first theoretical investigation has been conducted for understanding the retention mechanism between the protein and the separation column. This study shows the importance of taking into account the presence of other bio-molecules in order to perform the retention of Rubisco, perhaps even more than that of salts.

Keywords: Chromatographic processes, Ion exchange, Expanded bed, Rubisco, Crude extract, Complex medium, Agro-food by-product recovery