

**Véronique Solé**

INRA Nantes

Unité Biopolymères Interactions Assemblages

Plateforme purification de protéines



# Fractionnement des protéines végétales: spécificités et limites

**Innovation-Protéines-Prod**

**Technologies innovantes en séparation industrielle des protéines**



Véronique Solé

28-30 Octobre 2013

# INTRODUCTION

Utilisation des protéines de réserve de la graine:

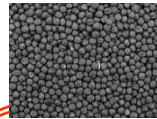
- ❖ Nutrition animale et humaine
- ❖ Fonctionnalités technologiques
  
- ❖ BIA: relation entre structure/fonction  
⇔ développer des fonctionnalités dans les formulations alimentaires et non alimentaires
  - Propriétés visco élastique gluten
  - Propriétés tensio actives et gélifiantes: pois, colza = alternative au soja
  
- ❖ Connaissance de la structure et propriétés intrinsèques ⇒ Purification

# Plateforme purification de protéines BIA

## Missions

Développement de méthodes

Caractérisation



**Extraction et purification de protéines**

**à partir d'extraits d'organes végétaux ou animaux, protéines recombinantes**



Gestion

Qualité

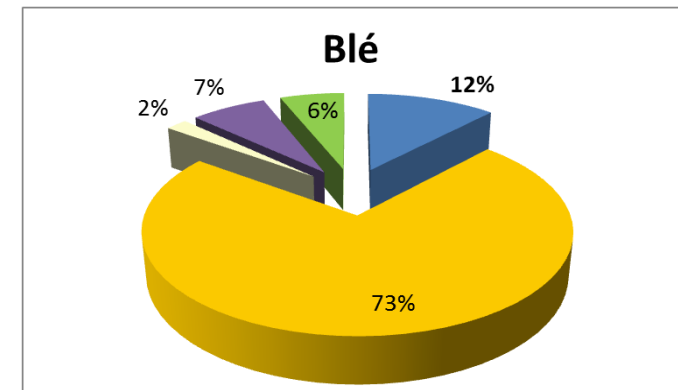
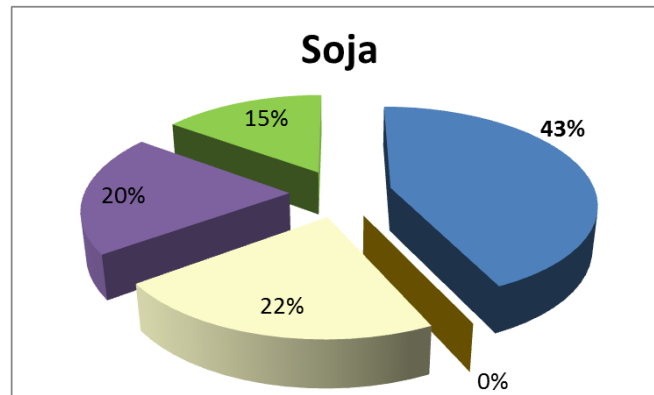
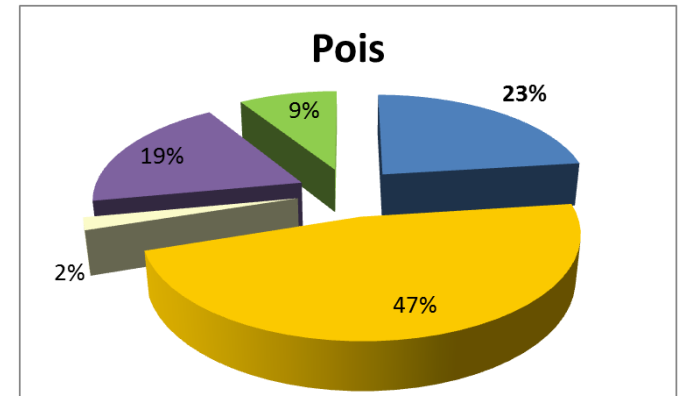
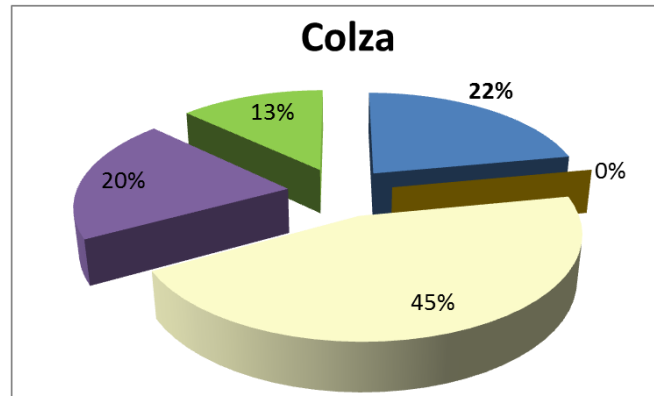
Conseil

Formation

# Composition des graines

Protéines Amidon Lipides Fibres Divers

■ ■ ■ ■ ■



# Les protéines de la graine

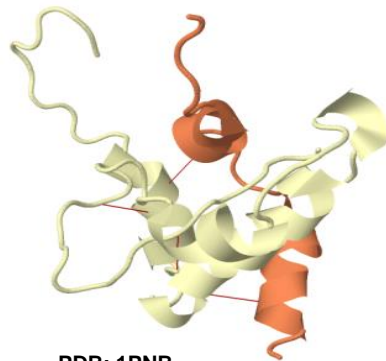
Classification selon leur solubilité différentielle: Osborne (1924)

	ALBUMINES	GLOBULINES	PROLAMINES	GLUTELINES
SOLUBILITE	EAU	SOLUTIONS SALINES	ALCOOL 70°GL	pH > 11
ROLE	PHYSIOLOGIQUE	<-----	RESERVE	----->
SOJA	10	90	-	-
POIS	20	65	-	15
TOURNESOL	20	60	5	15
COLZA	50	25	5	10
BLE	5	10	45	40

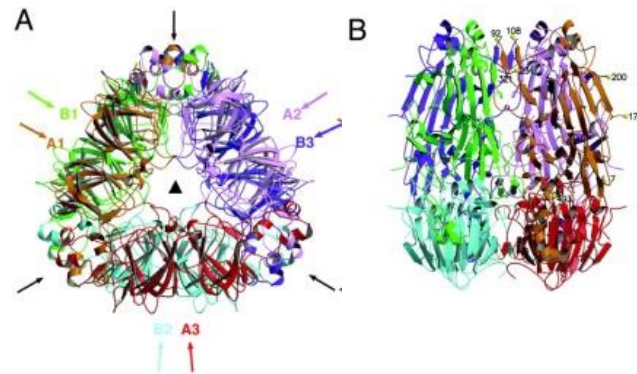
# Structures et propriétés physicochimiques

## Albumines et globulines

- **Albumines 2S:** solubles et stables  $\Rightarrow$  chromatographie classiques
- **Globulines 7S et 11S:**
  - structure oligomérique fragile: équilibre entre trimères/hexamère  $\Rightarrow$  tendance à l'agrégation,
  - polymorphisme génétique  $\Rightarrow$  famille hétérogène à l'échelle moléculaire



PDB: 1PNB



Adachi M et al. PNAS 2003;100:7395-7400

# Structures et propriétés physicochimiques

## Prolamines

- Prolamines:

- monomères solubles dans l'éthanol ou pH acide
- polymères forment réseau par pont SH  $\Rightarrow$  insoluble
- motifs répétés riches en PQ peu chargés et hydrophobes
- grande variabilité génétique  $\Rightarrow$  peu d'homogénéité à l'échelle moléculaire

HMW Prolamin: HMW subunit (1Dx5)



S-Rich Prolamin:  $\gamma$ -type gliadin



S-Poor Prolamin:  $\omega$  gliadin



# Schéma de fractionnement général

Exemples de verrous avec le fractionnement du colza, pois, blé et soja

## ❖ Extraction :

- Solubilité: pH, force ionique, température
  - Présence de composants de la graine :
    - lipides  $\Rightarrow$  impact sur la solubilité de la délipidation
    - polyphénols du colza  $\Rightarrow$  oxydation (bisulfite, décoloration)
    - acides nucléiques  $\Rightarrow$  capacité de chromatographie
- ↳ Importance des conditions d'extraction sur structure / fonction

Anderson-Haffermann, Zhang, & Parson, 1993

Bérot, 2005, Malabat, 2002





# Schéma de fractionnement général

Exemples de verrous avec le fractionnement du colza, pois, blé et soja



## ❖ Extraction :

- Solubilité: pH, force ionique, température
- Présence de composants de la graine :
  - lipides  $\Rightarrow$  impact sur la solubilité de la délipidation
  - polyphénols du colza  $\Rightarrow$  oxydation (bisulfite, décoloration)
  - acides nucléiques  $\Rightarrow$  capacité de chromatographie

Anderson-Haffermann, Zhang, & Parson, 1993

Bérot, 2005, Malabat, 2002

↳ Importance des conditions d'extraction sur structure / fonction

## ❖ Chromatographie: nécessité de screening car interactions avec la matrice

- Exemple: gliadines (S, SP, CM), pois (DEAE)

Guéguen, 1986

# Schéma de fractionnement général

Exemples de verrous avec le fractionnement du colza, pois, blé et soja



## ❖ Extraction :

- Solubilité: pH, force ionique, température
- Présence de composants de la graine :
  - lipides  $\Rightarrow$  impact sur la solubilité de la délipidation
  - polyphénols du colza  $\Rightarrow$  oxydation (bisulfite, décoloration)
  - acides nucléiques  $\Rightarrow$  capacité de chromatographie

Anderson-Haffermann, Zhang, & Parson, 1993

Bérot, 2005, Malabat, 2002

↳ Importance des conditions d'extraction sur structure / fonction

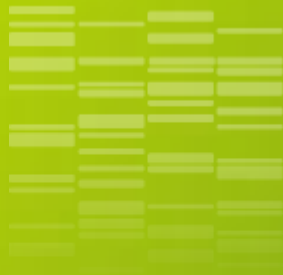
## ❖ Chromatographie: nécessité de screening car interactions avec la matrice

- Exemple: gliadines (S, SP, CM), pois (DEAE)

Guéguen, 1986

## ❖ Stockage agrégation des globulines

- Exemple: 11S soja et pois



\_01

# Fractionnement des protéines végétales: EXTRACTION

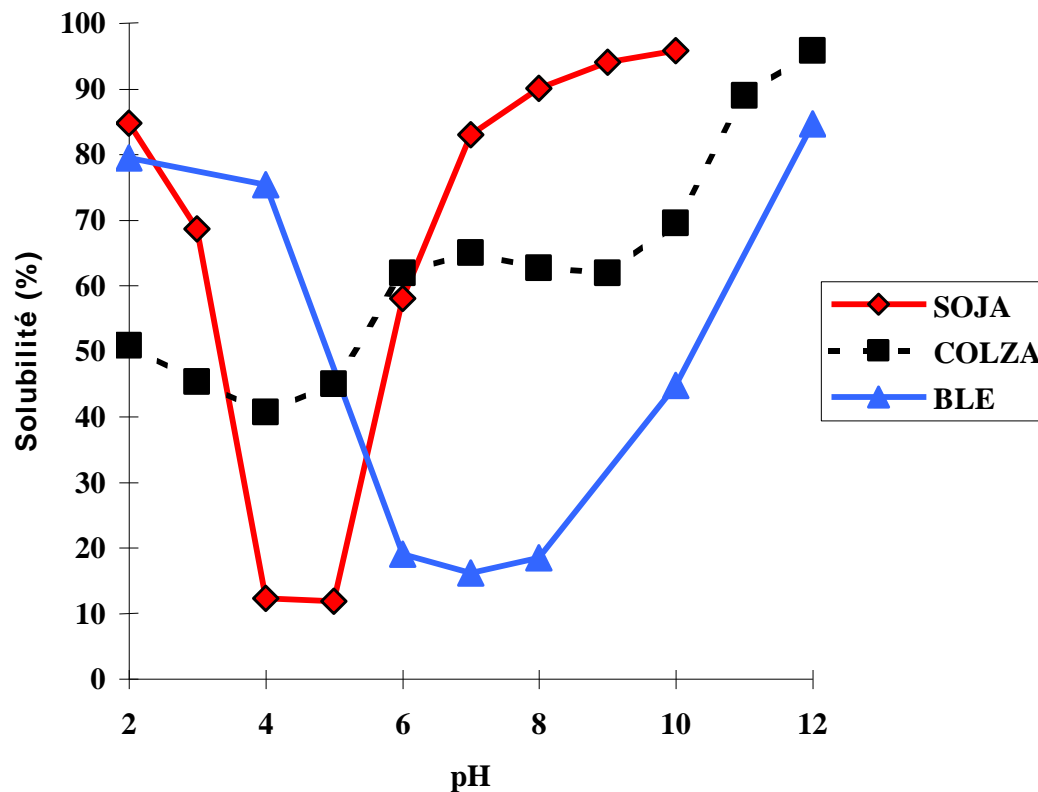
# Verrou 1 : Solubilité vs conditions d'extraction

## Solubilité selon le pH

Problèmes de compatibilité avec résines

Nature de protéine solubilisée

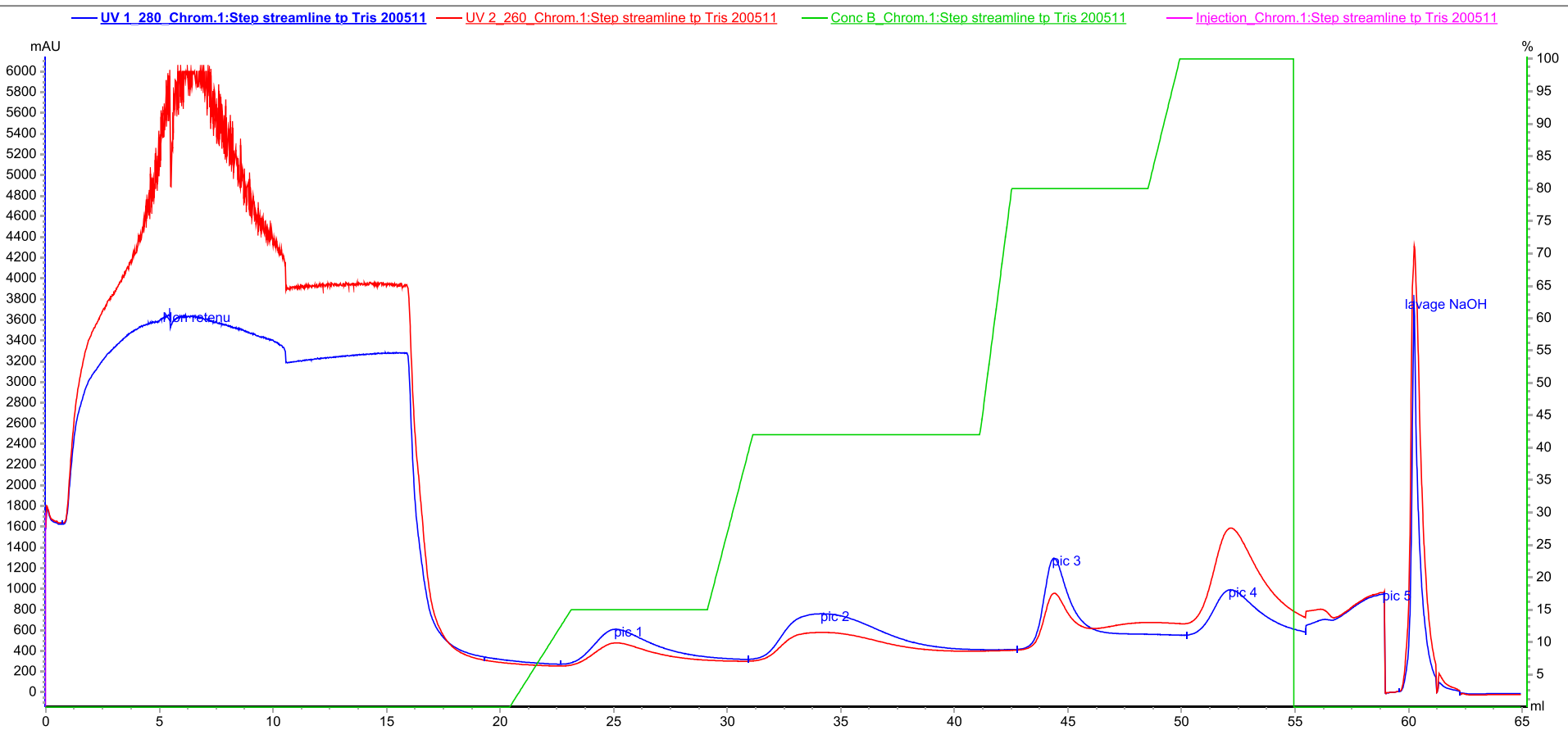
Ajout d'agent dénaturant, réducteur, ou antioxydant



# Présence de contaminants: acides nucléiques

## Diminution de capacité pour le fractionnement de globulines de pois sur DEAE

- ❖ Echantillon: Extrait de protéines de pois Frilène dans A1 (200mg)
- ❖ Colonne: DEAE Streamline 1mL
- ❖ Tampon A1: Tris 50mM pH8, Tampon B1: Tp A1 + 0.5M NaCl, Tampon A2: NaOH 0.5M



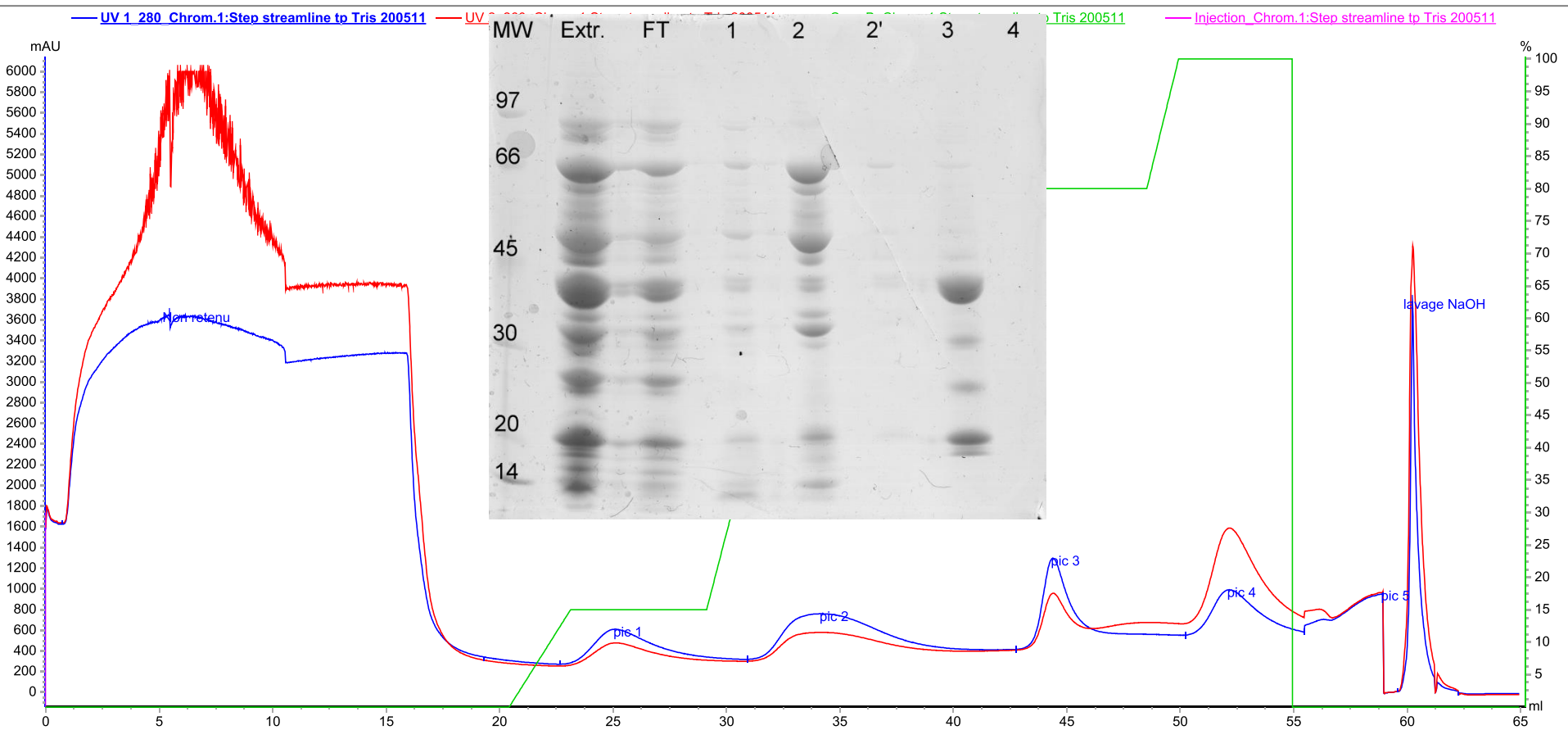
.013

28-30 octobre 2013

# Présence de contaminants: acides nucléiques

## Diminution de capacité pour le fractionnement de globulines de pois sur DEAE

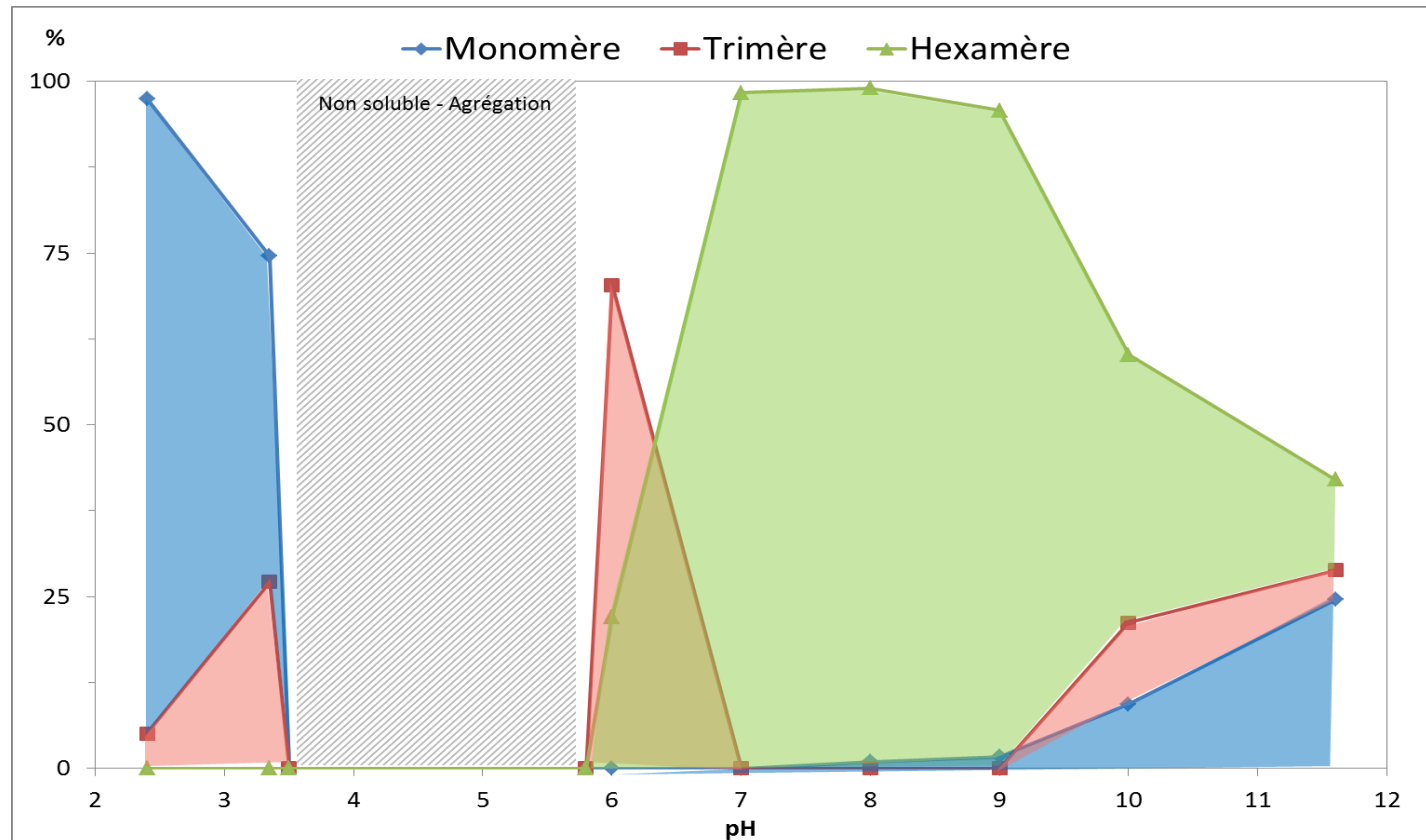
- ❖ Echantillon: Extrait de protéines de pois Frilène dans A1 (200mg)
- ❖ Colonne: DEAE Streamline 1mL
- ❖ Tampon A1: Tris 50mM pH8, Tampon B1: Tp A1 + 0.5M NaCl, Tampon A2: NaOH 0.5M



# Impact des conditions d'extraction sur la structure

## Dissociation de 11S pois induite par le pH à FI=0,1M

Structure oligomérique fragile = état conformationnel variable en fonction du pH, de la force ionique, de la température et des modifications chimiques

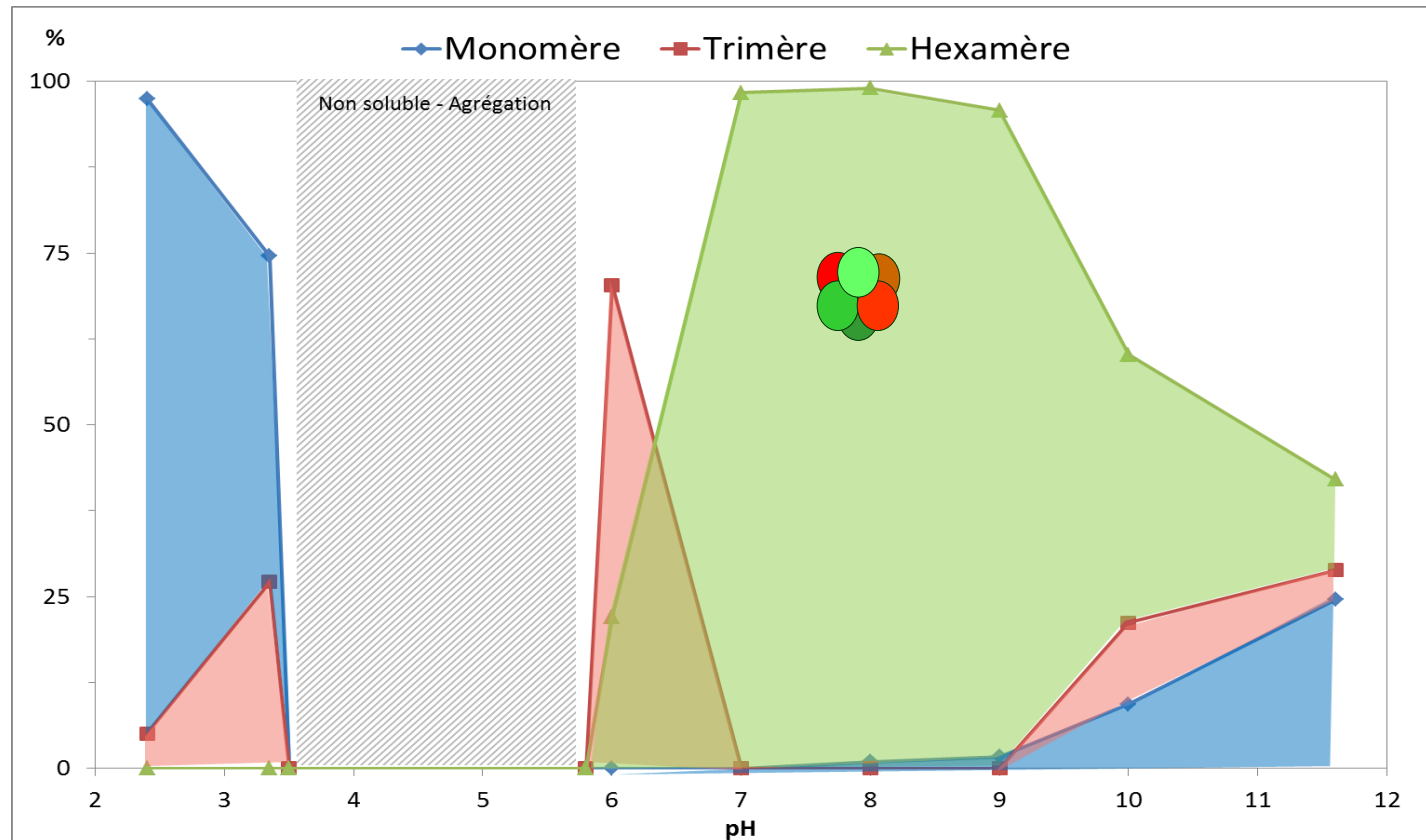


D'après Gueguen, J. et al, J. Sci. Food Agric. (1988) 44: 167-182

# Impact des conditions d'extraction sur la structure

## Dissociation de 11S pois induite par le pH à FI=0,1M

Structure oligomérique fragile = état conformationnel variable en fonction du pH, de la force ionique, de la température et des modifications chimiques



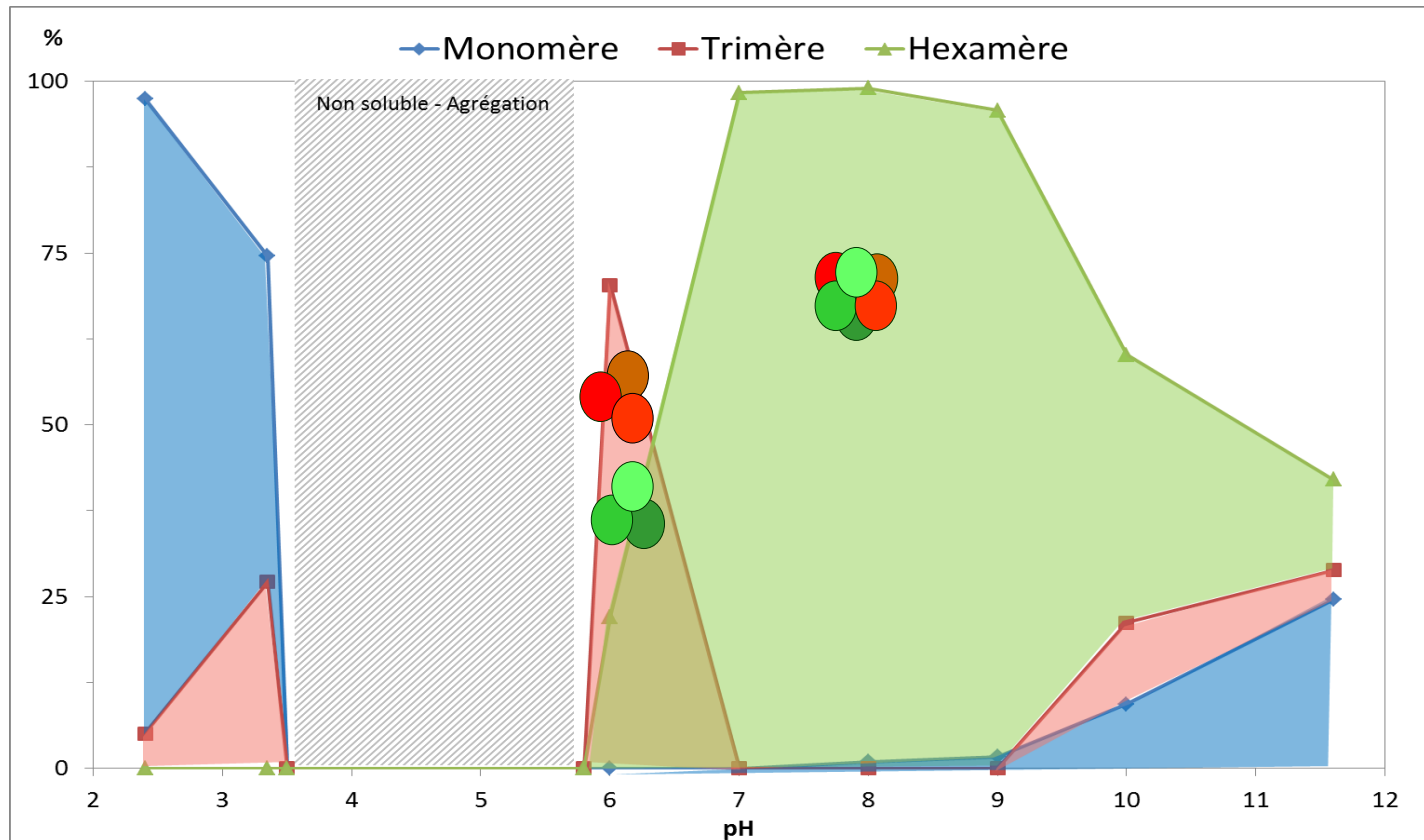
D'après Gueguen, J. et al, J. Sci. Food Agric. (1988) 44: 167–182



# Impact des conditions d'extraction sur la structure

## Dissociation de 11S pois induite par le pH à FI=0,1M

Structure oligomérique fragile = état conformationnel variable en fonction du pH, de la force ionique, de la température et des modifications chimiques

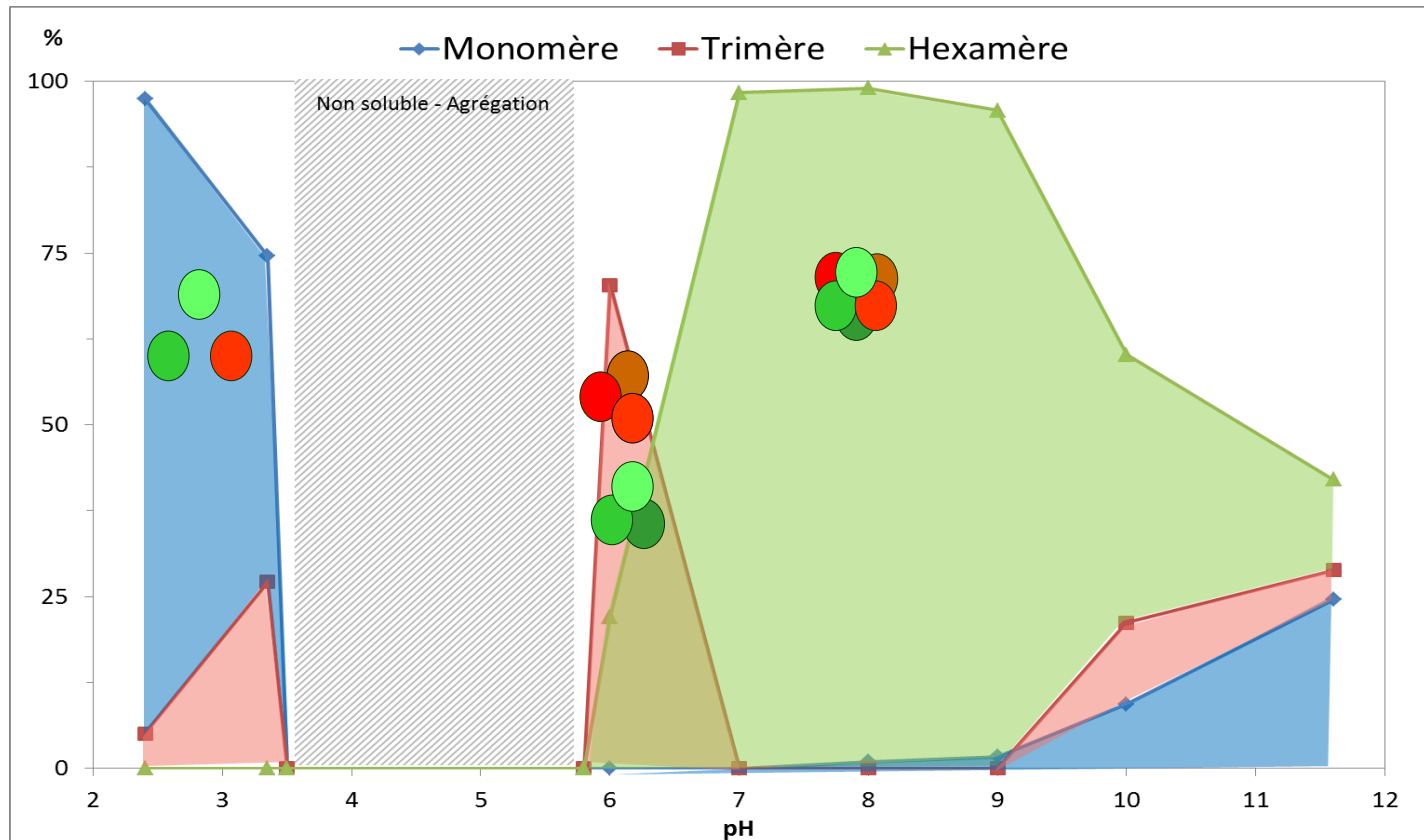


D'après Gueguen, J. et al, J. Sci. Food Agric. (1988) 44: 167–182

# Impact des conditions d'extraction sur la structure

## Dissociation de 11S pois induite par le pH à FI=0,1M

Structure oligomérique fragile = état conformationnel variable en fonction du pH, de la force ionique, de la température et des modifications chimiques

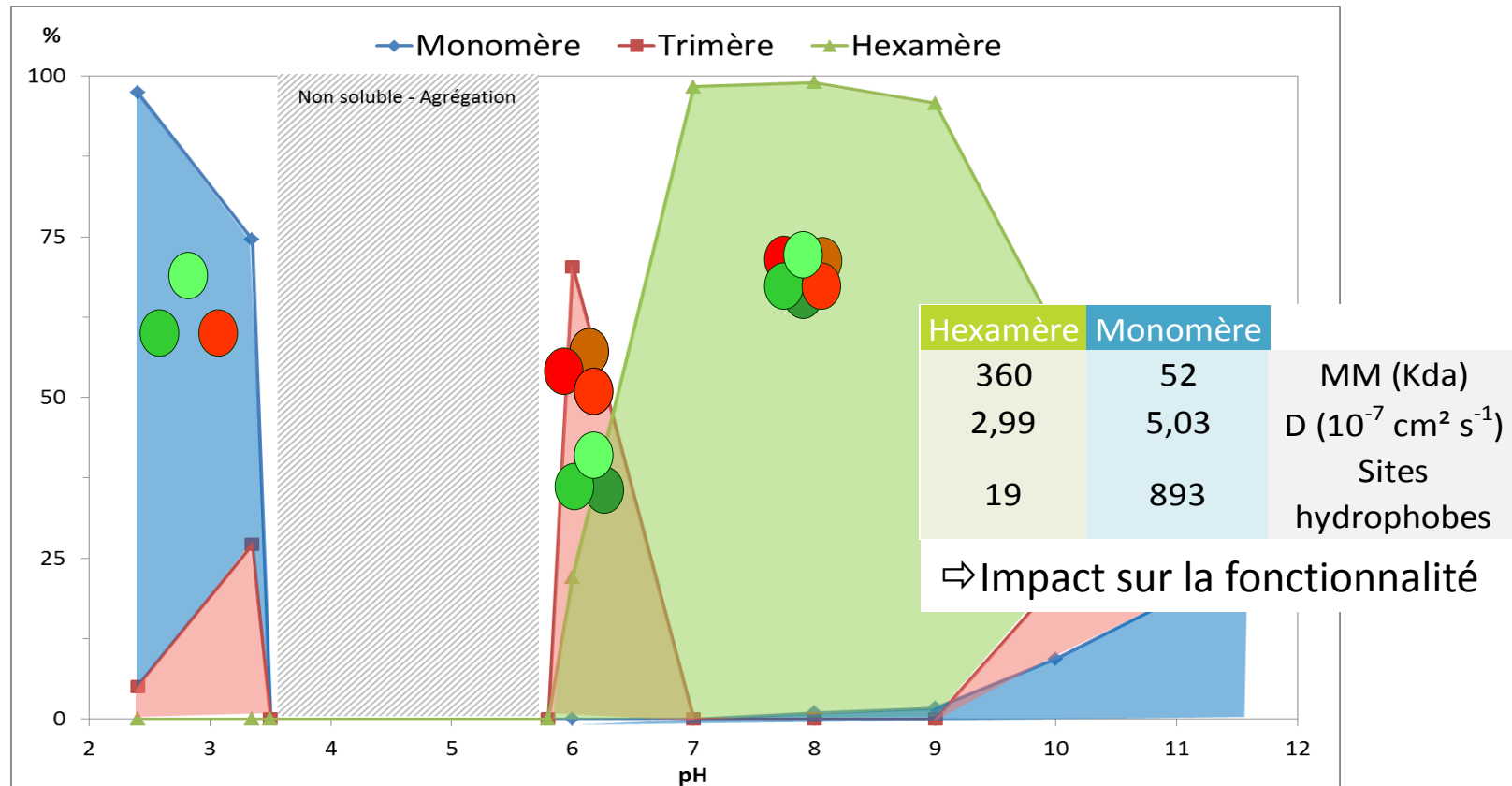


D'après Gueguen, J. et al, J. Sci. Food Agric. (1988) 44: 167–182

# Impact des conditions d'extraction sur la structure

## Dissociation de 11S pois induite par le pH à FI=0,1M

Structure oligomérique fragile = état conformationnel variable en fonction du pH, de la force ionique, de la température et des modifications chimiques



D'après Gueguen, J. et al, J. Sci. Food Agric. (1988) 44: 167–182

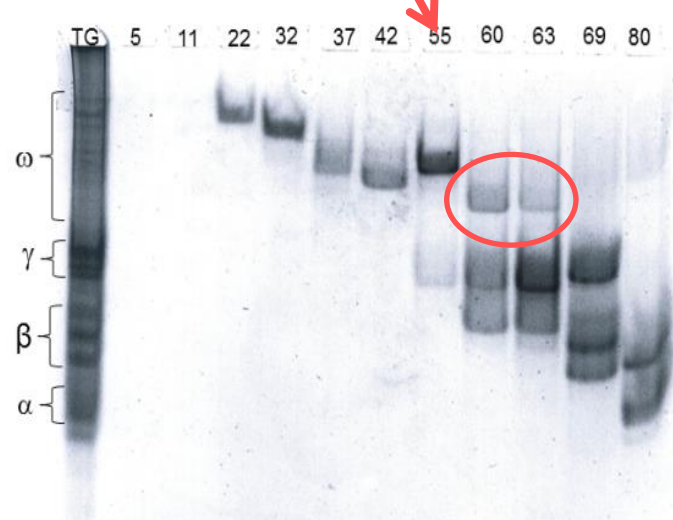
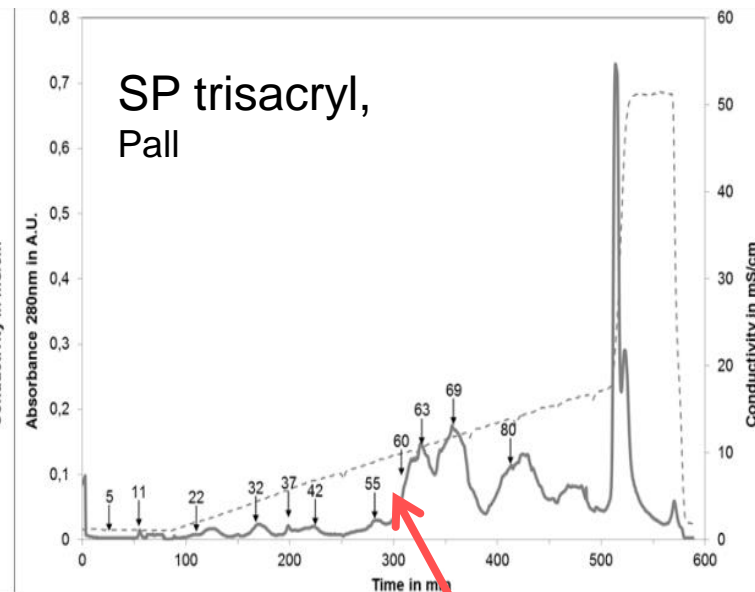
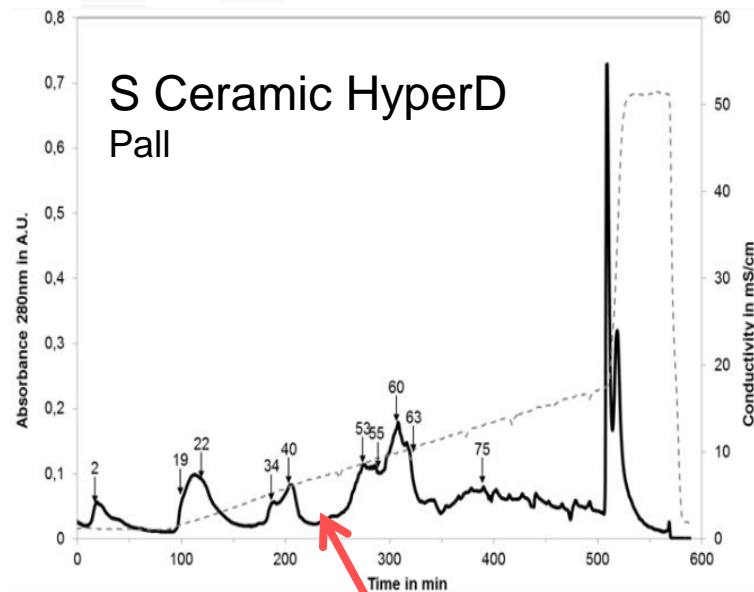


\_02

# Fractionnement des protéines végétales: CHROMATOGRAPHIE

# Interactions avec la matrice

## Screening de différentes résines pour la séparation des gliadines



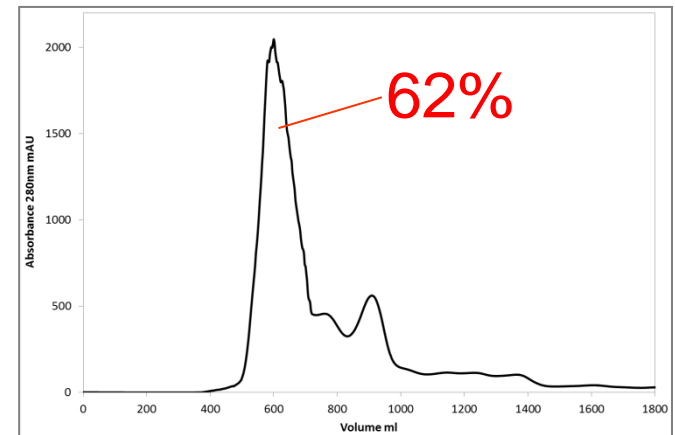
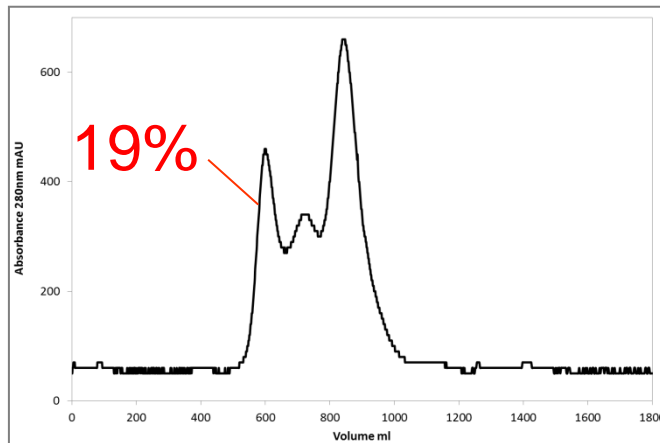
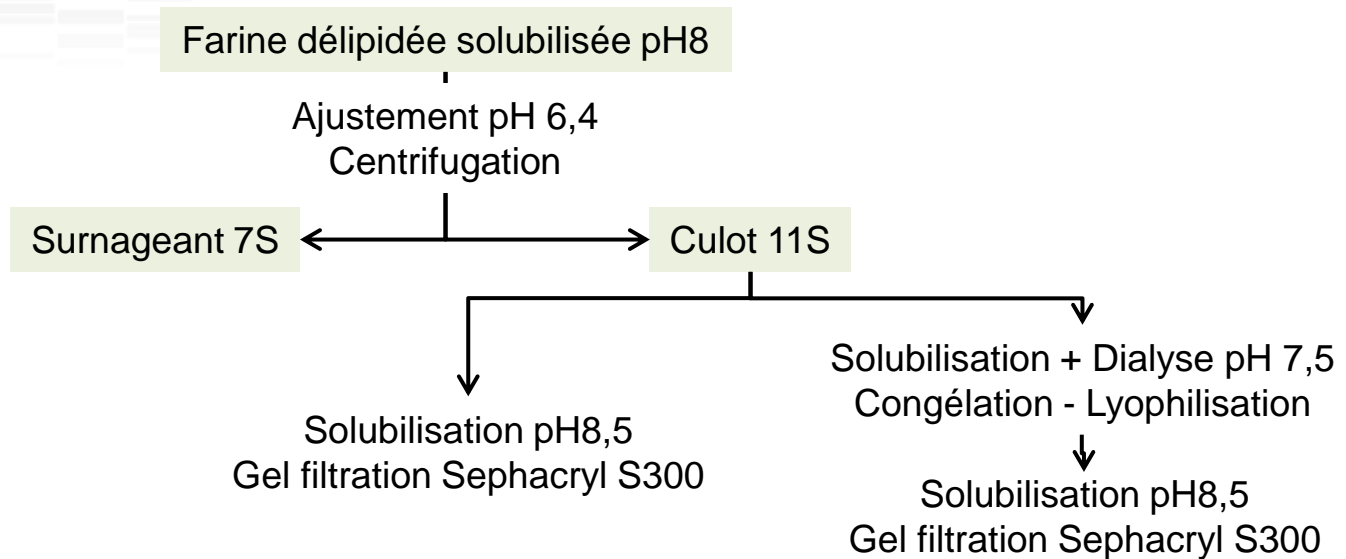


**03**

# Fractionnement des protéines végétales: STOCKAGE

# Stockage / Stabilisation des échantillons

## Influence de lyophilisation sur l'agrégation de la 11S soja



Conservation sous forme concentrée (SF. O'Keefe, et al. JAFC 1991, Lakemond JAFC 2000...)

# Conclusion

- ❖ Adaptation nécessaire des méthodes d'extraction et de séparation
- ❖ Importance des paramètres d'extraction (pH, solvant, température...) sur l'état des protéines:
  - Solubilité
  - Fonctionnalité
- ❖ Applications des protéines purifiées à BIA:
  - Emulsification par 7S et 11S pois > pH acide (Gueguen)
  - Influence des traitements thermiques sur les propriétés rhéologiques des globulines de pois
  - Interaction napine /pectines (Schmidt)
  - Assemblages protéines animales/ végétales (Schwartz)
  - ...





**Merci de votre attention**

**Des questions?**