



HAL
open science

Stratégie de modélisation et d'optimisation des performances de l'ultrafiltration pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques

Alice Bodin

► **To cite this version:**

Alice Bodin. Stratégie de modélisation et d'optimisation des performances de l'ultrafiltration pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques. Autre. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0298 . tel-01752417

HAL Id: tel-01752417

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752417>

Submitted on 17 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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



Université de Lorraine (UL)

Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Laboratoire Réaction et Génie des Procédés (LRGP)

Thèse

présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 2016 pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

mention " Génie des Procédés et des Produits "

par Alice Bodin

STRATEGIE DE MODELISATION ET D'OPTIMISATION DES PERFORMANCES DE L'ULTRAFILTRATION POUR LE FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS PROTREIQUES

Membres du Jury

| | | |
|-----------------|--------------------------|--|
| Rapporteurs | Murielle Rabiller-Baudry | Professeur des universités, ISCR, Rennes |
| | Hélène Roux-de-Balmann | Directeur de recherche, LGC, Toulouse |
| Examineurs | Patrick Bourseau | Professeur des universités, GEPEA, Lorient |
| | Eric Favre | Professeur des universités, LRGP, Nancy |
| | Romain Kapel | Maître de conférences, LRGP, Nancy |
| | Ivan Marc | Directeur de recherche, LRGP, Nancy |
| Membres invités | Pascal Dhulster | Professeur des universités, ProBioGem, Lille |
| | Abderazak Latifi | Professeur des universités, LRGP, Nancy |

LRGP – UMR CNRS 7274

Plateforme SVS, 13 rue du Bois de la Champelle, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Murielle Rabiller-Baudry, Hélène Roux-de-Balman, Patrick Bourseau, Eric Favre et Pascal Dhulster d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'évaluer mes travaux. Je remercie également Isabelle Chevalot et Stéphane Delaunay de m'avoir accueillie au sein de l'équipe BioProMo du LRGP.

Puis, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnée pendant ces trois années de doctorat. Evidemment, je pense particulièrement à mes directeurs de thèse. Merci Ivan pour ton encadrement, tous tes conseils scientifiques et de « bonnes manières » rédactionnelles ! Je te souhaite de profiter de ta nouvelle vie loin du laboratoire, même si je suis sûre que ton stylo rouge va te manquer, comme ton exigence et ta bienveillance manqueront aux futurs doctorants. Merci Romain pour ta grande disponibilité, la confiance que tu m'as accordée et ton investissement dans mes travaux de thèse. Je suis très reconnaissante pour tout ce que tu as mis en œuvre pour que mon doctorat soit le plus enrichissant possible. Nos discussions scientifiques ou plus personnelles, et même les heures de corrections de publications vont beaucoup me manquer. Un remerciement particulier à Abderazak Latifi pour son aide précieuse dans la dernière partie de ces travaux. Merci pour le temps que vous m'avez accordé. Travailler avec vous m'a permis de prendre du recul sur mes travaux de thèse et d'aborder la phase de rédaction avec une vision différente sur mon sujet.

Je remercie aussi tous les permanents de BioProMo. Un merci tout particulier à Xavier, mon homme à tout faire de la plateforme SVS et son aide précieuse pour toute la partie analytique de mes travaux. Je remercie également Arnaud pour son aide au laboratoire. Je garderai un très bon souvenir de notre périple à Nice avec Romain ! J'ai une pensée aussi pour Mumu, qui nous a si souvent accueillis pour des soirées et des barbecues. Et puis, malgré tout, merci Manu pour avoir enchanté nos repas sur SVS par ta poésie et ton sens de la délicatesse !

Je remercie aussi Viviane ainsi que tous les collègues de l'IUT Nancy Brabois avec qui j'ai pu découvrir les joies de l'enseignement. Un merci particulier à Augustin, Caroline, Cécile, Dominique, Laurence, Lise et Nathalie qui m'ont formée et accompagnée au cours des séances de TD et TP.

Comme ces trois années n'auraient pas eu la même saveur sans mes camarades du laboratoire, voici quelques remerciements bien mérités. Tout d'abord, je remercie le binôme infernal, Nadine et Piepie, pour leur précieux accueil et aide au début du doctorat. Merci de m'avoir trainée à la piscine et sur les cours de tennis pour éliminer le surplus des soirées ! Je remercie Julien pour nous avoir fait rêver avec ses séances de giclage et pour avoir supporté mes taquineries pendant ces trois ans ! Merci à Aline et Léna pour nos séances d'abdos et de

bavardages à la salle de sport ! Merci à Odile et Mélody pour leur aide au laboratoire et leur culture au blind test de début d'après-midi. Je remercie Claire pour sa bonne humeur et son coaching pendant les longues heures de rédaction. Bien sûr, un immense merci à Sara pour m'avoir hébergée, pour ses bons petits plats et son soutien sans faille pendant les derniers mois ! Je remercie aussi tous les doctorants, post-docs et stagiaires qui ont rendu si agréable mon environnement de travail : Karim, Céline L., Mengyao, Jean-Luc, Marie-Laure, Céline M., Alex, Aurélie, Safwan, Adam, Yara, Sonia, Pierre, Lei et Teresa. Je remercie également mes acolytes de l'ENSIC Etienne, Xavier et David pour ces journées de formation doctorale passées ensemble !

J'ai également une pensée toute particulière pour la « team Bazinet » de l'Université Laval qui m'a permis de passer trois mois au Québec dépaysants, inoubliables et très enrichissants. Je remercie bien sûr Laurent Bazinet pour son accueil et sa disponibilité pendant ce projet de recherche. Je remercie également Jacinthe et Véronique pour leur aide au laboratoire. Un énorme merci à Rachel, Alice, Loic, Guillaume, Elodie, Serguey, Stéphanie, Mathilde et Baptiste pour m'avoir fait découvrir cette magnifique province canadienne!

Je veux également remercier ceux qui ont été présents pendant ces trois années mais également bien avant. Je pense à mes amis isérois, Lisa, Bastien, Jérémy, Mathieu, Yoann, Anthony, Margaux et Léa qui sont présents depuis toutes ces années. Je suis toujours aussi heureuse de vous retrouver dans notre fief entre nos aventures aux quatre coins du monde ! Je remercie aussi mes copines de l'ENSIC, Chloé, Estelle, Lucile, Marie et Marine, sans oublier leur + 1 ! Merci pour tous ces week-ends organisés de mains de maîtres et votre grand soutien.

Je terminerai par remercier toute ma famille. Je dédie cette thèse à mes parents, pour leur soutien inconditionnel et leur confiance pendant mes études, et à mes frères, qui ont toujours été un moteur pour me dépasser. Enfin, je remercie David pour avoir accepté la distance pendant ces trop nombreuses années, pour son écoute et tous ses conseils pendant cette thèse.

Abréviations

| | |
|-------------------------------|--|
| AA | Acide aminé |
| BCA | Bicinchoninic acid assay |
| CES | Chromatographie d'exclusion stérique |
| CLHP | Chromatographie liquide haute performance |
| CR | Cellulose régénérée |
| DF | Diafiltration à volume constant |
| DV | Nombre de diavolume(s) |
| FRV | Facteur de réduction volumique |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| k | Fonction d'utilité individuelle |
| J | Critère d'optimisation |
| MM | Masse molaire |
| \overline{MM}_{aa} | Masse molaire moyenne par acide aminé |
| NaOH | Hydroxyde de sodium (soude) |
| PA | Polyamide |
| PES | Polyéthersulfone |
| PSU | Polysulfone |
| PTM | Pression transmembranaire |
| PVDF | Polyfluorure de vinylidène |
| SEC | Size-exclusion chromatography |
| SM | Spectromètre de masse |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| u | Variable de décision |
| U | Fonction d'utilité multi-attribut |
| UF | Ultrafiltration en concentration discontinue |
| VRF | Volume reduction factor |
| $\overline{\varepsilon}_{aa}$ | Coefficient d'extinction molaire moyen par acide aminé |
| w | Poids associé à chaque fonction d'utilité |
| Φ | Contrainte |
| γ | Tolérance de la fonction d'utilité |

Nomenclature

| | |
|------------------|---|
| A_0 | Surface de membrane (m^2) |
| C | Concentration massique ($g.L^{-1}$) |
| ΣC | Concentration massique globale dans un compartiment ($g.L^{-1}$) |
| C_m | Concentration massique à la surface de la membrane ($g.L^{-1}$) |
| C_0 | Concentration massique initiale ($g.L^{-1}$) |
| C_p | Concentration massique instantané en sortie de membrane côté perméat ($g.L^{-1}$) |
| \overline{C}_p | Concentration massique dans le perméat ($g.L^{-1}$) |
| C_r | Concentration massique dans le rétentat ($g.L^{-1}$) |
| D | Coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$) |
| d_{feed} | Débit de recirculation de l'alimentation ($L.h^{-1}$) |

| | |
|-------------------|--|
| J_{eau} | Flux volumique d'eau pure ($\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| J_{p} | Flux volumique du perméat ($\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| P_{A} | Pression d'alimentation (bar) |
| P_{R} | Pression à la sortie de la sortie du rétentat (bar) |
| P_{p} | Pression à la sortie du perméat (bar) |
| p_i | Pureté d'un soluté i (-) |
| q | Débit de perméat ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$) |
| R_{reel} | Taux de rétention réel (-) |
| R | Taux de rétention observé (-) |
| Res_{m} | Résistance membranaire intrinsèque (m^{-1}) |
| Res_{pl} | Résistance de la couche de polarisation (m^{-1}) |
| TE | Temps d'éluion en chromatographie (min) |
| V | Volume (L) |
| V_{eau} | Volume d'eau de diafiltration ajouté (L) |
| V_0 | Volume initial (L) |
| V_{p} | Volume de perméat (L) |
| V_{r} | Volume de rétentat (L) |
| η_i | Rendement (yield) d'un soluté i (-) |
| τ_i | Enrichissement (enrichment) en un soluté i (-) |
| α | Rapport débit d'eau / débit de perméat (-) |
| ε | Coefficient d'extinction molaire ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) |
| δ | Épaisseur de la couche limite de polarisation (m) |
| μ | Viscosité dynamique (Pa.s) |

Abréviations des acides aminés

| | Code à 3 lettres | Code à 1 lettre |
|------------------|------------------|-----------------|
| Alanine | Ala | A |
| Arginine | Arg | R |
| Acide Aspartique | Asp | D |
| Acide Glutamique | Glu | E |
| Asparagine | Asn | N |
| Cystéine | Cys | C |
| Glutamine | Gln | Q |
| Glycine | Gly | G |
| Histidine | His | H |
| Isoleucine | Iso | I |
| Leucine | Leu | L |
| Lysine | Lys | K |
| Méthionine | Met | M |
| Phénylalanine | Phe | F |
| Proline | Pro | P |
| Sérine | Ser | S |
| Thréonine | Thr | T |
| Tryptophane | Trp | W |
| Tyrosine | Tyr | Y |
| Valine | Val | V |

Table des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1. Démarche globale de la thèse | 4 |
| Figure 2. Principe de la filtration membranaire tangentielle | 15 |
| Figure 3. Classifications des techniques de séparation baro-membranaires en fonction de la taille des pores de membranes et de la taille des molécules traitées (D'après Aimar <i>et al.</i> , 2010). | 15 |
| Figure 4. Schéma d'un système d'ultrafiltration tangentielle. | 17 |
| Figure 5. Phénomène de polarisation de concentration (D'après Aimar, 2010)..... | 20 |
| Figure 6. Phénomènes responsables du colmatage des membranes. | 20 |
| Figure 7. Détermination du point pivot du fractionnement d'un hydrolysate de protéines de poisson sur une membrane de 4 kDa (PES) (D'après Vandanjon <i>et al.</i> , 2009)..... | 29 |
| Figure 8. Comparaison de courbes d'étalonnage de membranes pour l'ultrafiltration d'un hydrolysate de poisson (D'après Chabeaud <i>et al.</i> , 2009b)..... | 30 |
| Figure 9. Pilote Cogent® µScale..... | 41 |
| Figure 10. Conditions opératoires de l'UF mises en jeu pour étudier leur influence sur l'étalonnage de la membrane. | 43 |
| Figure 11. Conditions opératoires de l'UF utilisées pour mesurer l'évolution du débit de perméat en concentration au cours du temps. | 43 |
| Figure 12. Méthode d'étalonnage de la membrane d'UF. | 45 |
| Figure 13. Méthode de prédiction du rendement dans le perméat et le rétentat. | 46 |
| Figure 14. Méthode de prédiction de l'enrichissement dans le perméat et le rétentat..... | 46 |
| Figure 15. Etalonnage de la colonne Superdex Peptide (élution isocratique à 0,5 mL.min ⁻¹ avec eau / acétonitrile 70 / 30 (v/v) avec 0,1 % (v/v) de TFA), avec 45 peptides de synthèse. | 50 |
| Figure 16. CLHP en phase inverse du Lactium® (colonne C18 Prospher, élution à 0,2 mL.min ⁻¹ avec gradients eau/acétonitrile (0,1 % TFA) et peptides ciblés a (MM = 780 g.mol ⁻¹), b (MM = 873 g.mol ⁻¹), c (MM = 1267 g.mol ⁻¹), d (MM = 1336 g.mol ⁻¹), e (MM = 1383 g.mol ⁻¹), f (MM = 1761 g.mol ⁻¹). | 52 |
| Figure 17. Diagram of the global methodology for the quantification of total peptide concentration of complex peptide mixtures. The methodology is only based on SE-HPLC and aminogram analysis of mixtures..... | 56 |
| Figure 18. Methodology of generation of peptide mixture chromatogram (A = f (V)) | 58 |
| Figure 19. Simulated elution of mixtures with 0 % (1, 2, 3), 2 % (4, 5, 6), 4 % (7, 8, 9) and 6 % (10, 11, 12) of aromatic amino acids and histidine. Real concentration (Dotted line), estimated concentration (solid line) and the relative error (dashed line) are represented. See Table 3 for composition of mixtures..... | 62 |
| Figure 20. Total peptide concentration measured by the SE-HPLC methodology versus the actual concentration of alfalfa white proteins hydrolysate (a) and Lactium® (b) in the valid concentration range of the methodology (from 0.2 to 4 g.L ⁻¹). Experiments were carried out in triplicate. Means, standard deviations and R ² are displayed..... | 64 |
| Figure 21. Size exclusion steric absorbance (multiplied by the dilution factor) of (a) alfalfa white proteins hydrolysate and (b) Lactium®. Initial hydrolysate chromatograms are represented by the thick solid line. Retentate fractions are presented by black dashed line and permeate fractions by grey dashed | |

line. Below, comparison between concentrations obtained by integration of SE-HPLC profiles and concentrations obtained by BCA analysis (c) or by Kjeldahl analysis (d) of fractions of alfalfa white proteins hydrolysate (round mark) and Lactium[®] (square mark)..... 65

- Figure 22.** (a) Comparison of total peptide concentration determinate by SE-HPLC methodology of alfalfa white proteins hydrolysate samples at 1.8 g.L^{-1} (in the linearity range of the methodology) prepared in different diluents (water, NaCl from 0.1 M to 2 M and acetonitrile from 10 % to 50 %). (b) Comparison of absorbance values obtained by BCA assay of alfalfa white proteins hydrolysate samples at 1 g.L^{-1} (in the linearity range of BCA assay) prepared in different diluents (same conditions than (a)). Experiments were carried out in triplicate. Means and standard deviations are displayed. 68
- Figure 23.** Schéma bilan de la méthodologie de quantification des hydrolysats 70
- Figure 24.** Démarche et problématiques de la partie résultats & discussions. 73
- Figure 25.** Problématiques du chapitre III. 75
- Figure 26.** Schema of ultrafiltration process. 79
- Figure 27.** A – SE-HPLC profile (Superdex peptide HR 10 / 300 – eluent: water / ACN / TFA: 70 / 30 / 0.1 v/v %) of Lactium[®] (blue solid line), retentate (black solid line) and permeate (dashed line) in total recirculation, 10 g.L^{-1} , 3 bar of PTM, 100 mL.min^{-1} of recirculation rate. B - Molar mass distribution of peptides. C –Calibration curve and real MWCO of the 3 kDa regenerated cellulose membrane determinate by the size-exclusion analysis of the permeate and retentate of Lactium[®]. Linear regression: $R = 0.72 \times \log(\text{MM}) - 1.51$ 83
- Figure 28.** Sieving curves of the 3 kDa regenerated cellulose membrane obtained in total recirculation mode with Lactium[®] as a function of (A) the recirculation rate of the retentate ($C_0 = 30 \text{ g.L}^{-1}$, TPM = 2 bar), (B) the initial retentate concentration (TPM = 2 bar, $v_{\text{feed}} = 75 \text{ mL.min}^{-1}$), (C) the transmembrane pressure ($C_0 = 30 \text{ g.L}^{-1}$, $v_{\text{feed}} = 100 \text{ mL.min}^{-1}$). Polarization layer resistance is displayed for each condition. 85
- Figure 29.** Molar mass distribution of permeate obtained with the 3 kDa regenerated cellulose membrane in total recirculation mode with Lactium[®] as a function of (A) the recirculation rate of the retentate ($C_0 = 30 \text{ g.L}^{-1}$, TPM = 2 bar), (B) the initial retentate concentration (TPM = 2 bar, $v_{\text{feed}} = 75 \text{ mL.min}^{-1}$), (C) the transmembrane pressure ($C_0 = 30 \text{ g.L}^{-1}$, $v_{\text{feed}} = 100 \text{ mL.min}^{-1}$). 86
- Figure 30.** Evolution of $C_p C_0$ during UF (A) and DF (B) (10 g.L^{-1} of Lactium[®], 3 bar of TMP, 100 mL.min^{-1} of recirculation rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane. Symbols represents experimental data. Dashed lines result from the regression of experimental values using mass balance equations in permeate. 87
- Figure 31.** $C_p C_0$ simulated using mass balance equations and R from initial calibration curve for each molar masses are represented as a function of experimental $C_p C_0$ in UF (A) and DF (B) (10 g.L^{-1} of Lactium[®], 3 bar of TMP, 100 mL/min of recirculating rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane. 88
- Figure 32.** Permeate flux (blue), polarization layer resistance (green) and total retentate concentration (red) during batch concentration (A) and diafiltration (B) of Lactium[®] (10 g.L^{-1} , 3 bar of TMP, 100 mL.min^{-1} of recirculating rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane. Experiments were performed after 20 minutes of total recirculation. 89
- Figure 33.** Yield and enrichment in permeate of molar masses monitored by SE-HPLC during UF and DF of Lactium[®] (10 g.L^{-1} , 3 bar of TMP, 100 mL.min^{-1} of recirculating rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane. 90

| | |
|--|-----|
| Figure 34. Yield and enrichment in retentate of molar masses monitored by SE-HPLC during UF and DF of Lactium [®] (10 g.L ⁻¹ , 3 bar of TMP, 100 mL.min ⁻¹ of recirculating rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane..... | 91 |
| Figure 35. Résumé de la stratégie de modélisation de l'ultrafiltration..... | 96 |
| Figure 36. Etapes de validation de la stratégie de prédiction des performances de l'ultrafiltration..... | 97 |
| Figure 37. Chromatogramme d'exclusion stérique (colonne Superdex peptide) du Lactium [®] et les masses molaires suivies..... | 98 |
| Figure 38. Comparaison des rendements expérimentaux (symboles) et prédits (tirets) dans le perméat (gauche) et le rétentat (droite) de sept masses molaires au cours de l'UF et de la DF du Lactium [®] sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée (C0 = 10 g.L ⁻¹ , PTM = 3 bar, débit de recirculation = 100 mL.min ⁻¹)..... | 99 |
| Figure 39. Chromatogramme d'exclusion stérique du rétentat (bleu) et du perméat (rouge) en concentration discontinue (A et B) et en diafiltration (C et D) du Lactium [®] . Comparaison des profils expérimentaux (ligne) et simulés (tiret). Conditions opératoires : C0 = 10 g.L ⁻¹ , PTM = 3 bar, débit de recirculation = 100 mL.min ⁻¹ | 101 |
| Figure 40. Concentration globale en peptides dans le rétentat (bleu) et le perméat (rouge) au cours de l'UF (A) et de la DF (B) du Lactium [®] sur une membrane de 3 kDa. Comparaison de la simulation (tiret) et des valeurs expérimentales (symboles)..... | 102 |
| Figure 41. Comparaison des enrichissements expérimentaux (points) et prédits (tirets) dans le perméat (gauche) et le rétentat (droite) de sept masses molaires au cours de l'UF et de la DF du Lactium [®] sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée (C0 = 10 g.L ⁻¹ , PTM = 3 bar, débit de recirculation = 100 mL.min ⁻¹)..... | 103 |
| Figure 42. Calibration of the 3 kDa regenerated cellulose membrane (red square), drawn with SEC of initial permeate and retentate UF fractions of Lactium [®] in total recirculating mode (C0 = 10 g.L ⁻¹ , TMP = 3 bar, feed flowrate = 100 mL.min ⁻¹). Linear regression: R = 0.72 x log (MM)-1.51. | 108 |
| Figure 43. Yields of targeted peptides in permeate and retentate during UF (C0 = 10 g.L ⁻¹ , TMP = 3 bar, feed flowrate = 100 mL.min ⁻¹). Left: evolution of yield for each targeted peptides (black points) and predicted yield (surface) as a function of VRF. Right: experimental values are represented as a function of predicted values. For each peptide, five points are represented, corresponding to five different VRF. Solid line, dashed lines and dotted lines represent a relative error of 0 %, 20 % and 30 %, respectively..... | 109 |
| Figure 44. Yields of targeted peptides in permeate and retentate during DF (C0 = 10 g.L ⁻¹ , TMP = 3 bar, feed flowrate = 100 mL.min ⁻¹). Left: evolution of experimental yield for each targeted peptides (black points) and predicted yield (surface) as a function of DV. Right: experimental values are represented as a function of predicted value. For each peptide, ten points are represented, corresponding to ten different DV. Solid line, dashed lines and dotted lines represent a relative error of 0 %, 20 % and 30 %, respectively..... | 110 |
| Figure 45. SEC chromatograms of retentate (blue line) and permeate (red line) fractions in batch concentration at 1.19 VRF (A) and 5 VRF (B) and in continuous diafiltration at 1 DV (C) and 10 DV (D). For diafiltration, permeate profiles were multiplied by the number of diavolume to undo the dilution and have comparable profiles with UF. Solid lines represent experimental profiles and dashed lines represent predicted profiles. | 111 |
| Figure 46. Total peptide concentration in retentate (blue) and permeate (red) during batch concentration (A) and continuous diafiltration (B) of Lactium [®] with 3 kDa membrane (real 2 kDa). Comparison of | |

| | |
|---|-----|
| prediction (dashed line) and experimental values determinate by experimental SEC profile integration (square)..... | 112 |
| Figure 47. Enrichment of targeted peptides in permeate and exhaustion in retentate during UF ($C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $\text{TMP} = 3 \text{ bar}$, feed flowrate = 100 mL.min^{-1}). Left: evolution of enrichment factors for each targeted peptides (black points) and predicted enrichment factor (surface) as a function of UF. Right: experimental values are represented as a function of predicted values. Solid line, dashed lines and dotted lines represent a relative error of 0 %, 20 % and 30 %, respectively. | 113 |
| Figure 48. Enrichment of targeted peptides in permeate and exhaustion in retentate during DF ($C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $\text{TMP} = 3 \text{ bar}$, feed flowrate = 100 mL.min^{-1}). Left: evolution of enrichment factors for each targeted peptides (black points) and predicted enrichment factor (surface) as a function of DV. Right: experimental values are represented as a function of predicted values. Solid line, dashed lines and dotted lines represent a relative error of 0 %, 20 % and 30 %, respectively. | 114 |
| Figure 49. Rendement (gauche) et enrichissement (droite) en peptides cibles du Lactium [®] dans le perméat au cours de l'UF sur la membrane en cellulose régénérée de 3 kDa ($\text{PTM} = 2 \text{ bar}$, $C_0 = 25 \text{ g.L}^{-1}$, débit de recirculation = 75 mL.min^{-1}). Les lignes pointillées représentent les résultats de simulation obtenus avec l'étalonnage de la membrane déterminé dans les conditions suivantes : $\text{PTM} = 3 \text{ bar}$, $C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, débit de recirculation = 100 mL.min^{-1} | 118 |
| Figure 50. Rendement (gauche) et enrichissement (droite) en peptides cibles du Lactium [®] dans le rétentat au cours de l'UF sur la membrane en cellulose régénérée de 3 kDa ($\text{PTM} = 2 \text{ bar}$, $C_0 = 25 \text{ g.L}^{-1}$, débit de recirculation = 75 mL.min^{-1}). Les lignes pointillées représentent les résultats de simulation obtenus avec l'étalonnage de la membrane déterminé dans les conditions suivantes : $\text{PTM} = 3 \text{ bar}$, $C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, débit de recirculation = 100 mL.min^{-1} | 118 |
| Figure 51. Démarche et objectif du chapitre V..... | 122 |
| Figure 52. Flux de perméat calculés par optimisation des paramètres du modèle de résistances en série, comparés aux flux de perméat expérimentaux. Ligne continue : bissectrice représentant l'égalité des flux. Lignes tiret : représentant un écart relatif de 10 %. | 125 |
| Figure 53. Validation croisée de la modélisation du flux de perméat. Symboles : évolution de la densité de flux de perméat au cours de la concentration dans différentes conditions opératoires (PTM , C_0 , d_{feed}). Lignes pointillées : modélisation..... | 126 |
| Figure 54. Comparaison des densités de flux expérimentales de perméat en diafiltration (symboles) aux densités de flux modélisées (tirets) dans quatre conditions opératoires différentes (PTM , C_0 , d_{feed}). | 127 |
| Figure 55. Relation entre l'enrichissement et le rendement de l' α -casozpéine pouvant être obtenu dans le perméat au cours de l'ultrafiltration du Lactium [®] sur une membrane en cellulose régénérée de 3 kDa. | 129 |
| Figure 56. Profil optimisé de α en fonction du temps pour minimiser le volume d'eau consommée et atteindre une pureté de 0,9 de la fraction retenue dans le rétentat. | 130 |
| Figure 57. Concentration totale en peptide dans le rétentat simulée pour le profil α présenté Figure 56. | 131 |
| Figure 58. Volume du rétentat simulé pour le profil α présenté Figure 56. | 131 |
| Figure 59. Evolution de la pureté en fraction totalement retenue dans le rétentat pour le profil α présenté Figure 56. | 131 |
| Figure 60. Volume d'eau consommée simulé pour le profil α présenté Figure 56. | 132 |

| | |
|---|-----|
| Figure 61. Profil optimisé de α en fonction du temps pour minimiser le volume d'eau consommée et atteindre un enrichissement de 2 en α -casozépine dans le perméat..... | 132 |
| Figure 62. Profil alpha (A) et concentration globale dans le rétentat (B) en fonction du temps obtenu pour la minimisation du volume d'eau en utilisant le modèle modifié du flux de perméat. | 135 |
| Figure 63. Profil alpha (A) et concentration totale dans le rétentat (B) en fonction du temps obtenu pour la minimisation de la durée finale en utilisant le modèle modifié du flux de perméat. | 135 |
| Figure 64. Cartographie des performances atteignables dans le perméat pour le fractionnement du Lactium® sur membrane de 3 kDa. | 136 |
| Figure 65. Cartographie des performances atteignables dans le rétentat pour le fractionnement du Lactium® sur membrane de 3 kDa. | 136 |
| Figure 66. Approximation du front de Pareto du problème d'optimisation de la pureté de la fraction retenue dans le rétentat et du temps final du procédé (cas 1). | 138 |
| Figure 67. Classement des meilleures solutions pureté de la fraction retenue/ durée finale selon la méthode MAUT (cas 1)..... | 139 |
| Figure 68. Profil de la variable alpha en fonction du temps pour la meilleure solution déterminée par la méthode de MAUT (cas 1)..... | 140 |
| Figure 69. Evolution du flux de perméat simulé (ligne) et expérimental (rond) au cours de l'ultrafiltration (FRV = 10 puis DV = 10) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée. | 141 |
| Figure 70. Evolution du volume de rétentat simulé (ligne) et expérimental (rond) au cours de l'ultrafiltration (FRV = 10 puis DV = 10) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée. | 141 |
| Figure 71. Evolution de la concentration globale en peptides dans le rétentat simulé (ligne) et expérimental (rond) au cours de l'ultrafiltration (FRV = 10 puis DV = 10) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée. | 142 |
| Figure 72. Evolution de la pureté de la fraction retenue simulé (ligne) et expérimental (rond) au cours de l'ultrafiltration (FRV = 10 puis DV = 10) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée. | 142 |
| Figure 73. Approximation du front de Pareto du problème d'optimisation de l'enrichissement de l' α -casozépine dans le perméat et du temps final du procédé (cas 2)..... | 143 |
| Figure 74. Classement des meilleures solutions enrichissement en α -casozépine dans le perméat / temps final selon la méthode MAUT (cas 2). | 144 |
| Figure 75. Evolution de la concentration globale en peptides dans le perméat simulé (ligne) et expérimental (rond). | 145 |
| Figure 76. Evolution de l'enrichissement en α -casozépine dans le perméat simulé (ligne) et expérimental (rond)..... | 145 |

Table des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1. Exemples d'étude portant sur le fractionnement d'hydrolysats par ultrafiltration pour l'amélioration des propriétés nutritionnelles, fonctionnelles ou bioactives. | 23 |
| Tableau 2. Formules du rendement et de l'enrichissement | 44 |
| Table 3. Characteristics of simulated peptide mixtures. Comparison between real total peptide concentration | 61 |
| Table 4. Comparison between actual concentrations and concentrations obtained by SE-HPLC methodology for alfalfa white proteins hydrolysate and Lactium® | 63 |
| Table 5. Comparison between concentrations obtained by SE-HPLC assays and BCA or Kjeldahl assays of 30 UF fractions. Relative errors are displayed. | 66 |
| Table 6. Calculation of relative peptide concentration from UF and DF mass balances (Muller <i>et al.</i> , 1999) | 81 |
| Table 7. MM and iH of targeted peptides and comparison between HPLC measured retention and retention predicted from membrane calibration | 84 |
| Table 8. Comparison of retention of different molar masses obtained from initial calibration curves obtained in total recirculation, from the fitting regression of UF data and from fitting regression of DF data..... | 87 |
| Table 9. Comparison of targeted peptides retentions measured by HPLC-MS in total recirculation and estimated from membrane calibration..... | 108 |
| Table 10. Experimental and predicted performances (yield and enrichment in permeate) during UF (VRF = 3) and DF (DV = 10) of opioid targeted peptides contained in bovine hemoglobin hydrolysates at different hydrolysis degree obtained with a 3 kDa regenerated cellulose membrane (C0 = 10 g.L ⁻¹ , TMP = 3 bar, feed flowrate = 100 mL.min ⁻¹). | 115 |
| Tableau 11. Comparaison de l'enrichissement expérimental et prédit en néo-kyotorphine dans le perméat au cours de l'UF sur une membrane de 1 kDa en cellulose régénérée (FRV = 5, C0 = 10 g.L ⁻¹ , PTM = 3 bar, débit de recirculation = 100 mL.min ⁻¹) de quatre hydrolysats d'hémoglobine bovine à différents degrés d'hydrolyse. | 117 |
| Tableau 12. Description de l'influence des conditions opératoires sur la résistance de la couche de polarisation en recirculation totale..... | 123 |
| Tableau 13. Contraintes et valeurs des paramètres a, b, c et d du modèle des résistances en série..... | 125 |
| Tableau 14. Paramètres et poids associés aux fonctions d'utilité individuelles (cas 1)..... | 139 |
| Tableau 15. Paramètres et poids associés aux fonctions d'utilité individuelles (cas 2)..... | 144 |

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| CHAPITRE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE | 5 |
| INTRODUCTION | 6 |
| I.1. LES HYDROLYSATS PROTÉIQUES | 6 |
| I.1.1. ORIGINE ET PRODUCTION DES HYDROLYSATS | 6 |
| I.1.2. PROPRIÉTÉS DES HYDROLYSATS | 7 |
| I.1.2.1. NUTRITION ET RÉDUCTION DE L'ALLERGICITÉ | 7 |
| I.1.2.2. PROPRIÉTÉS TECHNO-FONCTIONNELLES | 8 |
| I.1.2.3. BIOACTIVITÉS ET PROPRIÉTÉS NUTRACEUTIQUES | 9 |
| I.1.3. CARACTÉRISATION DES HYDROLYSATS | 11 |
| I.1.3.1. RÉPARTITION DE MASSES MOLAIRES | 11 |
| I.1.3.2. AMINOGRAMME | 12 |
| I.1.3.3. CONCENTRATIONS GLOBALES | 12 |
| I.1.3.4. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES PEPTIDES | 12 |
| I.2. FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS PROTÉIQUES | 13 |
| I.2.1. LES PROCÉDES BARO-MEMBRANAIRES | 14 |
| I.2.1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES PROCÉDES BARO-MEMBRANAIRES | 14 |
| I.2.1.2. MATÉRIAUX ET STRUCTURE DES MEMBRANES | 15 |
| I.2.1.3. LES DIFFÉRENTS MODULES | 16 |
| I.2.2. MISE EN ŒUVRE DE L'ULTRAFILTRATION TANGENTIELLE | 17 |
| I.2.2.1. MODES D'IMPLEMENTATION | 17 |
| I.2.2.2. GRANDEURS ET PARAMÈTRES CARACTÉRISTIQUES | 18 |
| I.2.2.3. FACTEURS INFLUENÇANT LA DENSITÉ DE FLUX DE PERMEATION | 19 |
| I.2.2.4. FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉTENTION DES SOLUTES | 21 |
| I.2.3. MODIFICATION DES PROPRIÉTÉS DES HYDROLYSATS PAR ULTRAFILTRATION | 23 |
| I.3. MODÉLISATION DU PROCÉDE D'ULTRAFILTRATION | 25 |
| I.3.1. ÉQUATIONS DE BILAN DU PROCÉDE | 25 |
| I.3.2. MODÉLISATION DU FLUX DE PERMEAT | 26 |
| I.3.2.1. LA THÉORIE DU FILM | 26 |
| I.3.2.2. LE MODÈLE DE RÉSISTANCES EN SÉRIE | 27 |
| I.3.2.3. LE MODÈLE DE LA PRESSION OSMOTIQUE | 27 |
| I.3.2.4. MODÈLE HYDRIDE | 27 |
| I.3.3. MODÉLISATION DE LA SÉLECTIVITÉ - ÉTALONNAGE DES MEMBRANES | 28 |
| I.4. L'OPTIMISATION DYNAMIQUE | 31 |
| I.4.1. FORMULATION DU PROBLÈME D'OPTIMISATION | 32 |
| I.4.2. OPTIMISATION SOUS CONTRAINTE | 32 |
| I.4.3. LA RÉOLUTION NUMÉRIQUE | 33 |
| I.4.3.1. LES MÉTHODES DÉTERMINISTES | 33 |
| I.4.3.2. CALCUL DU GRADIENT DU CRITÈRE ET DES CONTRAINTES | 34 |
| I.4.4. OPTIMISATION MULTICRITÈRE | 35 |
| I.4.4.1. APPROCHE PAR AGREGATION DES CRITÈRES | 36 |
| I.4.4.2. APPROCHE PAR ϵ -CONTRAINTES | 36 |
| I.4.5. OUTILS D'AIDE À LA DÉCISION | 36 |

CHAPITRE II - MATERIEL & METHODES 38

| | |
|--|-----------|
| II.1. LES HYDROLYSATS ETUDIES | 39 |
| II.1.1. LE LACTIUM® | 39 |
| II.1.2. HYDROLYSATS D'HEMOGLOBINE BOVINE | 39 |
| II.2. MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE DE L'ULTRAFILTRATION | 40 |
| II.2.1. LES MEMBRANES | 40 |
| II.2.2. LE PILOTE | 40 |
| II.2.3. FRACTIONNEMENT DU LACTIUM® SUR LA MEMBRANE EN CELLULOSE REGENEREES DE 3 KDA | 41 |
| II.2.3.1. COMPARAISON DE LA SELECTIVITE ET DES PERFORMANCES EN UF ET DF | 41 |
| II.2.3.2. DETERMINATION DE LA RESISTANCE MEMBRANAIRE INTRINSEQUE (RES_M) | 42 |
| II.2.3.3. DETERMINATION EXPERIMENTALE DE LA RESISTANCE LIEE A LA POLARISATION DE CONCENTRATION (RES_{pl}) | 42 |
| II.2.3.4. ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES SUR LA SELECTIVITE DE LA MEMBRANE ET LE DEBIT DE PERMEAT EN RECIRCULATION TOTAL | 43 |
| II.2.4. FRACTIONNEMENT D' HYDROLYSATS D'HEMOGLOBINE BOVINE | 43 |
| II.3. STRATEGIE DE MODELISATION DES PERFORMANCES DE L'ULTRAFILTRATION : | |
| RENDEMENT ET ENRICHISSEMENT D'UN PEPTIDE | 44 |
| II.3.1. SIMULATION DU RENDEMENT ET DE L'ENRICHISSEMENT | 44 |
| II.3.2. ETALONNAGE DES MEMBRANES D'ULTRAFILTRATION ET PREDICTION DE R_i | 44 |
| II.3.3. PREDICTION DU RENDEMENT | 45 |
| II.3.4. PREDICTION DE L'ENRICHISSEMENT | 46 |
| II.4. MODELISATION DU DEBIT DE PERMEAT | 47 |
| II.5. OPTIMISATION DYNAMIQUE MULTICRITERE DE L'ULTRAFILTRATION | 47 |
| II.5.1. DEFINITION DU PROBLEME D'OPTIMISATION | 48 |
| II.5.2. METHODE DE RESOLUTION NUMERIQUE ET D'OPTIMISATION | 49 |
| II.5.3. OUTILS D'AIDE A LA DECISION | 49 |
| II.6. LES METHODES ANALYTIQUES | 50 |
| II.6.1. DETERMINATION DE LA REPARTITION DE MASSES MOLAIRES DES HYDROLYSATS ET DES FRACTIONS PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (CES) | 50 |
| II.6.2. DETERMINATION DE $C_{p,i}/C_{0,i}$ ET $Cr,i/C_{0,i}$ D'UNE CLASSE DE MASSE MOLAIRES I PAR CES | 50 |
| II.6.3. DETERMINATION DE $C_{p,i}/C_{0,i}$ ET $Cr,i/C_{0,i}$ D'UN PEPTIDE CIBLE I PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE INVERSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CLHP-PI-SM) | 51 |
| II.6.4. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION GLOBALE EN PEPTIDES DES HYDROLYSATS ET DES FRACTIONS | 52 |
| II.6.4.1. ARTICLE PUBLIE DANS JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B | 52 |
| II.6.4.2. CONTRIBUTION DE L'ARTICLE | 69 |

| | |
|---|-----------|
| RESULTATS & DISCUSSION | 71 |
| INTRODUCTION | 72 |
| CHAPITRE III - ETUDE DE LA SELECTIVITE ET DES PERFORMANCES DE L'ULTRAFILTRATION EN UF ET EN DF | 74 |
| INTRODUCTION | 75 |
| MANUSCRIPT: FRACTIONATION OF A CASEIN HYDROLYSATE BY TANGENTIAL FILTRATION USING A 3 KDA REGENERATED CELLULOSE MEMBRANE. PART I: MEMBRANE SELECTIVITY, UF AND DF MODE PERFORMANCES | 76 |
| III.1. INTRODUCTION | 76 |
| III.2. MATERIALS AND METHODS | 78 |
| III.2.1. MATERIAL | 78 |
| III.2.2. ULTRAFILTRATION EXPERIMENTS | 78 |
| III.2.2.1. PILOT AND MEMBRANE DESCRIPTION | 78 |
| III.2.2.2. INFLUENCE OF OPERATING CONDITIONS ON MEMBRANE SELECTIVITY | 79 |
| III.2.2.3. IMPLEMENTATION IN BATCH CONCENTRATION AND DIAFILTRATION MODES | 79 |
| III.2.3. MEMBRANE CALIBRATION CURVES (PEPTIDE MOLAR MASS VS RETENTIONS) | 80 |
| III.2.4. PEPTIDE MIXTURE MOLAR MASS DISTRIBUTION | 80 |
| III.2.5. ACTUAL PEPTIDE RETENTION ASSESSMENT | 80 |
| III.2.6. ACTUAL PEPTIDES HYDROPHOBICITY ASSESSMENT | 81 |
| III.2.7. UF AND DF PERFORMANCES CALCULATION | 81 |
| III.2.8. POLARIZATION LAYER RESISTANCE CALCULATIONS | 82 |
| III.3. RESULTS AND DISCUSSION | 82 |
| III.3.1. INFLUENCE OF OPERATING CONDITIONS ON MEMBRANE SELECTIVITY AND PEPTIDE TRANSPORT | 82 |
| III.3.2. PEPTIDE TRANSPORT DURING UF AND DF | 87 |
| III.3.3. PERFORMANCES OF UF AND DF FRACTIONATION AS A FUNCTION OF PEPTIDE MOLAR MASSES | 90 |
| CONCLUSION DU CHAPITRE III (APPORT PRE-PUBLICATION) | 92 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE IV - MODELISATION DES PERFORMANCES DE L'ULTRAFILTRATION POUR LE FRACTIONNEMENT D'HYDROLYSATS PROTEIQUES | 94 |
| INTRODUCTION | 95 |
| IV.1. VALIDATION DE LA METHODOLOGIE SUR DES CLASSES DE MASSES MOLAIRES SUIVIES EN CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE | 98 |
| IV.1.1.ÉTALONNAGE DE LA MEMBRANE | 98 |
| IV.1.2.PRÉDICTION DES RENDEMENTS | 98 |
| IV.1.3.PREDICTION DES ENRICHISSEMENTS | 100 |
| IV.1.3.1.PREDICTION DES PROFILS DE MASSES MOLAIRES | 100 |
| IV.1.3.2.PREDICTION DES CONCENTRATIONS GLOBALES DES FRACTIONS | 101 |
| IV.1.3.3.PREDICTION DES ENRICHISSEMENTS DE MASSES MOLAIRES CIBLEES | 102 |
| IV.1.4.CONCLUSION | 102 |
| IV.2. VALIDATION DE LA METHODOLOGIE SUR DES PEPTIDES CIBLES SUIVIS PAR CLHP-SM | 103 |
| MANUSCRIPT: FRACTIONATION OF A CASEIN HYDROLYSATE BY TANGENTIAL FILTRATION USING A 3 KDA REGENERATED CELLULOSE MEMBRANE. PART II: YIELD AND ENRICHMENT PREDICTION OF TARGETED PEPTIDES IN UF AND DF | 104 |
| IV.2.1.INTRODUCTION | 104 |
| IV.2.2.METHODOLOGY OF UF PREDICTION PERFORMANCES | 105 |
| IV.2.3.MATERIAL AND METHODS | 105 |
| IV.2.3.1.MATERIAL | 105 |
| IV.2.3.2.ULTRAFILTRATION EXPERIMENTS | 106 |
| IV.2.3.3.EXPERIMENTAL DETERMINATION OF YIELD AND ENRICHMENT FACTOR OF TARGETED PEPTIDES | 107 |
| IV.2.4.RESULTS AND DISCUSSION | 107 |
| IV.2.4.1.MEMBRANE CALIBRATION | 107 |
| IV.2.4.2.PREDICTION OF TARGETED PEPTIDE YIELDS | 108 |
| IV.2.4.3.PREDICTION OF TOTAL PEPTIDE CONCENTRATION | 111 |
| IV.2.4.4.PREDICTION OF TARGETED PEPTIDE ENRICHMENT FACTOR | 113 |
| IV.2.4.5.APPLICATION OF THE METHODOLOGY - COMPARISON OF BIOACTIVE PEPTIDE YIELD AND ENRICHMENT IN UF OR DF | 115 |
| IV.2.5.CONCLUSION - CONTRIBUTION DE LA PRE-PUBLICATION | 116 |
| IV.2.6.COMPLEMENT 1 A L'ARTICLE : AUTRE EXEMPLE D'APPLICATION DE LA METHODOLOGIE | 116 |
| IV.2.7.COMPLEMENT 2 A L'ARTICLE : INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES SUR LA STRATEGIE DE PREDICTION DES PERFORMANCES | 117 |
| CONCLUSION DU CHAPITRE IV | 118 |

| | |
|---|------------|
| <u>CHAPITRE V - OPTIMISATION DYNAMIQUE MULTICRITERE DE L'ULTRAFILTRATION</u> | 120 |
| INTRODUCTION | 121 |
| V.1. MODELISATION DU FLUX DE PERMEAT AU COURS DE L'ULTRAFILTRATION | 123 |
| V.1.1.ÉVOLUTION EXPERIMENTALE DU DEBIT DE PERMEAT | 123 |
| V.1.1.1.INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES EN RECIRCULATION TOTALE | 123 |
| V.1.1.2.EVOLUTION AU COURS DE L'ULTRAFILTRATION | 123 |
| V.1.2.MODELISATION PAR UN MODELE DE RESISTANCES EN SERIE | 124 |
| V.1.2.1.EN CONCENTRATION DISCONTINUE | 124 |
| V.1.2.2.EN DIAFILTRATION A VOLUME CONSTANT | 127 |
| V.1.3.CONCLUSION | 128 |
| V.2. MISE EN ŒUVRE DE L'OPTIMISATION DYNAMIQUE | 128 |
| V.2.1.ANALYSE DES CRITERES ET OPTIMISATION DYNAMIQUE MONOCRITERE | 128 |
| V.2.1.1.INTERDEPENDANCE DU RENDEMENT ET DE L'ENRICHISSEMENT | 128 |
| V.2.1.2.OPTIMISATION MONOCRITERE DU VOLUME D'EAU CONSOMMEE (V_{EAU}) | 129 |
| V.2.1.3.OPTIMISATION MONOCRITERE DE LA DUREE FINALE (T_f) | 133 |
| V.2.1.4.DISCUSSION SUR LES PROFILS OPTIMAUX DE A | 133 |
| V.2.1.5.CARTOGRAPHIES DES PERFORMANCES | 135 |
| V.2.2.OPTIMISATION DYNAMIQUE MULTICRITERE | 137 |
| V.2.2.1.CAS 1 : FRACTION RETENUE DANS LE RETENTAT ($R=1$) | 137 |
| V.2.2.2. CAS 2 : ENRICHISSEMENT DE L'A-CAZOSEPINE DANS LE PERMEAT | 142 |
| CONCLUSION DU CHAPITRE V | 146 |
| | |
| <u>CONCLUSION GENERALE & PERSEPCTIVES</u> | 147 |
| | |
| <u>REFERENCES</u> | 152 |

INTRODUCTION GENERALE

La production des hydrolysats protéiques s'inscrit dans un contexte de valorisation des ressources et des coproduits industriels riches en protéines. Les laiteries, les huileries, les abattoirs, l'exploitation des produits de la mer sont autant de sources de protéines à exploiter. La production des hydrolysats est envisagée lorsque les protéines disponibles ne sont pas utilisables pour l'alimentation humaine.

Les hydrolysats issus de la protéolyse enzymatique de protéines végétales ou animales sont des mélanges complexes contenant des peptides aux compositions en acides aminés et aux propriétés physico-chimiques variées. Les hydrolysats peuvent présenter des qualités nutritionnelles supérieures aux protéines natives, des propriétés fonctionnelles dites texturantes, ou une bioactivité particulière. L'intérêt pour les hydrolysats est alors grandissant dans divers secteurs, comme l'industrie agroalimentaire, des nutraceutiques, ou encore l'industrie des adhésifs.

En amont, la compréhension de l'hydrolyse enzymatique en tant que réaction pour produire des hydrolysats de qualité aux propriétés ciblées ainsi que l'intensification du procédé sont des enjeux scientifiques majeurs pour l'industrialisation du procédé. En aval, la mise en œuvre de procédés de fractionnement fait également l'objet de nombreuses études. Les procédés de fractionnement ont pour but d'enrichir une fraction en un, ou plusieurs, peptide cible, pour révéler ou augmenter sa bioactivité, voire d'en isoler une famille de peptides du mélange présentant une propriété nutritive ou fonctionnelle particulière. Dans certains cas, il est possible d'obtenir différentes fractions avec différentes propriétés supérieures à celles de l'hydrolysats initial. Le fractionnement des hydrolysats permet alors une valorisation maximale et adaptée des mélanges.

Les procédés membranaires, et notamment l'ultrafiltration, sont largement envisagés pour le fractionnement des hydrolysats. Ces procédés sont faciles à mettre en œuvre et à extrapoler ; ils présentent une productivité élevée et ne nécessitent pas l'utilisation de solvant. Ces caractéristiques permettent un coût de procédé relativement faible et cohérent avec les secteurs industriels visés pour l'utilisation des hydrolysats. Cependant, la mise en œuvre de l'ultrafiltration reste empirique, parce qu'aucun modèle de prédiction des performances de séparation (rendement et enrichissement) et de productivité n'a été établi pour le fractionnement des hydrolysats protéiques. Ce manque d'outils de modélisation est lié à la complexité des mélanges et à la difficulté de compréhension des mécanismes de transfert en fonction des conditions opératoires et des propriétés des peptides. Pourtant la modélisation et l'optimisation de procédés de fractionnement sont des outils essentiels pour permettre un choix rationnel de technologies et de mise en œuvre.

L'objectif de ces travaux de thèse est de proposer une stratégie globale de modélisation et d'optimisation des performances de l'ultrafiltration pour le fractionnement rationnel d'hydrolysats protéiques. Pour faciliter la lecture de ce manuscrit, toute la méthodologie est validée sur un hydrolysats, le Lactium®, fractionné sur une membrane en cellulose régénérée de 3 kDa.

Le développement, la mise en place et la validation expérimentale de la stratégie proposée reposent sur quatre étapes qui sont :

1) *validation d'une méthode de quantification des hydrolysats par une analyse en chromatographie d'exclusion stérique (CES)*

La concentration globale des hydrolysats et des fractions d'ultrafiltration est une donnée essentielle pour suivre le fractionnement. La méthode proposée a pour but de se substituer aux méthodes de dosage de référence chronophages (Kjeldahl, dosage colorimétrique) tout en s'appuyant sur deux caractéristiques classiques des hydrolysats : leur distribution de masse molaire et leur aminogramme. De plus, cette méthode de quantification est utilisée dans la stratégie globale de prédiction du rendement et de l'enrichissement au cours de l'ultrafiltration ; sa validation représente une étape clé dans la démarche de ces travaux de thèse et a fait l'objet d'une publication dans Journal of Chromatography B.

2) *caractérisation des performances de la membrane sélectionnée : sélectivité, flux de perméation, performances en concentration discontinue (UF) et en diafiltration à volume constant (DF)*

La rétention des peptides de l'hydrolysats traité est un paramètre essentiel pour la caractérisation de la sélectivité d'une membrane. La qualité de la modélisation des performances des procédés membranaires réside principalement dans la bonne prédiction des taux de rétention. De même, la compréhension des mécanismes régissant les flux de perméation est nécessaire à leur modélisation. Le premier objectif de cette étude expérimentale sera donc d'étudier la rétention et les flux de perméation au cours de l'ultrafiltration du Lactium® en fonction des conditions opératoires et de l'avancement du système.

Les études de la littérature sur le fractionnement des hydrolysats protéiques mettent en jeu l'ultrafiltration, principalement en concentration discontinue. Peu d'auteurs ont utilisé la diafiltration ou ont comparé les deux modes d'implémentation sur les critères de performances de séparation. Le second objectif de l'étude expérimentale sera de mettre en évidence les performances des deux modes d'implémentation en termes de rendement et d'enrichissement d'une masse molaire cible.

Enfin, l'ensemble des résultats expérimentaux sur la sélectivité servira de base pour justifier les hypothèses faites dans les parties suivantes.

3) *validation d'une méthodologie de prédiction des performances de l'ultrafiltration en termes de rendement et d'enrichissement*

Une méthodologie de prédiction du rendement et de l'enrichissement en peptide cible dans le perméat a été développée au LRGP. Cette méthodologie permet de prédire l'évolution des répartitions de masses molaires dans les compartiments de l'ultrafiltration ainsi que le rendement et l'enrichissement d'un peptide cible. Elle a été validée sur un petit peptide anti-hypertenseur contenu dans un hydrolysate de protéines blanches de Luzerne et enrichi dans le perméat au cours d'une concentration sur une membrane de 1 kDa (Kapel *et al.*, 2011). L'objectif de cette partie sera d'étendre la validation de la méthodologie en étudiant sa précision pour prédire les performances de séparation dans le perméat et le rétentat, en UF et en DF. Pour cela, plusieurs classes de masses molaires et plusieurs peptides du Lactium® seront suivis au cours du fractionnement en UF et en DF sur la membrane de 3 kDa sélectionnée. La méthodologie sera également validée pour le fractionnement sur des membranes de 1 kDa et 3 kDa d'hydrolysats d'hémoglobine bovine contenant des peptides bioactifs.

4) *mise en œuvre de l'optimisation dynamique de l'ultrafiltration*

L'optimisation dynamique de l'ultrafiltration doit permettre de déterminer la meilleure combinaison des étapes de concentration et / ou de diafiltration pour obtenir une performance de fractionnement ciblée. Dans le cas de l'ultrafiltration, la durée du procédé liée au débit de perméat ainsi que le coût de diluant de diafiltration sont deux critères économiques classiquement optimisés (Fikar *et al.*, 2010). L'objectif de cette dernière partie sera de réaliser l'optimisation du procédé d'ultrafiltration pour le fractionnement du Lactium®.

Dans un premier temps, un modèle de résistances en série sera établi pour prédire le flux de perméat en UF et en DF. Ce modèle, associé à la stratégie validée dans la partie précédente permet de simuler les performances du procédé en fonction du temps et de mettre en œuvre l'optimisation dynamique. Des critères de performances de séparation (rendement et enrichissement) et des critères économiques (durée et volume d'eau consommée) seront pris en compte. Pour illustrer la démarche d'optimisation dynamique multicritère, deux cas seront étudiés : l'optimisation de la pureté de la famille de masses molaires retenues dans le rétentat et l'optimisation de l'enrichissement d'un peptide cible bioactif dans le perméat.

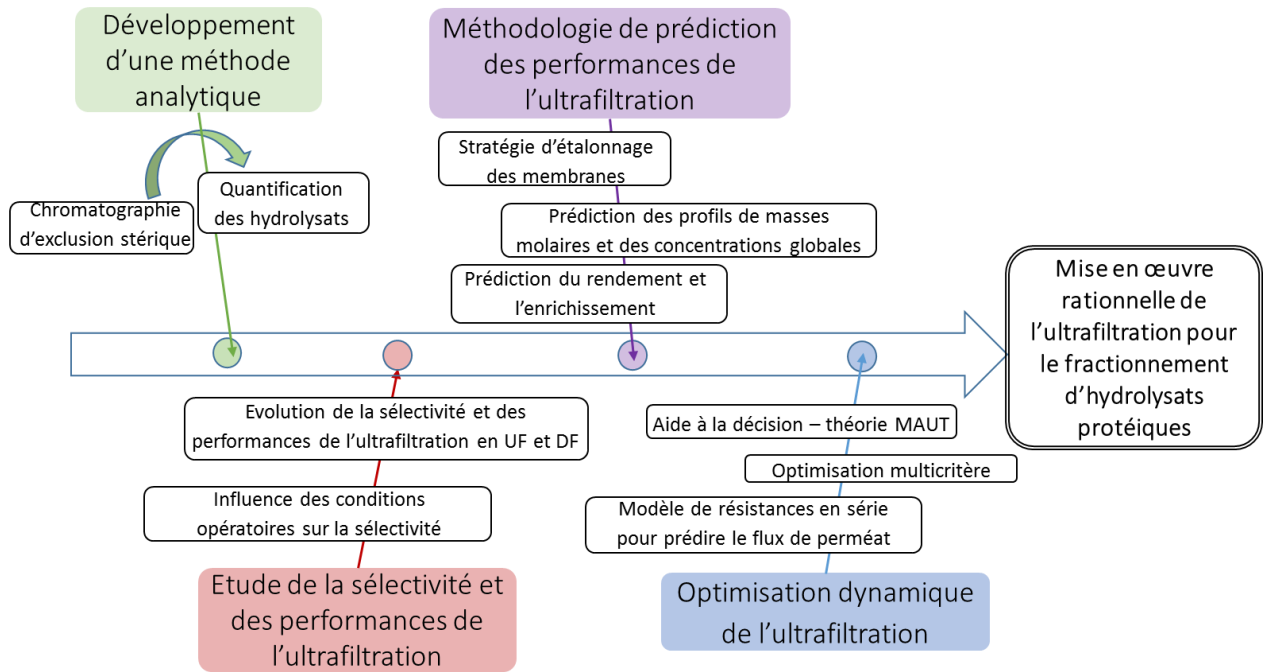


Figure 1. Démarche globale de la thèse

CHAPITRE I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Cette synthèse bibliographique est divisée en quatre parties. Tout d'abord, une introduction sur la production et l'analyse des hydrolysats ainsi qu'une revue des différentes propriétés de ces mélanges sont présentées afin de souligner l'intérêt des hydrolysats dans différents domaines industriels. Le procédé d'ultrafiltration et son utilisation pour fractionner et améliorer les propriétés des mélanges peptidiques sont ensuite détaillés. Pour introduire la stratégie de modélisation des performances de l'UF décrite dans ces travaux de thèse, les modèles théoriques et phénoménologiques utilisés pour décrire la sélectivité des membranes vis-à-vis de solutés ainsi que le transfert du liquide au cours du procédé sont synthétisés. Pour conclure, le principe de l'optimisation multi-objectif et des outils d'aide à la décision sont présentés.

I.1. Les hydrolysats protéiques

I.1.1. Origine et production des hydrolysats

L'intérêt pour les hydrolysats s'inscrit dans un contexte de valorisation des ressources et des coproduits industriels. Ainsi, les protéines à l'origine des hydrolysats proviennent de sources variées. Les protéines d'origine animale sont les plus disponibles en termes de quantité et de pureté, notamment celles d'origine laitière (Silva et Malcata, 2005 ; Wang *et al.*, 2013). Si la valeur nutritionnelle et le faible coût des caséines en font une source attractive, d'autres protéines animales issues de l'industrie agro-alimentaire sont étudiées pour la production d'hydrolysats. On peut notamment citer les protéines du cruor issu des abattoirs et les résidus de poissons (Amado *et al.*, 2013 ; Hedhili *et al.*, 2015 ; Kristinsson et Rasco, 2000 ; Ngo *et al.*, 2012 ; Przybylski *et al.*, 2016). Plus récemment, l'étude des protéines végétales comme substrat d'hydrolyse a connu un essor important. Les protéagineux, comme le colza ou le tournesol (Alashi *et al.*, 2013 ; Nioi, 2013), et les légumineuses, comme les pois, le soja ou la cacahuète (de Castro et Sato, 2014 ; López-Barrios *et al.*, 2014 ; White *et al.*, 2014) sont les principales sources végétales étudiées. Les protéines disponibles sont souvent sous forme de tourteaux issus de la production d'huile végétale ou de biocarburant. L'alimentation animale est la voie de valorisation majoritaire de ces coproduits industriels. La production d'hydrolysats permet d'envisager une valorisation dans des secteurs à plus haute valeur ajoutée.

Le procédé le plus utilisé pour la production d'hydrolysats est l'hydrolyse enzymatique, réalisée par l'action d'enzymes particulières, plus ou moins spécifiques, appelées protéases. Ce sont des catalyseurs biologiques qui permettent une réaction dans des conditions douces de pH (2 à 10) et de température (20 à 60 °C), contrairement aux hydrolyses chimiques (HCl ou NaOH 5 à 10 M, à 100 °C). L'autre avantage de l'hydrolyse biocatalysée est la bonne reproductibilité de

la composition en peptides générés due à la spécificité de coupure des protéases, ce qui n'est pas le cas de l'hydrolyse chimique (Clemente, 2000). L'étude de la sélectivité des protéases et des conditions d'hydrolyse pour la production d'hydrolysats avec des propriétés fonctionnelles ou bioactives d'intérêt fait l'objet de nombreuses études (Amza *et al.*, 2013 ; Nioi, 2013). La qualité des hydrolysats obtenus dépend de leur composition en acides aminés et de leur distribution de masses molaires (Johns *et al.*, 2011 ; Neklyudov *et al.*, 2000). Le premier critère est directement lié au profil en acides aminés et notamment au ratio d'acides aminés essentiels présents dans la protéine initiale. La distribution de masses molaires, elle, peut être contrôlée par le choix de l'enzyme, les conditions opératoires et le degré d'hydrolyse final (de Castro et Sato, 2014 ; He *et al.*, 2013).

L'intérêt grandissant pour les hydrolysats a également conduit à étudier des voies d'intensification du procédé d'hydrolyse. Industriellement, l'hydrolyse est réalisée en réacteur fermé de manière discontinue. Si cette mise en œuvre est simple, elle présente une faible productivité et conduit à une consommation importante de l'enzyme qui doit être inactivée en fin de réaction (Perea et Ugalde, 1996). Pour remédier à ces inconvénients, une mise en œuvre en continu a été appliquée à l'échelle du laboratoire en couplant le réacteur enzymatique à une unité de filtration (Kapel *et al.*, 2006a). Ces réacteurs à membrane permettent de retenir l'enzyme tout en éliminant au fur et à mesure les peptides produits, ce qui évite les problèmes d'inhibition par les produits. Une même quantité d'enzyme est utilisée pour traiter des volumes de substrat beaucoup plus importants qu'en réacteur « batch ». Cependant, les problèmes liés au colmatage des membranes et à la perte d'activité de l'enzyme limitent l'utilisation de ce système à l'échelle industrielle.

I.1.2. Propriétés des hydrolysats

L'étude du procédé d'hydrolyse est très souvent associée à la caractérisation des mélanges obtenus. L'intérêt des hydrolysats réside dans leur propriétés nutritives, techno-fonctionnelles et / ou bioactives.

I.1.2.1. Nutrition et réduction de l'allergénicité

L'apport en acides aminés dans la nutrition humaine est indispensable pour le bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, la quantité ou les performances nutritionnelles (digestibilité, amino-gramme) de protéines apportées par l'alimentation sont parfois insuffisantes. Grâce à la diminution de la taille des chaînes d'acides aminés, la digestibilité des hydrolysats est meilleure que celle de la protéine initiale. Sinha *et al* (2007) ont mis en évidence une digestibilité *in vitro* d'un hydrolysats de protéines de lactosérum trois fois supérieure à celle

des protéines natives. Généralement, les propriétés nutritives des mélanges augmentent avec le degré d'hydrolyse, qui, par conséquent, constitue un facteur clé dans le contrôle de la réaction enzymatique (Amza *et al.*, 2013). La répartition de masses molaires, ainsi que la haute teneur en acides aminés essentiels d'hydrolysats spécifiques, permettent de les utiliser comme compléments protéiques dans divers aliments fonctionnels et notamment dans les boissons protéiques utilisées par les sportifs (Manninen, 2009 ; Vioque *et al.*, 1999).

Les bonnes propriétés nutritionnelles des hydrolysats sont intéressantes pour la formulation de produits spécifiques destinés aux personnes souffrant de problèmes métaboliques et de troubles chroniques du foie, diminuant les capacités de digestion (Clemente, 2000 ; Vioque *et al.*, 1999) .

Les protéines peuvent, par contre, présenter une allergénicité importante, comme notamment les protéines de lait chez les nourrissons et les enfants. L'hydrolyse de ces protéines, associée à un traitement thermique permet d'en réduire l'allergénicité (Clemente, 2000). Les hydrolysats de caséines sont fréquemment utilisés pour la formulation d'aliments fonctionnels destinés à la nutrition infantile.

I.1.2.2. Propriétés techno-fonctionnelles

Les hydrolysats sont connus pour présenter des propriétés fonctionnelles supérieures aux protéines d'origine (Neklyudov *et al.*, 2000 ; Popineau *et al.*, 2002 ; Prévot-D'Alvise *et al.*, 2003). Ces propriétés sont régies par les caractéristiques physico-chimiques telles que la taille, la conformation, la charge, ou encore le caractère hydrophobe des peptides.

L'augmentation de la solubilité de protéines de colza (Vioque *et al.*, 1999) ou de luzerne (Prévot-D'Alvise *et al.*, 2003) par hydrolyse a été démontrée. L'amélioration de la solubilité des hydrolysats par rapport à la protéine initiale est notamment liée à la diminution de la taille des chaînes peptidique, l'altération ou la disparition de structure tertiaire (Chobert *et al.*, 1996). L'augmentation de solubilité est une caractéristique fondamentale pour la formation d'agents texturants, comme les mousses et les émulsions (Lacou *et al.*, 2016). De nombreux travaux ont également montré l'importance de la distribution de masses molaires sur les propriétés moussantes et émulsifiantes. Il est généralement admis qu'un faible degré d'hydrolyse, libérant des peptides de tailles élevées, augmente ces fonctionnalités par rapport à la protéine native, grâce à la diminution de la tension interfaciale. À l'inverse, un degré d'hydrolyse trop important diminue la stabilité des mousses et des émulsions (Amza *et al.*, 2013). Van der Ven et ses collaborateurs (2002) ont notamment déterminé la fraction de masses molaires optimales (> 7 kDa) pour de bonnes capacités moussantes avec une stabilité supérieure à la caséine native. De plus, le caractère amphiphile ou hydrophobe des peptides libérés joue un rôle prédominant dans la stabilisation des émulsions (Lacou *et al.*, 2016 ; van der Ven *et al.*, 2002). Si la distribution de

masses molaires peut être contrôlée par le choix de l'enzyme et le degré d'hydrolyse, les caractéristiques physico-chimiques comme le degré d'hydrophobie des peptides libérés ne sont pas maîtrisés et dépendent fortement de la protéine initiale.

Ces propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont des caractéristiques intéressantes pour la valorisation de ces mélanges comme ingrédients texturants pour la formulation de produits alimentaires (Joye et McClements, 2014). Cependant, la complexité des mélanges rend parfois difficile la compréhension des mécanismes d'action dans les matrices alimentaires (Lacou *et al.*, 2016).

Une autre propriété techno-fonctionnelle, moins étudiée, est la capacité adhésive des hydrolysats pouvant être utilisée pour diminuer la teneur en résines à base de pétrole (résines urée-formaldéhyde et résines à base d'isocyanate) utilisées dans le domaine des colles à bois (Yang *et al.*, 2006). Les protéines natives présentent de bonnes propriétés adhésives mais sont souvent peu solubles. L'hydrolyse des protéines permet d'augmenter leur solubilité et permet de les mélanger aux résines classiques. Plusieurs études ont démontré les performances de résines adhésives contenant des hydrolysats de protéines de blé, de soja ou de farine de sang, notamment pour des applications intérieures et en conditions sèches (Mekonnen *et al.*, 2014 ; Schmitz Jr, 2006 ; Yang *et al.*, 2006).

I.1.2.3. Bioactivités et propriétés nutraceutiques

Un peptide bioactif est une séquence d'acides aminés inactive lorsqu'elle est présente dans la structure globale de la protéine native et qui peut exprimer sa bioactivité lorsqu'elle est libérée intacte au cours de l'hydrolyse. Les hydrolysats peuvent contenir des centaines de peptides dont certains peuvent présenter des activités biologiques particulières. Le caractère bioactif d'un peptide réside dans sa capacité à améliorer le bien-être ou la santé humaine (Korhonen et Pihlanto, 2006 ; Ngo *et al.*, 2012). De nombreuses revues de la littérature présentent les bioactivités très variées qui ont été mises en évidence dans des hydrolysats issus de protéines animales (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014 ; Kitts et Weiler, 2003 ; Korhonen, 2009) ou végétales (Cavazos et Gonzalez de Mejia, 2013 ; Fan *et al.*, 2014 ; Hashmi *et al.*, 2010 ; López-Barrios *et al.*, 2014). Quelques exemples de bioactivités les plus courantes sont présentés dans les paragraphes suivants.

- *Activité antihypertensive*

L'activité anti-hypertensive d'une molécule se traduit généralement par l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I inactive en angiotensine II, qui est un puissant vasoconstricteur. L'inhibition de cette enzyme, appelée ACE permet ainsi de diminuer l'hypertension chez un individu. Des peptides « anti-ACE » ont été identifiés dans divers

hydrolysats d'origine animale provenant, par exemple, des caséines (Contreras *et al.*, 2011) ou de la chair de poissons (Ngo *et al.*, 2012). Les hydrolysats issus de protéines végétales révèlent la présence de peptides antihypertenseurs. Par exemple, le peptide VW a été identifié dans un hydrolysats de colza (Marczak *et al.*, 2003) et dans un hydrolysats de protéines blanches de luzerne (Kapel *et al.*, 2006b) et plusieurs séquences de peptides anti hypertensifs ont également été identifiés dans un hydrolysats de soja (Tomatsu *et al.*, 2013). L'inhibition de l'ACE a longtemps été quantifiée *in vitro*. Marczak *et al.* (2003) ont été les premiers à isoler un peptide (RIY) et à vérifier son activité anti-ACE *in vivo*. Depuis, de nombreuses études rapportent les résultats des activités anti hypertensives d'hydrolysats ou de peptides isolés obtenus sur des rats (Alashi *et al.*, 2013 ; He *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2014). Ces études ont permis de mettre en avant la récurrence des acides aminés aromatiques ainsi que les résidus positivement chargés de la lysine et de l'arginine dans les séquences des peptides antihypertenseurs.

- *Activité antimicrobienne*

L'activité antimicrobienne a notamment été démontrée pour des hydrolysats issus de protéines du lait (Benkerroum, 2010 ; Pellegrini *et al.*, 2001) ou de l'hémoglobine bovine (Froidevaux *et al.*, 2001 ; Przybylski *et al.*, 2016). La majorité des peptides identifiés ayant une activité antimicrobienne est de type cationique et à caractère amphiphile permettant une structure en hélice- α (Benkerroum, 2010). Ces caractéristiques permettent aux peptides de se lier à la membrane microbienne. Le mécanisme d'action consisterait en la perméabilisation de cette dernière ou une perturbation des échanges membranaires. Les hydrolysats avec une activité antimicrobienne peuvent être valorisés dans le domaine de la sécurité alimentaire pour la conservation des aliments. Przybylski et ses collaborateurs (2016) ont récemment montré l'efficacité d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine pour la préservation de la viande.

- *Activité antioxydante*

Les propriétés antioxydantes d'un peptide sont liées à sa capacité à neutraliser des dérivés réactifs de l'oxygène, comme les peroxydes et les radicaux libres. Ces espèces sont produites lors du métabolisme mais, en cas de stress oxydant trop important, elles peuvent endommager les cellules et conduire aux développements de maladies chroniques, comme le diabète ou le cancer (Sarmadi et Ismail, 2010). Des peptides antioxydants ont été identifiés dans les hydrolysats issus du jaune d'œuf (Chay Pak Ting *et al.*, 2011), de protéines de soja (Ranamukhaarachchi *et al.*, 2013) ou de colza (Alashi *et al.*, 2013).

- *Activité anxiolytique*

Un hydrolysats de caséine bovine alpha-s1 présente une action anxiolytique et anti-stress (Bénézech *et al.*, 2009). Cette propriété est liée à la présence d'un décapeptide, l' α -casozépine (YLGYLEQLLR). Ce peptide a un profil similaire au benzodiazépine et présente une bonne

affinité pour les récepteurs GABA-A, permettant d'obtenir un effet anxiolytique (Miclo *et al.*, 2001). L'absence d'accoutumance, de dépendance et de toxicité de cet hydrolysate permet une bonne tolérance du produit, qui peut être utilisé en prévention de troubles du sommeil et des difficultés d'adaptation à des situations stressantes. Cet hydrolysate est commercialisé par la société Ingredia sous l'appellation Latium®.

Certains peptides sont aussi utilisés pour leur activité opioïde (Kong *et al.*, 2008, Piot *et al.*, 1992), leur capacité hypocholestérolémiant (Yoshie-Stark *et al.*, 2006), la prévention de cancer (López-Barrios *et al.*, 2014) ou encore comme substrats dans les milieux de culture de cellules mammaliennes, pour remplacer le sérum de veau fœtal (Chabanon *et al.*, 2008).

Ces propriétés bioactives variées permettent une valorisation des hydrolysats dans des domaines à haute valeur ajoutée (nutraceutiques, sécurité alimentaire, milieux de culture). La mise en évidence de relations entre propriétés physico-chimiques et propriétés bioactives demeure difficile et est un enjeu scientifique majeur (Arroume *et al.*, 2016).

I.1.3. Caractérisation des hydrolysats

I.1.3.1. Répartition de masses molaires

La répartition de masses molaires est un critère essentiel de qualité des hydrolysats que ce soit d'un point de vue nutritionnel ou fonctionnel. La chromatographie d'exclusion stérique (CES) couplée à la spectrométrie d'absorption UV est la technique de référence pour caractériser la répartition des masses molaires d'un mélange peptidique complexe (Irvine, 1997 ; Johns *et al.*, 2011). La phase stationnaire des colonnes de CES est généralement composée de billes poreuses en silice recouvertes d'une couche hydrophile pour limiter l'adsorption des peptides. L'éluant est choisi de manière à assurer la solubilité des peptides et à limiter les interactions électrostatiques peptides / phase stationnaire et peptides / peptides. Un mélange d'eau et d'acétonitrile est classiquement utilisé. Un agent chimique comme le TFA ou l'acide formique peut être ajouté pour assurer la formation de paires d'ions avec les peptides et limiter leur agrégation ou leur adsorption sur la phase stationnaire. Le principe de cette technique réside dans la différence de pénétration des solutés dans les pores des billes. Le volume hydrodynamique d'un peptide, généralement corrélé à sa masse molaire, détermine son degré de pénétration. Ainsi, un peptide de taille élevée sera totalement exclu et sortira en premier de la colonne alors qu'un peptide de plus petite taille sera retenu plus longtemps dans la colonne. La détermination de la distribution de masses molaires est réalisée par l'analyse préalable de peptides standards permettant d'étalonner la colonne de chromatographie.

En sortie de colonne, un spectromètre d'absorption UV est utilisé pour la détection des peptides. La liaison peptidique a des propriétés d'absorption à une longueur d'onde de 214 nm.

Les acides aminés aromatiques absorbent également la lumière UV à 280 nm. Cette longueur d'onde est plus spécifique pour la détection de solutés protéiques et est utilisée pour l'analyse de protéines. Pour les peptides, la faible longueur des chaînes diminue la probabilité d'avoir des acides aminés aromatiques. La longueur d'onde de 214 nm est donc à privilégier.

I.1.3.2. Aminogramme

La qualité nutritionnelle des hydrolysats est directement liée à leur composition en acides aminés et notamment en acides aminés essentiels. La présence de certains acides aminés hydrophobes peut avoir une influence sur les propriétés fonctionnelles des peptides. L'analyse des propriétés des hydrolysats est donc couramment accompagnée de la caractérisation de l'aminogramme du mélange (Doyen *et al.*, 2014 ; Jiménez-Ruiz *et al.*, 2013 ; Prévot-D'Alvise *et al.*, 2003). Pour déterminer le ratio de chaque acide aminé, une hydrolyse chimique acide en présence d'HCl est utilisée afin de couper toutes les liaisons peptidiques du mélange avant une analyse par CLHP. Une oxydation supplémentaire à l'acide performique est parfois réalisée pour la quantification de la cystéine et de la méthionine. De même, une hydrolyse en milieu alcalin est nécessaire pour la quantification du tryptophane.

I.1.3.3. Concentrations globales

La détermination de la concentration globale en peptides d'un hydrolysate est importante notamment pour étudier sa solubilité ou pour le calcul des bilans de matière au cours de l'étude des procédés de fractionnement. De nombreuses techniques sont disponibles pour déterminer la concentration totale d'un mélange peptidique complexe (Silvestre, 1997). La méthode Kjeldahl est la plus utilisée dans les études portant sur les hydrolysats. Cette procédure est basée sur la détermination de la quantité totale d'azote (Sáez-Plaza *et al.*, 2013). Cette méthode est fiable mais nécessite de connaître le facteur de conversion entre l'azote total et la concentration en peptides pour chaque source de protéine. Les dosages spectrophotométriques après une réaction colorimétrique sont le second type de techniques de quantification des protéines et peptides (Silvestre, 1997). On peut notamment citer la méthode du biuret, de Lowry ou le dosage à l'acide bicinchronique (ABC, ou BCA en anglais). Ces techniques sont plus rapides que la procédure Kjeldahl mais requièrent toutefois une calibration spécifique à chaque mélange peptidique.

I.1.3.4. Propriétés physico-chimiques des peptides

Les peptides contenus dans un hydrolysats peuvent être caractérisés par leurs propriétés physico-chimiques telles leurs propriétés hydrophobes, hydrophiles ou encore leur charge. Ces caractéristiques sont parfois reliées aux propriétés fonctionnelles et bioactives des peptides (§ I.1.2.3). Les caractères hydrophobe et hydrophile des peptides peuvent être observés par couplage de chromatographie liquide haute performance en phase inverse ou en phase normale (Schweizer *et al.*, 2007 ; Yoshida, 1998). L'état de charge des peptides peut être défini par chromatographie d'échange d'ions ou par électrophorèse capillaire (Kašička, 2012). Ces techniques sont souvent couplées à la spectroscopie de masse tandem pour permettre d'identifier les peptides présents dans le mélange.

En résumé

Les coproduits industriels sont une source importante de protéines à valoriser et la production d'hydrolysats permet d'obtenir des mélanges pouvant présenter des propriétés nutritionnelles, fonctionnelles ou bioactives variées. Les hydrolysats sont classiquement caractérisés par leur répartition de masses molaires, évaluée par chromatographie d'exclusion stérique, et par leur composition en acides aminés (aminogramme). Les propriétés nutritives sont liées à la teneur en acides aminés essentiels et à la répartition de masses molaires des mélanges. Les propriétés techno-fonctionnelles sont souvent associées à la taille des peptides et leur caractère amphiphile ou hydrophobe. Les bioactivités des peptides sont cependant plus difficilement corrélées à des marqueurs spécifiques.

I.2. Fractionnement des hydrolysats protéiques

Lorsque les propriétés des hydrolysats sont liées à une famille de peptides identifiée ou à un peptide cible, la mise en œuvre de procédés de fractionnement peut être envisagée pour obtenir des fractions enrichies en peptides d'intérêt et aux propriétés supérieures à celles du mélange initial. La complexité des hydrolysats et la variété des propriétés physico-chimiques des peptides ciblées ont conduit à étudier des procédés très variés pour leur fractionnement. Des procédés classiques de séparation sont majoritairement utilisés :

- les techniques membranaires (Akin *et al.*, 2012 ; Alashi *et al.*, 2013 ; Chay Pak Ting *et al.*, 2011 ; Ranamukhaarachchi *et al.*, 2013)
- la chromatographie d'exclusion de taille et d'échange d'ions (Sampath Kumar *et al.*, 2012 ; J. Zhao *et al.*, 2013).

D'autres procédés originaux ont également été mis au point :

- ultrafiltration assistée par un champ électrique (Bazinet et Firdaous, 2009)

- membrane chromatographique (Saxena *et al.*, 2009)
- réacteur enzymatique membranaire couplé à une colonne chromatographique d'échange d'ions (Wu *et al.*, 2013 ; W. Zhao *et al.*, 2013)
- chromatographie de partage centrifuge en mode échange d'ions (CPC) (Boudesocque *et al.*, 2012)
- électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (Doyen *et al.*, 2014 ; Firdaous *et al.*, 2009)

Les performances d'un procédé de fractionnement, son coût, son extrapolation à l'échelle industrielle ainsi que l'application visée sont à prendre en considération pour le choix d'un procédé de fractionnement. Les procédés membranaires soumis à un gradient de pression, et notamment l'ultrafiltration, sont alors de loin les plus utilisés pour leur simplicité de mise en œuvre, d'extrapolation et leur coût relativement faible. La suite de cette synthèse bibliographique sera axée sur le procédé d'ultrafiltration qui est l'objet d'étude de ces travaux de thèse.

I.2.1. Les procédés baro-membranaires

I.2.1.1. Généralités sur les procédés baro-membranaires

Une membrane est une couche très mince de matière constituée de pores calibrés, qui définissent sa perméabilité et qui permettent de séparer des solutés entre les deux milieux qu'elle sépare, le rétentat et le perméat. Les procédés membranaires, dont la force motrice de la filtration est un gradient de pression, sont appelés baro-membranaires. La filtration frontale est réservée pour des applications à forte valeur ajoutée ou à l'échelle du laboratoire. La filtration tangentielle est principalement employée à l'échelle industrielle pour limiter les phénomènes de colmatage et augmenter la productivité (Figure 2).

Les membranes sont caractérisées par :

- la taille et la distribution des pores qui définissent le seuil de coupure d'une membrane (*molecular weight cut-off*, MWCO) correspondant à la taille d'un soluté retenu à 90 % par cette membrane. Le MWCO d'une membrane commerciale est généralement déterminé à l'aide de PEG de taille connue ;
- la porosité, dont dépend la densité de flux de perméat ;
- le matériau employé dont dépendent la résistance chimique et mécanique et les interactions avec le milieu traité ;
- la géométrie du module de filtration qui définit la compacité, la facilité de mise en œuvre et la nettoyabilité.

Les principaux polymères organiques utilisés pour la fabrication des membranes sont :

- des dérivés cellulosiques (acétate de cellulose (AC), cellulose régénérée (CR)). Ces membranes sont hydrophiles et peu coûteuses. L'adsorption des protéines ou peptides est limitée mais ces membranes ont une faible résistance chimique et thermique ;
- les polymères sulfonés (polysulfones (PSU), polyéthersulfones (PES), polyfluorure de vinylidène (PVDF)). Ces membranes sont très résistantes à des conditions chimiques et mécaniques extrêmes, mais elles sont plus hydrophobes et plus sensibles aux phénomènes d'adsorption.
- les polymères fluorés (polyfluorure de vinylidène (PVDF)), très stables chimiquement mais de faible perméabilité. Ces membranes sont utilisées en microfiltration uniquement ;
- les polyamides (PA). Ces membranes sont plus résistantes et sont surtout employées en nanofiltration et en osmose inverse.

Les membranes minérales sont composées d'oxydes métalliques, de verre, de carbone ou de carbure de silicium. Ces membranes sont plus onéreuses que les membranes organiques mais présentent des résistances mécanique, thermique et chimique supérieures. Les membranes sont généralement asymétriques. Elles sont composées d'une couche très fine filtrante et d'une deuxième couche macroporeuse qui assure la résistance mécanique de la structure. Les deux couches peuvent être composées de matériaux différents et on parle alors de membranes composites.

I.2.1.3. Les différents modules

Quatre types de module ont été développés pour la mise en œuvre des procédés baro-membranaires :

- le module plan (cassette) où les membranes sont superposées et intercalées par des supports. Ce module est le plus simple mais n'est pas compact ;
- le module spiralé où la membrane est enroulée sur elle-même avec un espaceur, plus compact que le module plan mais sensible au colmatage ;
- le module tubulaire, peu compact et énergivore, mais qui permet de traiter des produits très visqueux et chargés ;
- le module à fibres creuses, sensible au colmatage et fragile, mais très compact.

Le choix du module dépend de la charge à traiter, des surfaces de filtration et des conditions d'écoulement requises ainsi que de l'investissement nécessaire (Brun, 1989).

I.2.2. Mise en œuvre de l'ultrafiltration tangentielle

I.2.2.1. Modes d'implémentation

Un système d'ultrafiltration tangentielle est constitué d'un réservoir contenant le rétentat qui est recyclé en sortie de membrane et un réservoir pour récolter le perméat. Deux types de mise en œuvre sont principalement suivis pour le fractionnement des hydrolysats :

- la concentration discontinue (appelée ultrafiltration ou UF par abus de langage), durant laquelle le volume du rétentat diminue au fur et à mesure que le perméat est récolté. L'avancement du système est caractérisé par le facteur de réduction volumique (FRV) :

$$FRV = \frac{V_0}{V_r} \quad (\text{Eq. 1})$$

- la diafiltration (DF), qui consiste à maintenir le volume de rétentat constant par l'ajout d'eau ou de tampon. L'avancement du système est caractérisé par le nombre de diavolume (DV) :

$$DV = \frac{V_p}{V_0} \quad (\text{Eq. 2})$$

La Figure 4 présente le schéma d'un module de filtration. Ce système constitue un étage d'ultrafiltration en « batch ». Dans la pratique, des cascades de membranes en série peuvent être utilisées pour traiter successivement le rétentat ou pour raffiner le perméat (Deesli et Cheryan, 1992 ; Saidi *et al.*, 2013). Dans ce cas, le bac de rétentat d'un module de filtration peut être alimenté en continu par le rétentat ou le perméat du module précédent.

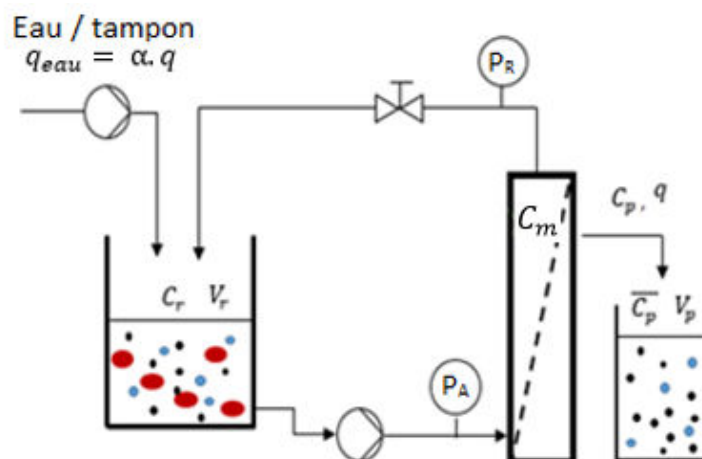


Figure 4. Schéma d'un système d'ultrafiltration tangentielle.

I.2.2.2. Grandeurs et paramètres caractéristiques

Le débit de recirculation de l'alimentation est un paramètre opératoire important qui permet de modifier les phénomènes de colmatage et de polarisation de concentration.

La pression transmembranaire (PTM) est la différence de pression en amont et en aval de la membrane. La pression du perméat est égale à la pression atmosphérique dans la plupart des cas. En pratique, la pression en amont est assimilée à la moyenne des pressions d'alimentation et de sortie du rétentat. La pression transmembranaire peut être ajustée en modifiant le débit de recirculation ou en augmentant la pression du rétentat en sortie de membrane à l'aide d'une vanne de contre-pression.

$$PTM = \frac{P_A + P_R}{2} - P_P \quad (\text{Eq. 3})$$

La densité de flux volumique, ou flux de perméation, J_p est définie comme étant le rapport du débit de perméat q sur de la surface membranaire.

$$J_p = \frac{q}{S} \quad (\text{Eq. 4})$$

La résistance membranaire

La membrane est généralement assimilée à un milieu poreux incompressible. La loi de Darcy est donc utilisée pour décrire la densité de flux volumique de l'eau pure J_{eau} (Brun, 1989):

$$J_{eau} = \frac{PTM}{\mu \cdot R_m} \quad (\text{Eq. 5})$$

Avec μ , la viscosité dynamique de l'eau et R_m , la résistance intrinsèque de la membrane.

La résistance membranaire R_m est ainsi obtenue en mesurant le flux d'eau pure à différentes pressions transmembranaires.

Le taux de rétention apparent d'un soluté est défini comme suit (Aimar *et al.*, 2010) :

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_r} \quad (\text{Eq. 6})$$

Avec C_p et C_r les concentrations en sortie de membrane côté perméat et rétentat, respectivement.

Les critères de séparation

Les performances de séparation de l'ultrafiltration sur un soluté i sont caractérisées par son rendement (η_i) et sa pureté (p_i) (Chabeaud *et al.*, 2009a ; Muller *et al.*, 1999). Ces deux grandeurs peuvent être calculées dans le perméat et le rétentat :

$$\eta_{p,i} = \frac{\overline{C_{p,i}} V_p}{C_{0,i} V_0} \quad (\text{Eq. 7}) \quad \text{et} \quad \eta_{r,i} = \frac{C_{r,i} V_r}{C_{0,i} V_0} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$p_{p,i} = \frac{\overline{c_{p,i}}}{\sum_j \overline{c_{p,j}}} \quad (\text{Eq. 9}) \quad \text{et} \quad p_{r,i} = \frac{c_{r,i}}{\sum_j c_{r,i}} \quad (\text{Eq. 10})$$

Avec i , le peptide ciblé, j , l'ensemble des solutés du mélange, $\overline{C_p}$, C_r et C_0 les concentrations dans les réservoirs de perméat, de rétentat et initial respectivement, V_p , V_r , V_0 les volumes du perméat, du rétentat et initial, respectivement.

Dans le cas de mélanges complexes comme les hydrolysats, la pureté d'un soluté est très faible et on caractérise plutôt le facteur de purification ou d'enrichissement d'un soluté au cours de l'ultrafiltration (τ_i) (Kapel *et al.*, 2011) :

$$\tau_{p,i} = \frac{p_{p,i}}{p_{0,i}} = \frac{\overline{c_{p,i}}/\sum_j \overline{c_{p,j}}}{c_{0,i}/\sum_j c_{0,j}} \quad (\text{Eq. 11}) \quad \text{et} \quad \tau_{r,i} = \frac{p_{r,i}}{p_{0,i}} = \frac{c_{r,i}/\sum_j c_{r,i}}{c_{0,i}/\sum_j c_{0,j}} \quad (\text{Eq. 12})$$

I.2.2.3. Facteurs influençant la densité de flux de perméation

Le flux de perméation au cours de l'ultrafiltration est un facteur essentiel parce qu'il détermine la productivité du procédé. Le modèle de Darcy permet une bonne description du flux d'eau pure à travers la membrane qui est directement proportionnel à la pression transmembranaire et dépend de la porosité de la membrane. Cependant, lorsqu'un fluide chargé en solutés est entraîné à la surface de la membrane, le flux de perméation diminue au cours du temps et ne dépend plus uniquement de la pression transmembranaire. Cette diminution est liée à deux phénomènes : la polarisation de concentration à la surface de la membrane et le colmatage des pores de la membrane (Aimar *et al.*, 2010 ; Brun, 1989).

- *Phénomène de polarisation de concentration*

Au cours de la filtration, les solutés sont entraînés à la surface de la membrane par le flux convectif de perméat. Les solutés ne pouvant traverser la membrane s'accumulent à la surface formant une couche limite, appelée couche de polarisation de concentration (Figure 5). Un gradient de concentration est alors observé à la surface de la membrane. Ce gradient entraîne un phénomène de rétro-diffusion des solutés vers la solution d'alimentation. La couche de polarisation est donc un équilibre entre le flux convectif de perméat et le flux de rétro-diffusion. La diminution de pression transmembranaire appliquée (force motrice du flux convectif) et l'augmentation de la vitesse de recirculation tangentielle (accroissement des forces de cisaillement et de l'érosion) sont des paramètres opératoires permettant de contrôler le phénomène de polarisation (Zhao *et al.*, 2000). La concentration initiale de la charge influe aussi sur la couche de polarisation et sur la résistance au flux de perméation (Chabeaud, 2008).

La couche de polarisation de concentration conduit à une diminution de la densité de flux du perméat par l'augmentation de la résistance hydraulique totale (Brun, 1989). La couche de polarisation chargée en solutés crée une résistance additionnelle à la résistance membranaire intrinsèque. Si la concentration à la surface de la membrane atteint la limite de solubilité des solutés, un gel compact peut se former agissant alors comme une deuxième membrane.

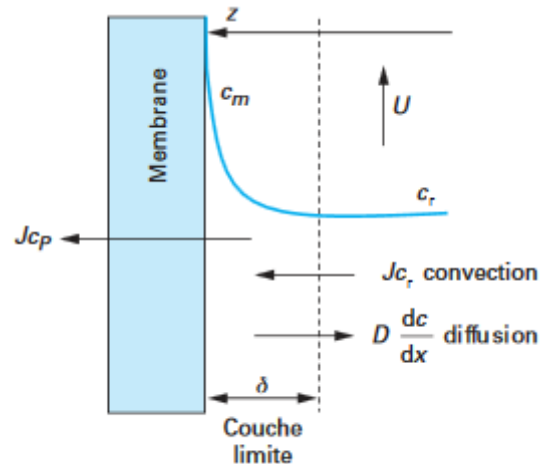


Figure 5. Phénomène de polarisation de concentration (D'après Aimar, 2010).

- *Colmatage*

La couche de polarisation de concentration peut également favoriser les phénomènes de colmatage de la membrane. On distingue trois types de colmatage (Brun, 1989) (Figure 6). (1) Le dépôt de matière à la surface de la membrane peut entraîner un blocage des pores et ainsi diminuer la densité de pores accessibles. (2) Le colmatage peut être dû à l'adsorption des molécules à la surface des pores ce qui engendre une diminution apparente de la taille des pores (Brun, 1989). (3) Un soluté ou un agrégat ayant une taille proche du diamètre interne du pore peut l'obstruer.

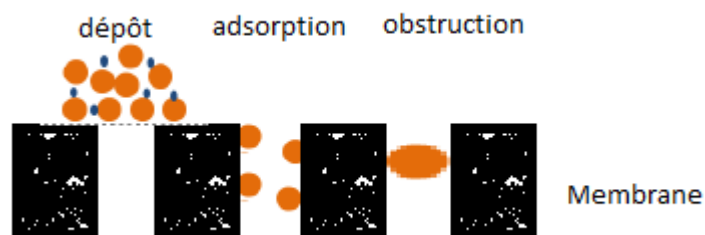


Figure 6. Phénomènes responsables du colmatage des membranes.

Les phénomènes de colmatage peuvent être réversibles (éliminés par rinçage à l'eau ou chimique) ou irréversibles. Dans ce dernier cas, les performances de filtration de la membrane évoluent à chaque traitement de charges.

Les phénomènes de colmatage dépendent du matériau de la membrane, des caractéristiques des solutés traités et des conditions opératoires (Susanto et Ulbricht, 2005). L'hydrophobie et la charge de la membrane et des solutés vont être responsables des phénomènes d'interactions électrostatiques et d'adsorption (Suwal *et al.*, 2015). La modification du pH, de la force ionique ou de la température peuvent alors altérer la force de ces interactions (Pouliot *et al.*, 1999 ; Zhao *et al.*, 2000). La vitesse de recirculation ainsi que la présence de promoteurs de turbulence en surface de la membrane peuvent également aider à limiter le colmatage (Zhao *et al.*, 2000).

Les phénomènes de colmatage et de polarisation de concentration font l'objet de nombreuses études et revues dans la littérature (Berg et Smolders, 1990 ; Marshall *et al.*, 1993 ; Metsämuuronen et Nyström, 2005 ; Susanto et Ulbricht, 2005 ; Suwal *et al.*, 2015 ; Zhao *et al.*, 2000). Certains auteurs ont notamment caractérisé ces phénomènes au cours de l'ultrafiltration d'hydrolysats protéiques en fonction des conditions opératoires. Saidi et ses collaborateurs (2013) ont comparé le colmatage irréversible de différentes membranes au cours de l'ultrafiltration d'un hydrolysat de protéines de poisson. Ils ont montré qu'une membrane en cellulose régénérée était moins sensible au colmatage que des membranes en polyamide ou polyéthersulfone. Le caractère hydrophile des membranes en cellulose régénérée permet de limiter l'adsorption de matière protéique. D'autres auteurs ont quantifié les résistances engendrées par la membrane, la couche de polarisation, le colmatage réversible et le colmatage irréversible au cours de l'ultrafiltration d'un hydrolysat de lieu noir en fonction des caractéristiques de la membrane et des conditions opératoires (Chabeaud *et al.*, 2009b). D'une part, ils ont conclu que plus la taille des pores est petite, plus la réduction du flux de perméat liée aux phénomènes d'adsorption est élevée et donc plus la membrane (en PES) est sensible au colmatage. D'autre part, ils ont montré que l'augmentation de la concentration initiale favorise les phénomènes de polarisation et de colmatage. Enfin, l'augmentation de la PTM diminue la résistance liée à la polarisation de concentration mais favorise les phénomènes d'adsorption.

I.2.2.4. Facteurs influençant la rétention des solutés

Les taux de rétention permettent de caractériser la sélectivité d'une membrane et son aptitude à séparer des solutés. La compréhension des mécanismes et des facteurs modifiant la

rétenion est un enjeu majeur pour l'amélioration et la modélisation des procédés membranaires.

La rétenion d'un soluté dépend principalement de son volume hydrodynamique, généralement assimilé à sa masse molaire, et de la taille des pores de la membrane (Brun, 1989 ; Causserand *et al.*, 2004). Cependant, les conditions opératoires et les phénomènes de polarisation et de colmatage peuvent modifier la rétenion d'un soluté.

Au niveau de la membrane d'ultrafiltration, un soluté est soumis à différentes forces (Aimar *et al.*, 2010 ; Brun, 1989) :

- la convection liée au flux de perméation à travers la membrane et régie par la PTM,
- la diffusion à l'intérieur des pores de la membrane,
- la rétro-diffusion liée à la formation de la couche de polarisation de concentration,
- les forces d'entraînement liées à la vitesse tangentielle de recirculation (érosion, cisaillement).

La compréhension des mécanismes de transfert à la surface de la membrane est délicate, car la mesure du taux de rétenion réel n'est souvent pas accessible :

$$R_{reel} = 1 - \frac{C_p}{C_m} \quad (\text{Eq. 13})$$

Avec C_m , la concentration en solutés à la surface de la membrane.

Généralement, seule la mesure de la rétenion apparente R (Eq. 6) est possible (Bourseau *et al.*, 2009 ; Causserand *et al.*, 2004 ; Fernández et Riera, 2012 ; Saidi *et al.*, 2013). L'influence des paramètres opératoires ou des caractéristiques physico-chimiques d'un peptide sur sa rétenion apparente a pu être étudiée, dans le cas de l'ultrafiltration des hydrolysats.

Chabeaud et ses collaborateurs (2009a) ont analysé la rétenion globale d'un hydrolysate de protéines de poisson sur des membranes en PES. Tout d'abord, ils ont montré que l'augmentation de la pression transmembranaire (de 10 à 30 bar) augmente la rétenion des peptides. Ils expliquent que la couche de polarisation devient plus compacte sous l'effet de la pression. Le mécanisme de transfert par diffusion devient prépondérant par rapport au flux convectif ce qui se traduit par une augmentation du taux de rétenion. Par ailleurs, ces auteurs ont observé, dans la même étude, que l'augmentation de la concentration initiale de l'alimentation implique une diminution de la rétenion globale en peptides. Ils expliquent que la modification de la concentration peut avoir deux effets antagonistes sur la couche de polarisation. D'un côté, la viscosité peut augmenter, ce qui limiterait la rétrodiffusion et diminuerait la rétenion apparente et de l'autre, la membrane devient plus compacte ce qui limite la diffusion des solutés vers le perméat et augmente la rétenion apparente. Par ailleurs

Fernández et Riera (2012) ont étudié l'influence de la concentration en hydrolysats de β -lactoglobuline sur la rétention de peptides identifiés sur des membranes en PES ou en cellulose. Pour des peptides chargés positivement, ils ont également observé une légère augmentation de la rétention avec la concentration. Cependant, pour des peptides chargés négativement, une diminution de la rétention est observée avec la concentration sur les membranes PES et la rétention est constante sur la membrane en cellulose.

Ces résultats introduisent l'effet des interactions électrostatiques soluté / membrane sur la rétention. Pour deux peptides ayant la même masse molaire, ces interactions peuvent moduler leur rétention. L'effet du pH (définissant la charge des solutés et de la membrane) sur la rétention de peptides cibles contenus dans des hydrolysats a été montré dans différentes études (Fernández *et al.*, 2013 ; Lapointe *et al.*, 2005 ; Pouliot *et al.*, 1999).

I.2.3. Modification des propriétés des hydrolysats par ultrafiltration

Pour le fractionnement des hydrolysats peptidiques, l'ultrafiltration (de 1 à 100 kDa) est le procédé membranaire le plus utilisé. Le Tableau 1 présente différents exemples d'études ayant mis en œuvre l'ultrafiltration pour obtenir des fractions aux propriétés nutritionnelles, fonctionnelles ou bioactives supérieures à celles de l'hydrolysats initial. L'ultrafiltration apparaît comme un procédé efficace pour améliorer les propriétés des hydrolysats dans les études citées. Les types de mise en œuvre sont très variés selon la fraction ou les peptides ciblés. Cependant les choix de membranes, de mise en œuvre ou de durées de traitements sont basés sur la connaissance des mélanges et l'expérience des auteurs et non sur un modèle de prédiction.

Tableau 1. Exemples d'étude portant sur le fractionnement d'hydrolysats par ultrafiltration pour l'amélioration des propriétés nutritionnelles, fonctionnelles ou bioactives.

| Nature de l'hydrolysats | Mise en œuvre de l'ultrafiltration | Propriétés nutritionnelles | Référence |
|--------------------------------|---|--|---------------------------------|
| Lactosérum | Concentration discontinue sur membrane 20 kDa, 6 kDa ou 2 kDa | Diminution de l'allergénicité des perméats avec la diminution du seuil de coupure des membranes | (Nakamura <i>et al.</i> , 1992) |
| Thon | Concentration discontinue et diafiltration sur une membrane céramique de 8 kDa et concentration du perméat sur une membrane PES 1 kDa | Amélioration des propriétés nutritionnelles et bonne balance en acides aminés essentiels de la fraction 1-4kDa | (Saidi <i>et al.</i> , 2014) |
| Nature de l'hydrolysats | Mise en œuvre de l'UF | Propriétés fonctionnelles | Référence |
| Blé | Concentration discontinue sur membrane inorganique (50 ou 150 kDa) | Amélioration des propriétés émulsifiantes et moussantes des rétentats | (Popineau <i>et al.</i> , 2002) |

| Blé | Filtrations en concentration discontinue successives sur 100, 50 et 20 kDa | Amélioration des propriétés émulsifiantes du rétentat de la membrane 50 kDa | (Wang <i>et al.</i> , 2006) |
|-------------------------------|--|---|--------------------------------------|
| | | Meilleures propriétés moussantes pour le rétentat de la membrane 100 kDa | |
| Maïs | Fractionnements successifs sur membranes en PES de 10 kDa puis 5 kDa | Amélioration des propriétés émulsifiantes de la fraction | (Kim <i>et al.</i> , 2004) |
| | | Amélioration des propriétés moussantes de la fraction 5 – 10 kDa | |
| Soja | 1 volume de diafiltration sur membrane de 5 kDa, puis le rétentat est traité en série sur membranes de 10 kDa, 50 kDa et 100 kDa | Amélioration des propriétés moussantes et de la stabilité des mousses avec l'augmentation de la classe de masses molaires des fractions | (Deesli et Cheryan, 1992) |
| Nature de l'hydrolysat | Mise en œuvre de l'UF | Bioactivité | Référence |
| Lactosérum | Concentration discontinue sur membrane en PES de 1 ou 5 kDa | Activités antioxydante et inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine supérieures dans la fraction <1 kDa | (Power <i>et al.</i> , 2014) |
| Blé | Concentration discontinue sur membrane de 3 kDa | Amélioration de l'activité opioïde du perméat | (Kong <i>et al.</i> , 2008) |
| Colza | Fractionnements successifs des rétentats sur membranes 1, 3, 5 et 10 kDa | Activité antihypertensive de la fraction < 3 kDa | (He <i>et al.</i> , 2013) |
| Noyau d'abricot | Concentration discontinue sur membrane 1 kDa | Diminution IC ₅₀ de l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine de la fraction < 1 kDa | (Zhu <i>et al.</i> , 2010) |
| Jaune d'oeuf | Concentration discontinue en cascade sur membranes en CR de 5 kDa et 1 kDa | Augmentation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> des perméats | (Chay Pak Ting <i>et al.</i> , 2011) |
| Muscles de morue | Concentration discontinue sur membrane 1 kDa | Augmentation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> de la fraction < 1 kDa | (Girgih <i>et al.</i> , 2015) |
| Maïs | Concentration discontinue en cascade sur membranes en PES de 10 kDa puis 5 kDa | Diminution IC ₅₀ de l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine de la fraction < 5 kDa | (Kim <i>et al.</i> , 2004) |

En résumé

L'ultrafiltration est largement utilisée dans le cadre du fractionnement des hydrolysats pour sa facilité de mise en œuvre et son faible coût. La densité de flux de perméation dépend de la pression transmembranaire appliquée et la sélectivité est principalement régie par l'effet « tamis » des pores de la membrane. Cependant, le transfert du fluide et la rétention des solutés peuvent être modifiés par les conditions opératoires et les phénomènes de colmatage et de polarisation de concentration.

Si le fractionnement des hydrolysats par ultrafiltration permet d'obtenir des fractions peptidiques aux propriétés nutritionnelles, fonctionnelles ou bioactives améliorées par rapport au mélange initial, le choix de l'ultrafiltration ainsi que sa mise en œuvre reste empirique pour cette application.

I.3. Modélisation du procédé d'ultrafiltration**I.3.1. Equations de bilan du procédé**

Le choix rationnel d'un procédé par rapport à un autre et son optimisation nécessitent le développement de modèles de prédiction des performances, en termes de qualité de séparation et de productivité. L'ultrafiltration peut être modélisée à partir du bilan matière suivant (d'après la Figure 4, p17) :

$$\begin{aligned} \frac{dC_{r,i}(t)}{dt} &= \frac{C_{r,i}(t)}{V_r(t)} q(t)(R_i(t) - \alpha(t)), & C_{r,i}(0) &= C_{0,i}, & \forall i \\ \frac{d\overline{C_{p,i}}(t)}{dt} &= \frac{q(t)(C_{r,i}(t)(1-R_i(t)) - \overline{C_{p,i}}(t))}{V_p(t)}, & \overline{C_{p,i}}(0) &= 0, & \forall i \\ \frac{dV_r(t)}{dt} &= (\alpha(t) - 1)q(t), & V_r(0) &= V_0 \\ \frac{dV_p(t)}{dt} &= q(t), & V_p(0) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{Eqs. 14})$$

Avec α , le rapport entre le débit d'eau ajouté au rétentat et le débit de perméat, $C_{0,i}$, $\overline{C_{p,i}}$ et $C_{r,i}$, les concentrations du soluté i dans l'hydrolysats initial, le perméat et le rétentat, V_r et V_p les volumes de rétentat et de perméat, R_i , la rétention apparente du soluté i .

Ce système d'état permet de prédire l'évolution des concentrations dans le rétentat et le perméat de chaque soluté et donc les critères de performance (rendement (Eq. 7-8), pureté

(Eq. 9-10) et enrichissement (Eq. 11-12) en fonction du temps. Deux paramètres clés sont néanmoins nécessaires et doivent être modélisés pour résoudre ce système d'équations : le débit de perméat q , et la rétention R_i de chaque soluté i .

I.3.2. Modélisation du flux de perméat

En ultrafiltration d'hydrolysats protéiques, les phénomènes de polarisation et de colmatage sont généralement analysés qualitativement dans la littérature. Des modèles ont pourtant été développés pour prédire l'évolution du flux de perméat au cours de l'ultrafiltration et ont été appliqués sur d'autres types de mélange. Les modèles phénoménologiques utilisés sont divisés en trois grandes catégories (Berg et Smolders, 1990 ; Zhao *et al.*, 2000) :

- les modèles basés sur la théorie du film,
- les modèles de résistances en série,
- les modèles de pression osmotique.

I.3.2.1. La théorie du film

La théorie du film consiste à modéliser le phénomène de polarisation de concentration (Figure 5, 20). L'équilibre entre le flux convectif et la rétrodiffusion permet d'écrire l'équation 15.

$$J_p = \frac{D}{\delta} \ln \left(\frac{c_m - c_p}{c_r - c_p} \right) \quad (\text{Eq. 15})$$

avec D , le coefficient de diffusion dans la couche de polarisation et δ , l'épaisseur de la couche de polarisation.

Le rapport D/δ représente le coefficient de transfert massique, qui dépend du soluté, des conditions opératoires et de la géométrie du module (Zhao *et al.*, 2000). La modélisation nécessite d'estimer les paramètres δ et D pour chaque soluté du mélange.

Ce modèle a été utilisé pour prédire le flux de perméation au cours de la purification d'acide hyaluronique (Oueslati *et al.*, 2015) ou de xylooligosaccharides (Hua *et al.*, 2010). Dans les deux études, les paramètres du modèle ont été déterminés à partir de données expérimentales. Ce modèle n'a cependant pas été utilisé pour des mélanges aussi complexes que les hydrolysats peptidiques.

I.3.2.2. Le modèle de résistances en série

Le modèle principalement utilisé pour caractériser la résistance au cours de l'ultrafiltration et prédire l'évolution du flux de perméat au cours de l'ultrafiltration est le modèle des résistances en série (Fane et Fell, 1987):

$$J_p = \frac{PTM}{\mu(Res_m + \sum \text{Résistance})} \quad (\text{Eq. 16})$$

Le déclin du flux de perméat est modélisé par une somme de termes de résistance liés aux différents phénomènes de polarisation et de colmatage (adsorption, obstruction, réversible, irréversible...) qui s'additionnent à la résistance intrinsèque de la membrane. Arora *et al.* (2009) et Chabeaud *et al.* (2009b) ont utilisé ce modèle pour analyser expérimentalement l'importance de chaque phénomène dans la diminution du transfert de solvant au cours de l'ultrafiltration.

D'autres auteurs ont modélisé chaque terme de résistance par des équations empiriques. Rai et ses collaborateurs (2006), ont étudié le flux de perméation lors de l'ultrafiltration frontale d'un jus de Mosambi sur une membrane en polyamide. Ils ont modélisé l'accroissement de chaque rapport ($R_{adsorption}/Res_m$, $R_{reversible}/Res_m$, $R_{obstruction}/Res_m$) par une cinétique de premier ordre. Les paramètres de chaque cinétique ont été déterminés à partir d'observations expérimentales. Yeh et ses collaborateurs (2000) ont étudié la filtration d'une solution de dextrans sur une membrane minérale tubulaire. Ils proposent de modéliser les termes de résistance liée au colmatage (R_f) et la polarisation de concentration (R_{pl}) par des équations paramétrées dépendant des conditions opératoires (pression transmembranaire, vitesse de recirculation et concentration du rétentat). La résistance liée à l'accumulation de matière en surface peut également être assimilée à une résistance de gâteau et être modélisée par la loi de Kozeny-Carman (Ho et Zydney, 2000 ; Zhao *et al.*, 2000).

I.3.2.3. Le modèle de la pression osmotique

L'évolution de la densité de flux de perméat peut également être modélisée en considérant une diminution de la force motrice liée à l'augmentation de la pression osmotique (Berg et Smolders, 1990) :

$$J_p = \frac{PTM - \Delta\pi}{\mu \cdot Res_m} \quad (\text{Eq. 17})$$

I.3.2.4. Modèle hybride

En pratique, les modèles précédents sont souvent combinés pour décrire l'évolution du flux de perméation. Kanani et ses collaborateurs (2007) ont utilisé une combinaison du modèle des

résistances en série et de la pression osmotique pour décrire la densité de flux de perméat au cours de l'ultrafiltration de BSA sur une membrane en PES (Eq. 18). Mondal et ses collaborateurs (2014) ont utilisé le même type de modèle pour décrire le flux de perméat d'une solution de cathécol en filtration frontale. Ils ont de plus modélisé $\Delta\pi$ en utilisant la relation de Van't-Hoff et R_{ad} en s'appuyant sur l'isotherme de Langmuir. Quatre paramètres ont été obtenus par régression à partir de données expérimentales.

$$J_p = \frac{PTM - \Delta\pi}{\mu(R_{es_m} + R_f)} \quad (\text{Eq. 18})$$

1.3.3. Modélisation de la sélectivité - Etalonnage des membranes

Les équations de bilans matière décrites précédemment (Eq. 14) ont déjà été appliquées dans plusieurs études pour simuler l'ultrafiltration et comparer les performances de différentes implémentations pour le fractionnement de mélange binaires (macromolécules / microsolutés) ou pour des mélanges simples. Pour cela, certains auteurs se sont affranchis de la prédiction du débit de perméat en intégrant le système dans les cas particuliers ($\alpha = 0$) et ($\alpha = 1$) (Bérot *et al.*, 1999 ; Muller *et al.*, 1999 ; Saidi *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2002). Le premier cas représente une mise en œuvre en concentration discontinue et les équations sont exprimées en fonction du FRV.

$$C_{r,i} = C_{0,i} FRV^{R_i} \quad (\text{Eq. 19})$$

$$\overline{C}_{p,i} = C_{0,i} \frac{FRV - FRV^{R_i}}{FRV - 1} \quad (\text{Eq. 20})$$

Le second cas est celui de la diafiltration. Les équations dépendent donc de DV.

$$C_{r,i} = C_{0,i} e^{(R_i - 1) \times DV} \quad (\text{Eq. 21})$$

$$\overline{C}_{p,i} = C_{0,i} \frac{1 - e^{(R_i - 1) \times DV}}{DV} \quad (\text{Eq. 22})$$

Ainsi, les bilans de matière ne dépendent plus du temps. Seules les rétentions des solutés doivent être prédites pour simuler le procédé en fonction du FRV ou du DV. Par exemple, Muller *et al.* (1999) ont simulé la purification de l' α -lactalbumine d'un mélange de β -lactoglobuline, d'albumine de sérum bovin et d'immunoglobuline par ultrafiltration sur une membrane minérale tubulaire. Les taux de rétention de chaque molécule ont été déterminés expérimentalement (par CLHP) et ont été considérés constants. Une bonne prédiction de la pureté de l' α -lactalbumine dans le perméat a été obtenue. D'autres auteurs ont suivi la même démarche pour simuler le dessalement de saccharides sur une membrane composite (PA / PS) en trois étapes successives de concentration et diafiltration (Wang *et al.*, 2002).

Ce modèle a également été utilisé dans le cas d'hydrolysats complexes. Cependant, la complexité des mélanges ne permet de mesurer la rétention de chaque peptide. Bérot *et al.* (1999) ont étudié la séparation de deux familles de peptides issus de l'hydrolyse de gliadines sur des membranes tubulaires de 50 et 150 kDa. Ils ont estimé une rétention moyenne des deux familles à partir de profils en CLHP pour simuler leur rendement et leur pureté dans le perméat pour l'une et dans le rétentat pour l'autre. Le mélange complexe a donc été rapporté à un mélange binaire pour pouvoir simuler le procédé dans différentes mises en œuvre. Chabeaud *et al.* (2009a) ont utilisé la même démarche pour prédire le rendement et la pureté d'une fraction antioxydante (< 1 kDa) au cours du fractionnement d'un hydrolysate de poissons sur une membrane de 4 kDa (PES). Plus récemment, Saidi *et al.* (2014) ont simulé l'évolution de la concentration globale dans le rétentat au cours de trois étapes successives de concentration et de diafiltration d'un hydrolysate de protéines de poisson. Pour cela, ils ont calculé une rétention globale, à partir d'une analyse CES de l'alimentation et du perméat initial, qui a été supposée constante au cours de l'ultrafiltration.

Vandanjon *et al.* (2009) avaient déjà utilisé la CES pour caractériser les fractions d'ultrafiltration. Cette technique analytique sépare les molécules selon leur volume hydrodynamique, qui est également le principal critère de rétention en ultrafiltration. Ces auteurs ont proposé de comparer les profils CES normalisés de l'hydrolysate, du perméat et du rétentat pour déterminer un «point pivot» (Figure 7). Ce point, à l'intersection des profils, délimite les masses molaires qui pourront être enrichies dans le perméat et celles enrichies dans le rétentat. Cette méthode permet de visualiser la sélectivité d'une membrane et peut être un bon outil de comparaison entre plusieurs membranes. Les profils CES ont également été utilisés pour étalonner les membranes d'ultrafiltration (Chabeaud *et al.*, 2009b). Chaque point du profil CES est associé à une masse molaire. La rétention de cette masse en ultrafiltration est calculée à partir du point du profil du perméat et du rétentat. La rétention en ultrafiltration est alors reliée à la masse molaire des solutés (Figure 8). Pour des mélanges aussi complexes que les hydrolysats, cet étalonnage permet de visualiser l'ensemble des rétentions moyennes des peptides de même masse molaire.

Kapel *et al.* (2011) ont utilisé cet étalonnage pour prédire la rétention d'un peptide d'une masse molaire donnée au cours de l'ultrafiltration d'un hydrolysate de protéines blanches de luzerne sur une membrane de 1 kDa en cellulose régénérée. Les équations de bilan de l'ultrafiltration (Eqs. 19-22) ont alors été résolues pour chaque masse molaire du mélange. Les concentrations globales dans le perméat, ainsi que le rendement et l'enrichissement d'un peptide cible antihypertenseur ont été calculés.

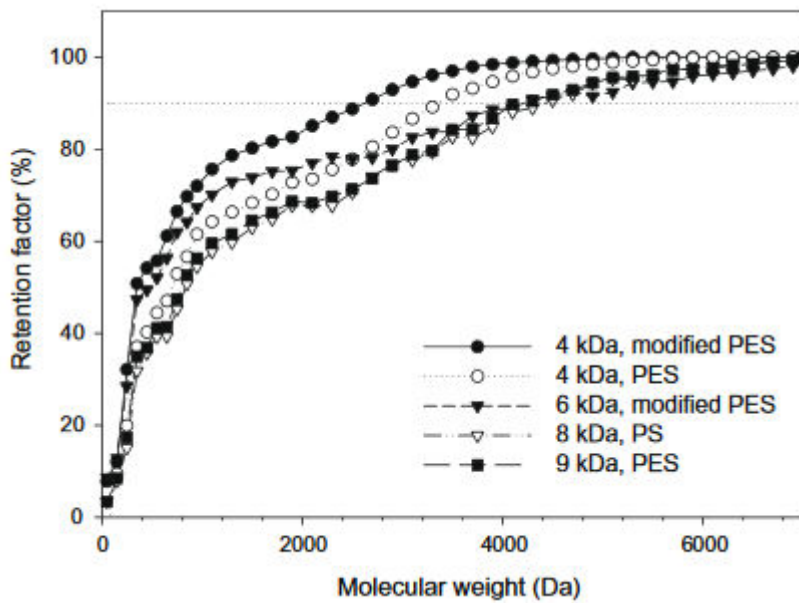
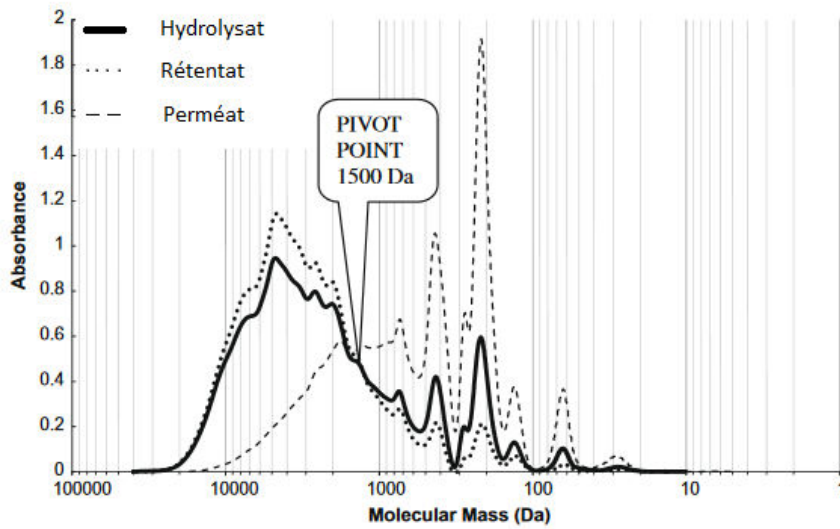


Figure 8. Comparaison de courbes d'étalonnage de membranes pour l'ultrafiltration d'un hydrolysate de poisson (D'après Chabeaud et al., 2009b).

En résumé

Les équations de bilan de l'ultrafiltration permettent de modéliser le procédé. Le modèle dépend de deux paramètres clés : le flux de perméat et la rétention des peptides du mélange.

Dans la littérature, trois modèles phénoménologiques sont principalement utilisés pour modéliser l'évolution du flux de perméat au cours de l'ultrafiltration : la théorie du film, le modèle de résistances en série et le modèle de pression osmotique. Ces modèles pourraient être utilisés pour prédire le flux de perméat au cours de l'ultrafiltration d'hydrolysats protéiques.

La complexité des hydrolysats, contenant des centaines de peptides, rend difficile la prédiction de la rétention de chaque soluté. Certains auteurs ont divisé le mélange en deux familles peptidiques et utilisent des rétentions moyennes expérimentales pour simuler le procédé d'ultrafiltration. D'autres ont imaginé une méthode basée sur les chromatogrammes d'exclusion stérique des réténats et des perméats pour tracer des courbes d'étalonnage des membranes et relier la rétention à la masse molaire des peptides. L'originalité et l'intérêt de la méthodologie présentée par Kapel *et al.* (2011) réside dans l'utilisation de la courbe d'étalonnage pour prédire les rétentions des différentes masses molaires du mélange nécessaires à la résolution des équations de bilan. Cette méthodologie est pertinente pour prédire les rendements et enrichissements de masses molaires ou de peptides cibles dans les mélanges.

I.4. L'optimisation dynamique

L'optimisation occupe une place primordiale et grandissante en génie des procédés. Elle consiste à déterminer les valeurs de paramètres clés, appelés variables de décision, afin de maximiser ou minimiser un ou plusieurs critères de performance du procédé. Deux grandes catégories d'optimisation peuvent être distinguées : l'optimisation statique et l'optimisation dynamique. La première consiste à optimiser les paramètres lorsque ceux-ci prennent des valeurs constantes au cours du procédé. Ce type d'optimisation est particulièrement utilisé dans le cas des procédés continus et en régime permanent, au cours desquels aucun critère ne varie au cours du temps. Cependant, pour les procédés discontinus, les grandeurs caractéristiques du système ne sont plus constantes. Par conséquent, les valeurs des variables de décision changent

avec le temps pour optimiser un critère donné. Dans le cas de l'ultrafiltration, l'optimisation dynamique peut être utilisée pour déterminer le meilleur profil d'alimentation en eau dans le rétentat, autrement dit, le meilleur enchaînement des étapes de concentration et de diafiltration (Fikar *et al.*, 2010; Kovacs *et al.*, 2009; Paulen *et al.*, 2012). L'optimisation dynamique de l'ultrafiltration a été étudiée par ces auteurs dans le cas de mélanges binaires « idéaux », composés d'une macromolécule et de microsolutés. Cependant, cette démarche n'a jamais été utilisée pour le fractionnement d'hydrolysats peptidiques complexes, car la difficulté de l'optimisation réside dans l'obtention préalable d'un modèle fiable pouvant prédire les performances de l'ultrafiltration.

I.4.1. Formulation du problème d'optimisation

L'optimisation dynamique concerne les procédés décrits par les modèles de la forme suivante (Bryson and Ho, 1975) :

$$\begin{aligned}\dot{x}_i &= f^{(i)}(x_i(t), u_j(t)), \quad t_0 \leq t \leq t_f \\ x_i(t_0) &= x_{i,0}\end{aligned}\tag{Eq. 23}$$

Avec $x_i(t)$, les variables d'état du système et $u_j(t)$, les variables de décision.

Le but de l'optimisation est de déterminer le profil des variables de décision $u(t)$ permettant d'optimiser un critère donné J , exprimé sous la forme suivante (Bryson et Ho, 1975) :

$$J = \varphi[x(t_f), t_f] + \int_{t_0}^{t_f} \mathcal{L}(x(t), u(t), t) dt\tag{Eq. 24}$$

Le problème d'optimisation dynamique peut s'écrire comme suit :

$$\begin{aligned}\min_u J &= \varphi[x(t_f), t_f] + \int_{t_0}^{t_f} \mathcal{L}(x(t), u(t), t) dt \\ \text{soumis à } \dot{x}_i &= f^{(i)}(x_i(t), u_j(t)), \quad t_0 \leq t \leq t_f \\ x_i(t_0) &= x_{i,0}\end{aligned}\tag{Eq. 25}$$

I.4.2. Optimisation sous contrainte

Des contraintes peuvent être ajoutées au système d'équations décrit précédemment. Il est possible de distinguer différents types de contraintes. Les contraintes peuvent être d'égalité ou d'inégalité. Une contrainte peut également être définie en tout temps ou au temps final (Bryson et Ho, 1975) :

- contrainte d'égalité intérieure :

$$\phi(x, u, t_i) = 0, \quad t_0 \leq t_i \leq t_f \quad (\text{Eq. 26})$$

- contrainte d'inégalité intérieure :

$$\phi(x, u, t_i) \geq 0, \quad t_0 \leq t_i \leq t_f \quad (\text{Eq. 27})$$

- contrainte d'égalité terminale :

$$\phi(x, u, t_f) = 0 \quad (\text{Eq. 28})$$

- contrainte d'inégalité terminale :

$$\phi(x, u, t_f) \geq 0 \quad (\text{Eq. 29})$$

- contrainte d'égalité infinie :

$$\phi(x, u, t) = 0 \quad (\text{Eq. 30})$$

- contrainte d'inégalité infinie :

$$\phi(x, u, t) \geq 0 \quad (\text{Eq. 31})$$

Les contraintes peuvent être exprimées sous la même forme que le critère d'optimisation et ainsi être agrégées à ce dernier. Les contraintes sont alors prises en compte dans le problème d'optimisation.

I.4.3. La résolution numérique

Dans le cas de modèles complexes et non linéaires, la résolution analytique du problème d'optimisation n'est pas aisée et le recours à des outils numérique est nécessaire. La résolution numérique peut être stochastique ou déterministe. Seules les méthodes déterministes sont considérées dans ce travail.

I.4.3.1. Les méthodes déterministes

Elles sont scindés en deux catégories : les méthodes indirectes, qui consistent à chercher une solution répondant aux conditions d'optimalité, et les méthodes directes, essentiellement basées sur la transformation du problème de dimension infinie en un problème de dimension

finie (Srinivasan *et al.*, 2003). Les méthodes directes sont largement utilisées et deux approches peuvent être envisagées.

- *Approche de discrétisation totale*

La première approche consiste en une discrétisation totale du problème. Les variables d'état x et les variables de décision u sont approximées par des formules polynomiales, ce qui simplifie la résolution du système et diminue considérablement le temps de calcul. Cependant, cette méthode est de « type non faisable », c'est-à-dire qu'une solution est obtenue seulement en cas de convergence de l'optimisation (Biegler, 2007).

- *Approche séquentielle*

L'approche séquentielle consiste à ne paramétrer que les variables de décision u . Cette approche est également appelée *control vector parametrization* (CVP). Les variables de décision sont approximées par des polynômes ou encore par des fonctions constantes par morceaux. Le choix du pas de discrétisation et des fonctions d'approximation permettent de moduler les performances de l'optimisation pour se rapprocher au maximum de la solution analytique du problème. Les étapes de l'approche séquentielle sont les suivantes :

- 1) les variables de décision u sont discrétisées en un nombre fini de paramètres \bar{u} ,
- 2) des valeurs initiales doivent être choisies pour les paramètres \bar{u} ,
- 3) le système d'état non paramétré est intégré et le critère d'optimisation J est calculé,
- 4) une méthode d'optimisation, souvent fondée sur le calcul du gradient du critère, est alors utilisée pour déterminer de nouvelles valeurs pour le vecteur de paramètres \bar{u} (§ I.4.3.2).

Les étapes 3 et 4 sont alors répétées jusqu'à ce que les conditions d'optimalité soient satisfaites. Cette approche est de « type faisable », c'est-à-dire qu'à chaque itération, on obtient une estimation de la solution optimale.

I.4.3.2. Calcul du gradient du critère et des contraintes

Posons $\theta = (\bar{u}_1, \bar{u}_2, \dots, \bar{u}_n)^T$, le vecteur des n paramètres discrétisés. La résolution du problème d'optimisation par la méthode CVP revient donc à minimiser $J(\theta)$ et à estimer un nouveau vecteur θ à chaque itération k . Celui-ci est classiquement calculé à partir du gradient du critère et des contraintes :

$$\theta^{k+1} = \theta^k - \rho \nabla J(\theta^k) \quad , \rho > 0 \quad (\text{Eq. 32})$$

Les performances de l'optimisation dépendent du calcul du gradient de J, qui peut être approximé par la méthode des différences finies, du système adjoint ou des sensibilités (Chachuat, 2001). Cette dernière sera utilisée dans ce travail.

La méthode des sensibilités consiste à intégrer les équations de sensibilité de l'état. Ces équations sont obtenues comme suit :

$$\dot{S}_{ij} = \frac{d}{dt} \left[\frac{\partial x_i}{\partial \theta_j} \right] = \frac{\partial f^{(i)}}{\partial x_i} \cdot S_{ij} + \frac{\partial f^{(i)}}{\partial \theta_j}, \quad S_{ij}(0) = 0 \quad (\text{Eq. 33})$$

Les sensibilités sont alors calculées par intégration, simultanément aux équations d'états à chaque itération de la résolution numérique. Le gradient de J est calculé à partir des sensibilités comme suit :

$$\nabla J \approx \begin{pmatrix} \frac{\partial J}{\partial \theta_1} \\ \vdots \\ \frac{\partial J}{\partial \theta_n} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\partial J}{\partial x_1} \cdot S_{11} & \cdots & \frac{\partial J}{\partial x_n} \cdot S_{n1} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial J}{\partial x_1} \cdot S_{1m} & \cdots & \frac{\partial J}{\partial x_n} \cdot S_{nm} \end{pmatrix} \quad (\text{Eq. 34})$$

La condition nécessaire d'optimalité est :

$$\nabla J(\theta^*) = 0 \quad (\text{Eq. 35})$$

I.4.4. Optimisation multicritère

En génie des procédés, l'optimisation consiste généralement à maximiser un critère (productivité, pureté...) tout en minimisant le coût global et en respectant des normes strictes. Dans le cas de l'ultrafiltration, la productivité du procédé liée au débit de perméat ainsi que le coût de diluant de diafiltration sont les deux critères classiquement optimisés (Fikar *et al.*, 2010). Ce type de problème est multiobjectif, et les critères considérés sont souvent antagonistes. Leur optimum respectif n'est pas satisfait pour les mêmes valeurs de variables de décision. Contrairement à un problème monocritère caractérisé par une solution unique, la résolution d'un problème multicritère conduit à l'obtention d'un ensemble de solutions satisfaisant les contraintes et non dominées, représentant les meilleurs compromis entre les différents critères. Cet ensemble de solutions est plus connu sous le nom de front de Pareto.

Deux types de méthodes peuvent être utilisés pour prendre en compte plusieurs objectifs dans le problème d'optimisation.

I.4.4.1. Approche par agrégation des critères

Une classe de méthodes consiste à agréger les différents critères en un seul critère J par une combinaison en attribuant un poids à chacun d'entre eux. La forme la plus simple est de sommer les différents critères :

$$\begin{aligned} \min J &= \sum a_i F_i \\ \text{avec } a_i &\geq 0 \text{ et } \sum a_i = 1 \\ \text{soumis à } \dot{x} &= f(x(t), u(t)), \quad x(t_0) = x_0 \end{aligned} \quad (\text{Eq. 36})$$

La variation des poids permet d'obtenir un ensemble de solutions optimales. Cependant, une bonne connaissance du système est nécessaire pour choisir judicieusement les poids et obtenir des points bien répartis sur le front de Pareto. De plus, cette méthode ne permet pas de révéler les portions concaves du front (Das et Dennis, 1997).

I.4.4.2. Approche par ε -contraintes

Cette méthode consiste à choisir un critère comme le critère principal à optimiser et à transformer les autres critères en contraintes, bornées par une valeur ε (Mavrotas, 2009).

$$\begin{aligned} \min J &= F_1 \\ \text{soumis à } \dot{x} &= f(x(t), u(t)), \quad x(t_0) = x_0 \\ F_2 &\leq \varepsilon_2 \\ &\vdots \\ F_k &\leq \varepsilon_k \end{aligned} \quad (\text{Eq. 37})$$

Cette méthode permet de d'obtenir une bonne approximation du front de Pareto par augmentation progressive et successive des valeurs de epsilon. Cette méthode permet d'identifier les parties concaves du front de Pareto et a été utilisée dans ces travaux.

I.4.5. Outils d'aide à la décision

L'objectif de l'optimisation entre plusieurs critères contradictoires est d'identifier tous les compromis optimaux au sens de Pareto. Selon les problèmes et le nombre de critères, le choix de la meilleure solution n'est pas toujours aisé. L'utilisateur peut alors s'appuyer sur des outils du génie décisionnel, qui constitue une science à part entière. Ces outils ont pour but de modéliser les préférences du décideur et d'élaborer un système d'aide à la décision. Les paramètres du

modèle sont déterminés à partir des notes attribuées par le décideur à différentes alternatives pour chaque critère.

L'une des méthodes couramment utilisée est la théorie de l'utilité multi-attributs (MAUT : Multi-Attribute Utility Theory). Le principe de cette méthode se résume en 4 étapes (Kim and Song, 2009) :

- Définir les limites de chaque critère.
- Définir les fonctions d'utilités individuelles qui peuvent être par exemple de type linéaire ou exponentiel, contenant des paramètres identifiés selon les préférences du décideur (Benyahia, 2009).
- Evaluer le poids de chaque critère selon les préférences du décideur.
- Définir la fonction d'utilité multi-attributs. La forme la plus simple est la somme pondérée des fonctions d'utilités individuelles (Benyahia, 2009).

En résumé

La difficulté de l'optimisation réside dans l'obtention préalable d'un modèle robuste pouvant prédire les performances du procédé. Dans le cas d'un modèle non-linéaire et complexe, le recours à des méthodes numériques est nécessaire. La résolution par discrétisation de la variable de décision (CVP), associée à une méthode de calcul du gradient du critère d'optimisation est très répandue pour l'optimisation dynamique des procédés. Aussi, l'optimisation de plusieurs critères antagonistes nécessite l'utilisation d'outils d'aide à la décision pour choisir la meilleure solution parmi l'ensemble des « compromis optimaux ».

L'optimisation dynamique multicritère de l'ultrafiltration a déjà été étudiée pour des mélanges binaires. La prise en compte de la durée du procédé et du volume d'eau consommée en plus des critères de séparation permet d'envisager une mise en œuvre rationnelle de l'ultrafiltration. Cependant, cette démarche n'a encore jamais été appliquée au fractionnement d'hydrolysats protéiques et peut être pertinente pour optimiser et comparer l'ultrafiltration à d'autres procédés de fractionnement.

CHAPITRE II

MATERIEL &

METHODES

II.1. Les hydrolysats étudiés

II.1.1. Le Lactium®

Le Lactium® est un hydrolysat tryptique d'αS1-caséine bovine commercialisé par la société Ingredia. Cet hydrolysat contient un décapeptide bioactif, l'αS1-cazosépine (YLGYLEQLLR). Il s'agit du fragment 91-100 de l'αS1-caséine. La masse molaire de ce peptide est de 1267 g.mol⁻¹. Ce peptide a une affinité particulière avec les récepteurs GABA-A lui conférant une action anxiolytique (Bénézech *et al.*, 2009). Le Lactium® est présenté comme un tranquillisant naturel pouvant être utilisé pour la formulation de produits nutraceutiques.

Le Lactium® a été fourni par Ingredia sous forme de poudre lyophilisée. D'après les données du fournisseur, la composition de la poudre est la suivante : 78,5 % de matière protéique, 0,5 % de lipides, 1 % de glucides, 15 % de minéraux et 5 % d'eau.

Le Lactium® étant trouble en solution, une clarification par microfiltration tangentielle a été réalisée. 10 L de Lactium® à une concentration de 20 g.L⁻¹ ont été filtrés sur une cassette avec une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF) de 0,22 μm et une surface de 0,1 m² (Millipore), installée sur un système de filtration ProScale (Millipore, Bedford, Etats-Unis). La filtration a été réalisée à une pression transmembranaire de 1 bar. Un rinçage à l'eau, puis avec une solution de NaOH à 0,1 M a été réalisé afin de recouvrer le débit de perméat en eau initial. La solution de Lactium® clarifiée a ensuite été lyophilisée et stockée à 4 °C.

II.1.2. Hydrolysats d'hémoglobine bovine

Des hydrolysats d'hémoglobine bovine ont également été utilisés. Ces hydrolysats ont été fournis par le laboratoire ProBioGem de l'université de Lille 1. Les hydrolysats ont été préparés comme reporté par Przybylski *et al.* (2016). Quatre hydrolysats à différents degrés d'hydrolyse ont été utilisés : 3, 5, 10 et 18 %. Ces hydrolysats contiennent des peptides bioactifs identifiés. VVh-7 (VVYPWTQRF, MM = 1195 g.mol⁻¹) et LVVh-7 (LVVYPWTQRF, MM = 1308 g.mol⁻¹) ont une activité opioïde (Kapel *et al.*, 2003). La neokyotrophine (TSKYR, MM = 654 g.mol⁻¹) est un puissant antimicrobien (Przybylski *et al.*, 2016). Les hydrolysats sous forme de poudre lyophilisée sont stockés à 4 °C.

II.2. Mise en œuvre expérimentale de l'ultrafiltration

II.2.1. Les membranes

Les membranes utilisées sont des membranes planes conditionnées en cassettes fournies par Millipore. Cette configuration permet l'empilement des membranes et d'augmenter la surface de filtration tout en limitant l'encombrement du système. Millipore a développé des espaceurs entre les membranes permettant d'augmenter la turbulence du fluide à la surface des membranes et de limiter les phénomènes de polarisation de concentration et de colmatage. La technologie précise et la géométrie de ces espaceurs n'ont cependant pas été communiquées par Millipore.

Les cassettes utilisées contiennent des membranes en cellulose régénérée (CR), matériau limitant l'adsorption des matières protéiques. Les membranes ne sont pas chargées dans la gamme de pH étudiée. La surface de filtration est de 88 cm² et le seuil de coupure des membranes est de 3 kDa ou 1 kDa. Ce seuil de coupure est déterminé par le fournisseur en mesurant la rétention de polyéthylène glycol (PEG) de différentes tailles.

Après utilisation, les membranes sont rincées à l'eau, puis avec une solution de soude (NaOH) à 0,1 M. Les cassettes sont stockées à 4 °C dans une solution de NaOH à 0,1 M.

II.2.2. Le pilote

Les essais d'ultrafiltration ont été réalisés à l'aide un pilote de laboratoire Cogent® µScale (Millipore, Molsheim, France) (Figure 9). Le pilote comporte une cuve de 1 litre et un agitateur magnétique pour la solution d'alimentation. Une pompe péristaltique permet la circulation du fluide. Le rétentat est recyclé dans la cuve d'alimentation et le perméat est récupéré. La mesure du débit de perméat se fait par pesée en un temps donné. Deux manomètres permettent de mesurer la pression en sortie de pompe et l'autre en sortie de membrane côté rétentat. Une vanne de contre-pression permet d'augmenter la pression du rétentat. Un support métallique permet de fixer un module de filtration de type cassette. Les expériences sont conduites à température ambiante (22 °C +/- 2 °C). Pour l'implémentation en mode diafiltration, une pompe péristaltique externe est utilisée pour maintenir le volume de rétentat constant par ajout d'eau. Le débit d'eau est alors ajusté pour être égal à celui du perméat tout au long de l'expérience.



Figure 9. Pilote Cogent® µScale.

II.2.3. Fractionnement du Lactium® sur la membrane en cellulose régénérée de 3 kDa

II.2.3.1. Comparaison de la sélectivité et des performances en concentration discontinue et diafiltration

Des expériences en concentration discontinue et en diafiltration continue sur le Lactium® ont été réalisées dans les mêmes conditions opératoires pour comparer la sélectivité de la membrane dans les deux modes d'implémentation. Le Lactium® clarifié et lyophilisé est solubilisé dans de l'eau distillée à une concentration (C_0) de 10 g.L^{-1} . Le pH de l'hydrolysate est de 6,9. La pression transmembranaire (PTM) est maintenue constante à 3 bar. Le débit de recirculation de l'alimentation (d_{feed}) est de 100 mL.min^{-1} .

Le volume initial pour la concentration est de 200 mL. Avant de commencer à récolter le perméat, le rétentat et le perméat sont mis en recirculation totale pendant 20 minutes, temps nécessaire pour stabiliser le débit de perméat et la couche de polarisation de concentration à la surface de la membrane. L'expérience est stoppée à un facteur de réduction volumique de 5. Des prélèvements de 0,5 mL sont effectués dans le bac d'alimentation et dans le bac de perméat à FRV 1, 1,19, 1,47, 1,96, 2,77 et 5 (soit tous les 40 mL de perméat). Le débit de perméat est mesuré à chaque prélèvement. Le volume initial de diafiltration est de 50 mL. De l'eau distillée est ajoutée en continu pour maintenir le volume du rétentat constant. L'expérience est stoppée après 10 diavolumes. Des prélèvements de 0,5 mL sont effectués dans le bac d'alimentation et dans le bac de perméat à chaque diavolume. Les échantillons sont analysés par un dosage BCA (BiCinchoninic acid Assay), par chromatographie d'exclusion stérique (CES) (§ II.6.1) et par chromatographie liquide haute pression CLHP en phase inverse (CLHP-PI) couplée à un

spectromètre de masse (§ II.6.3). Ces analyses permettent de déterminer les concentrations globales en peptides dans les compartiments et les concentrations relatives en une classe de masses molaire donnée ou en peptides cibles au cours du procédé et donc de calculer les rendements et enrichissements (Eq 7-12). Trois répliques sont réalisés pour chaque mode opératoire.

Avant chaque expérience, la résistance membranaire en eau est mesurée (§ II.2.3.2). A la fin de chaque expérience, la membrane est dans un premier temps rincée à l'eau. La résistance membranaire en eau est alors de nouveau mesurée pour estimer le colmatage irréversible. La membrane est ensuite rincée avec une solution de NaOH 0,1 M avant stockage.

II.2.3.2. Détermination de la résistance membranaire intrinsèque (Res_m)

La résistance membranaire intrinsèque est calculée à partir du débit d'eau à travers la membrane à 6 différentes pressions transmembranaire de 0,5 bar à 3 bar. D'après la loi de Darcy (Eq. 5) le coefficient de proportionnalité entre la densité de flux d'eau et la pression transmembranaire est $1/\mu Res_m$.

II.2.3.3. Détermination expérimentale de la résistance liée à la polarisation de concentration (Res_{pl}) au cours de l'ultrafiltration

D'après le modèle des résistances en séries (Eq. 16), la densité de flux de perméat est inversement proportionnelle à la somme de la résistance membranaire, la résistance de la couche de polarisation et la résistance liée au colmatage irréversible. La résistance liée au colmatage irréversible est considérée négligeable, car il a été observé au cours des expériences que le débit d'eau à travers la membrane utilisée avant et après la filtration d'hydrolysats est identique, après un simple rinçage à l'eau. Il a été conclu qu'il n'y avait pas de colmatage irréversible et le modèle de résistance en série a été simplifié.

$$J_p = \frac{PTM}{\mu(Res_m + Res_{pl})} \quad (\text{Eq. 16})$$

La viscosité du perméat est supposée constante et égale à celle de l'eau, en fonction de la gamme de concentrations initiales de l'hydrolysate. Par conséquent, la résistance liée au phénomène de polarisation de concentration au cours de l'ultrafiltration est estimée en fonction de l'évolution du débit de perméat expérimental :

$$Res_{pl} = \frac{PTM}{\mu \cdot J_{p,exp}} - Res_m \quad (\text{Eq. 38})$$

II.2.3.4. Etude de l'influence des conditions opératoires sur la sélectivité de la membrane et le débit de perméat en recirculation totale

Les variations de la concentration initiale du Lactium® (10, 30 et 50 g.L⁻¹), de la pression transmembranaire (1, 2, 3 bar), et du débit de recirculation de l'alimentation (50, 75 et 100 mL.min⁻¹) ont été étudiées. L'influence des conditions opératoires sur la sélectivité de la membrane a été mise en évidence en comparant les courbes d'étalonnage obtenues en recirculation totale (§ II.3.2). Les conditions mises en jeu sont représentés dans la Figure 10.

L'évolution du débit de perméat au cours du temps pour différentes conditions opératoires a également été mesurée. Les conditions mises en jeu sont représentés dans la Figure 11. La PTM et le débit de recirculation sont maintenues constantes et les expériences ont été stoppées lorsque la limite de solubilité du Lactium® dans le rétentat a été atteinte (à 70 g.L⁻¹).

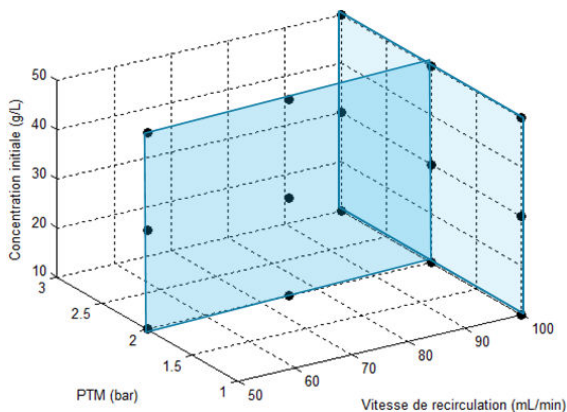


Figure 10. Conditions opératoires de l'UF mises en jeu pour étudier leur influence sur l'étalonnage de la membrane.

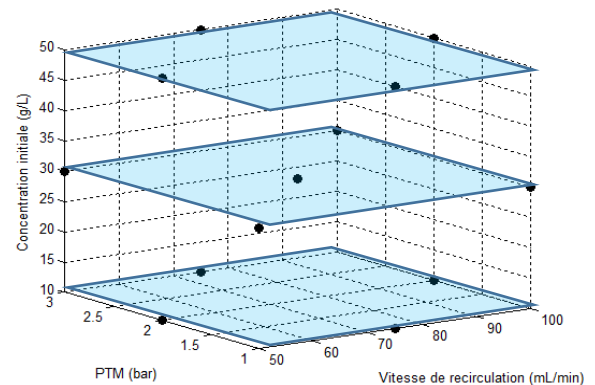


Figure 11. Conditions opératoires de l'UF utilisées pour mesurer l'évolution du débit de perméat en concentration au cours du temps.

II.2.4. Fractionnement d'hydrolysats d'hémoglobine bovine

Les hydrolysats d'hémoglobine bovine ont été étudiés pour valider la méthodologie de prédiction des performances de l'ultrafiltration. Les hydrolysats avec des degrés d'hydrolyse de 3 et 5 % ont été fractionnés en UF et DF sur la membrane de 3 kDa en cellulose régénérée (PTM = 3 bar, débit de recirculation = 100 mL.min⁻¹, concentration initiale = 5 g.L⁻¹). Les expériences en concentration discontinue sont stoppées à un FRV de 3. Les expériences en diafiltration sont stoppées à 10 DV. Le rendement et l'enrichissement en VVh-7 et LVVh-7 dans le perméat en UF et DF sont suivis pour comparer les deux modes de mise en œuvre. Pour cela, des analyses en CES et CLHP-PI-MS sont effectués sur des échantillons du perméat.

Les hydrolysats avec des degrés d'hydrolyse de 3, 5, 10 et 18 % ont été traités en concentration discontinue sur une membrane en cellulose régénérée de 1 kDa (PTM = 3 bar, débit de recirculation = 100 mL.mn⁻¹, concentration initiale = 5 g.L⁻¹). Les expériences en concentration discontinue sont stoppées à un FRV de 5. Le rendement et l'enrichissement de la neokytorphine (TSKYR) dans le perméat ont été suivis pour comparer les performances en fonction du degré d'hydrolyse. Pour cela, des analyses en CES et CLHP-PI-MS sont effectués sur des échantillons du perméat.

II.3. Stratégie de modélisation des performances de l'ultrafiltration : rendement et enrichissement d'un peptide

II.3.1. Simulation du rendement et de l'enrichissement

Le rendement et l'enrichissement sont deux critères de performance de l'ultrafiltration. Ils peuvent être exprimés en fonction des concentrations relatives, du FRV en concentration discontinue ou du DV en diafiltration. Les équations sont résumées dans le Tableau 2. Il apparaît que seules la rétention d'un peptide R_i ainsi que la concentration globale en peptides ($\sum_j \overline{C_{p,j}}$ et $\sum_j C_{r,j}$) dans les compartiments sont requises afin de prédire les performances de l'ultrafiltration.

Tableau 2. Formules du rendement et de l'enrichissement

| | | Rendement (η_i) | Facteur d'enrichissement (τ_i) | Concentration relative $\frac{\overline{C_{p,i}}}{C_{0,i}}$ ou $\frac{C_{r,i}}{C_{0,i}}$ |
|--------------------|----------|---|---|--|
| Concentration (UF) | Perméat | $\frac{\overline{C_{p,i}}}{C_{0,i}} \times \left(1 - \frac{1}{VRF}\right)$ (Eq. 39) | $\frac{\overline{C_{p,i}}}{C_{0,i}} \times \frac{\sum_j C_{0,j}}{\sum_j \overline{C_{p,j}}}$ (Eq. 43) | $\frac{FRV - FRV^{R_i}}{FRV - 1}$ (Eq. 47) |
| | Rétentat | $\frac{C_{r,i}}{C_{0,i}} \times \left(\frac{1}{VRF}\right)$ (Eq. 40) | $\frac{C_{r,i}}{C_{0,i}} \times \frac{\sum_j C_{0,j}}{\sum_j C_{r,j}}$ (Eq. 44) | FRV^{R_i} (Eq. 48) |
| Diafiltration (DF) | Perméat | $\frac{\overline{C_{p,i}}}{C_{0,i}} \times DV$ (Eq. 41) | $\frac{\overline{C_{p,i}}}{C_{0,i}} \times \frac{\sum_j C_{0,j}}{\sum_j \overline{C_{p,j}}}$ (Eq. 45) | $\frac{1 - e^{(R_i - 1) \times DV}}{DV}$ (Eq. 49) |
| | Rétentat | $\frac{C_{r,i}}{C_{0,i}}$ (Eq. 42) | $\frac{C_{r,i}}{C_{0,i}} \times \frac{\sum_j C_{0,j}}{\sum_j C_{r,j}}$ (Eq. 46) | $e^{(R_i - 1) \times DV}$ (Eq. 50) |

II.3.2. Etalonnage des membranes d'ultrafiltration et prédiction de R_i

Deux hypothèses sont faites concernant la rétention de chaque peptide i :

- R_i ne dépend que de la masse molaire du peptide i ;
- R_i est constant au cours de l'ultrafiltration.

Un étalonnage de la membrane d'ultrafiltration est déterminé en adaptant une méthode développée par Chabeaud *et al.* (2009). Le perméat et le rétentat initiaux, après 20 minutes de recirculation totale, sont analysés par chromatographie d'exclusion stérique (CES) (§ II.6.1). Pour ces mélanges peptidiques complexes, chaque point du chromatogramme est considéré comme un mélange de peptides ayant la même masse molaire. Par conséquent, chaque durée d'éluion en CES est associée à une masse molaire grâce à la calibration de la colonne de chromatographie par des peptides standards (§ II.6.1). De plus, pour chaque temps d'éluion x en CES, une rétention en UF est calculée à partir des absorbances des chromatogrammes du perméat et du rétentat :

$$R_x = 1 - \frac{A_{p,x}}{A_{r,x}} \quad (\text{Eq. 51})$$

Une courbe d'étalonnage linéaire est alors obtenue en traçant la rétention de chaque point x du profil CES en fonction du logarithme de la masse molaire associée (Figure 12). La rétention d'un peptide cible R_i d'une masse molaire donnée est donc directement obtenue à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage.

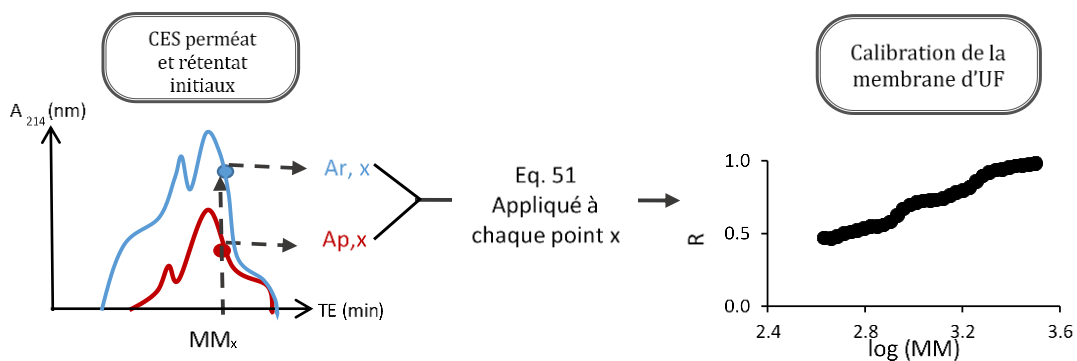


Figure 12. Méthode d'étalonnage de la membrane d'UF.

II.3.3. Prédiction du rendement

L'évolution du rendement d'une masse molaire dans le perméat et le rétentat dépend seulement de sa concentration relative qui peut être calculée à partir des bilans de matière en UF et DF (Eq 47-50). La simulation des rapports $\frac{\overline{C_{p,i}}}{C_{0,i}}$ ou $\frac{C_{r,i}}{C_{0,i}}$ requiert seulement la connaissance de la rétention R_i de la masse ciblée, qui est obtenue à partir de la calibration de la membrane.

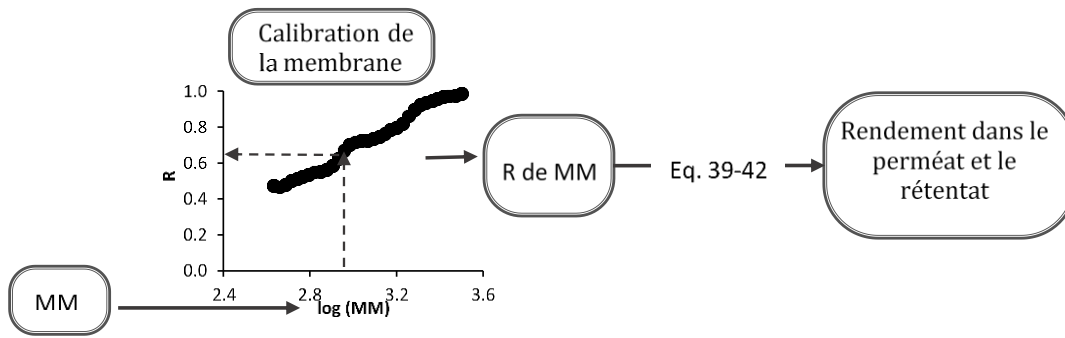


Figure 13. Méthode de prédiction du rendement dans le perméat et le rétentat.

II.3.4. Prédiction de l'enrichissement

Pour prédire le facteur d'enrichissement d'une masse molaire donnée dans un compartiment, sa concentration relative ainsi que la concentration globale en peptides dans le compartiment concerné ($\sum_j \overline{C_{p,j}}$ ou $\sum_j C_{r,j}$) sont requises (Eq 43-46).

La prédiction de $\sum_j \overline{C_{p,j}}$ et $\sum_j C_{r,j}$ se fait en deux étapes. Tout d'abord, le profil d'absorbance en chromatographie d'exclusion stérique des compartiments est prédit. Pour cela, une analyse de l'hydrolysats initial par CES est requise. Par l'intermédiaire de l'étalonnage de la membrane, une rétention en ultrafiltration est associée à un point du chromatogramme, considéré comme un mélange de peptides ayant la même masse molaire. L'absorbance étant proportionnelle à la concentration, le bilan de matière de l'ultrafiltration peut être appliqué à chaque point d'absorbance du profil de l'hydrolysats initial. Les profils d'absorbance de répartition de masses molaires du perméat et du rétentat peuvent être prédits.

Dans un deuxième temps, ces profils d'absorbance sont convertis en profils de concentration en utilisant une méthode décrite dans la section § II.6.4. La concentration totale peut être calculée en intégrant le profil en concentration.

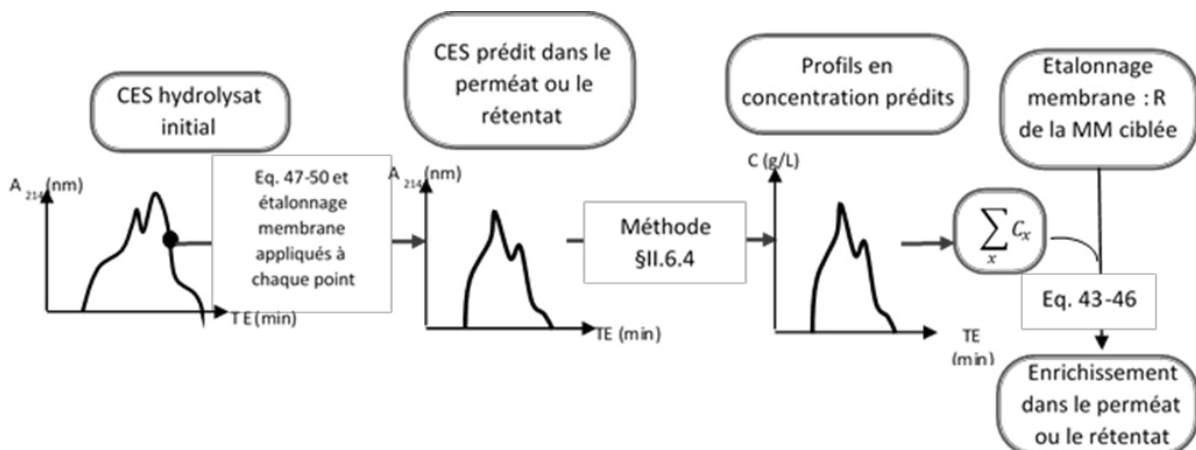


Figure 14. Méthode de prédiction de l'enrichissement dans le perméat et le rétentat.

II.4. Modélisation du débit de perméat

Un modèle de résistance en série est utilisé pour modéliser le débit de perméat au cours de l'ultrafiltration. La résistance membranaire intrinsèque Res_m est déterminée expérimentalement. La résistance de la couche de polarisation, qui dépend des conditions opératoires de l'ultrafiltration (PTM, concentration totale du rétentat et débit d'alimentation) est modélisée par l'équation suivante, adaptée des travaux de Yeh et al. (2000). Le modèle est donc de la forme suivante :

$$q = \frac{PTM}{Res_m + aPTM^b d_{feed}^c \sum C_r^d} \quad (\text{Eq. 52})$$

Avec q , le débit de perméat ($L \cdot h^{-1}$), Res_m , la résistance membranaire intrinsèque en ($bar \cdot h \cdot L^{-1}$), PTM , le pression transmembranaire (bar), d_{feed} , le débit de recirculation ($L \cdot h^{-1}$), $\sum C_r$, la concentration globale en peptide dans le rétentat ($g \cdot L^{-1}$).

Les paramètres a , b , c et d sont déterminés à partir des données expérimentales de débit au cours de de l'ultrafiltration en mode concentration (§ II.2.3.4). A chaque relevé de débit, un échantillon du rétentat est prélevé afin de déterminer $\sum C_r$ par analyse en chromatographie d'exclusion stérique (§ II.6.1). Les paramètres sont optimisés par identification paramétrique pour minimiser l'erreur quadratique cumulée entre le modèle et les flux expérimentaux. La fonction `fmincon` du logiciel Matlab est utilisée pour la résolution numérique. Le modèle est validé selon une procédure croisée, qui consiste à déterminer les paramètres avec $n-1$ observations expérimentales tout en vérifiant la fiabilité du modèle pour prédire la $n^{\text{ème}}$ observation.

II.5. Optimisation dynamique multicritère de l'ultrafiltration

L'optimisation dynamique de l'ultrafiltration a pour but de déterminer les profils optimaux des variables opératoires qui optimisent les performances du procédé. Pour cela, les équations de bilans qui constituent le modèle du procédé sont utilisées :

$$\begin{aligned} \frac{dC_{r,i}(t)}{dt} &= \frac{C_{r,i}(t)}{V_r(t)} q(t) (R_i(t) - \alpha(t)), & C_{r,i}(0) &= C_{0,i}, \forall i \\ \frac{d\bar{C}_{p,i}(t)}{dt} &= \frac{q(t)(C_{r,i}(t)(1-R_i(t)) - \bar{C}_{p,i}(t))}{V_p(t)}, & \bar{C}_{p,i}(0) &= 0, \forall i \\ \frac{dV_r(t)}{dt} &= (\alpha(t) - 1)q(t), & V_r(0) &= V_0 \\ \frac{dV_p(t)}{dt} &= q(t), & V_p(0) &= 0 \end{aligned} \quad (\text{Eqs 14})$$

Les équations, sous forme différentielle, dépendent de la rétention des solutés, du débit de perméat, et de la variable α (le rapport entre le débit de perméat et le débit d'eau de diafiltration). L'étalonnage de la membrane ainsi que la modélisation du flux de perméat sont intégrés aux équations du modèle. La stratégie décrite précédemment pour prédire le rendement et l'enrichissement au cours de l'ultrafiltration dans le cas de la concentration ($\alpha = 0$) et de la diafiltration ($\alpha = 1$) reste applicable, et est supposée valable pour tout α . Le rendement et l'enrichissement ne sont plus exprimés en fonction du FRV ou du DV mais en fonction du temps.

II.5.1. Définition du problème d'optimisation

Le problème d'optimisation est défini par un ou plusieurs critères, des variables de décisions et des contraintes.

- Critères à optimiser

Le rendement η_i et l'enrichissement τ_i en peptide cible i dans un des deux compartiments sont les deux critères de performance classiquement suivis lors de l'ultrafiltration d'hydrolysat. De par leur définition, ces deux critères de performance ne sont pas indépendants. Il a été choisi de maximiser l'enrichissement et de fixer un rendement minimal comme contrainte.

L'aspect économique du procédé est pris en compte dans l'optimisation grâce à deux critères : la durée totale du traitement (t_f) et la quantité d'eau de diafiltration (V_{eau}).

- Variables de décision

Pour l'optimisation de l'ultrafiltration, la seule variable de décision considérée est le ratio α , représentant le rapport du débit d'eau ajoutée au rétentat et du débit de perméat. L'optimisation a pour but de définir le profil optimal de α pour optimiser le(s) critère(s) choisi(s).

- Contraintes

Un rendement minimal au temps final de la fraction considérée est fixé comme première contrainte. Le volume de rétentat est borné en tout temps entre 0,025 et 1L, limites du pilote utilisé. Une dernière contrainte concerne la concentration totale en peptides dans le rétentat qui ne doit pas dépasser 70 g.L⁻¹ en tout temps, limite de solubilité du Lactium® déterminée expérimentalement.

- Paramètres fixés

Les conditions opératoires sont fixées de manière à maximiser le débit de perméat (PTM = 3 bar, $C_0 = 10$ g/L et $d_{\text{feed}} = 100$ mL/min). Le volume initial d'hydrolysat est fixé à 0,5 L. La

rétenion des peptides est également fixée et définie par la droite d'étalonnage de la membrane 3 kDa obtenue dans les conditions opératoires décrites.

II.5.2. Méthode de résolution numérique et d'optimisation

La résolution numérique du problème d'optimisation a été réalisée grâce au logiciel gPROMS® de la société Process System Enterprise (Londres, Grande-Bretagne). Le logiciel permet de simuler le procédé d'ultrafiltration en renseignant le système d'équations différentielles du modèle, les conditions initiales et en donnant une valeur à la variable de contrôle α . Une fonctionnalité du logiciel permet ensuite de définir tous les paramètres nécessaires à l'optimisation. La variable de décision α est approximée par des fonctions constantes par morceaux dans 10 intervalles (Control Vector Parametrization – CVP). La taille de chaque intervalle et la durée finale du procédé sont laissés libres. Le critère à optimiser ainsi que les contraintes sont définis. gPROMS® utilise la méthode des sensibilités pour calculer le gradient du critère et des contraintes par rapport à la variable de décision et résoudre le problème d'optimisation. Une approximation du front de Pareto, qui représente l'ensemble des solutions optimales non dominées est déterminée par la méthode epsilon-contrainte (définie partie I, § I.4.4.2).

II.5.3. Outils d'aide à la décision

Pour choisir la meilleure des solutions optimales du Pareto, l'ensemble des solutions sont classées en utilisant la théorie de MAUT. Les fonctions d'utilités individuelles normées pour chaque critère considéré sont calculées comme suit (Benyahia, 2009) :

$$k_i(x) = \left(\frac{g_{max} - g_i(x)}{g_{max} - g_{min}} \right)^{\gamma_i} \quad (\text{Eq. 53})$$

γ_i représente la tolérance relative vis-à-vis de l'optimum du critère considéré et est défini individuellement pour chaque critère. Si γ_i est inférieur à 1, la tolérance du critère considéré par rapport à son optimum individuel est grande. Cela signifie que le fait de s'écarter de l'optimum individuel n'a pas d'impact sur les performances de la solution car la valeur de la fonction d'utilité individuelle reste au voisinage de la valeur maximale (Benyahia, 2009). A l'inverse, un γ_i supérieur à 1 signifie que la tolérance vis-à-vis de l'optimum d'un critère sera faible.

La fonction d'utilité multi-attribut est calculée par la somme pondérale des fonctions d'utilités individuelles :

$$U(x) = \sum_i w_i h_i \quad (\text{Eq. 54})$$

Les coefficients de pondération w_i sont simplement fixés par le décideur.

II.6. Les méthodes analytiques

II.6.1. Détermination de la répartition de masses molaires des hydrolysats et des fractions par chromatographie d'exclusion stérique (CES)

La répartition des masses molaires des hydrolysats et des fractions d'ultrafiltration obtenues est caractérisée par chromatographie d'exclusion stérique. 50 μL d'échantillon sont injectés dans une colonne Superdex Peptide HR 10 / 300 (GE Healthcare, Royaume-Uni) connectée à un système Shimadzu LC20 (Shimadzu Corporation, Japon). La colonne est thermostatée à 35 °C. La phase mobile est constituée d'un mélange eau / acétonitrile (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium) avec un rapport 70 / 30 (v / v) avec 0,1 % (v / v) d'acide trifluoroacétique (Thermo Fisher Scientific). Le débit d'élution isocratique est de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le signal UV à 214 nm est mesuré dans une cellule avec un chemin optique de 1 cm. Les échantillons sont filtrés sur un filtre seringue de 0,22 μm avant l'analyse et sont dilués pour obtenir une concentration comprise entre 0,2 et 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La colonne d'analyse est calibrée en analysant 45 peptides de synthèse (GeneCust, Dudelange, Luxembourg) allant de 220 à 1890 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La droite d'étalonnage obtenue relie une masse molaire x à un temps d'élution (TE) :

$$MM_x = 10^{-0,082 \times TE_x + 5,382} \quad (\text{Eq 55})$$

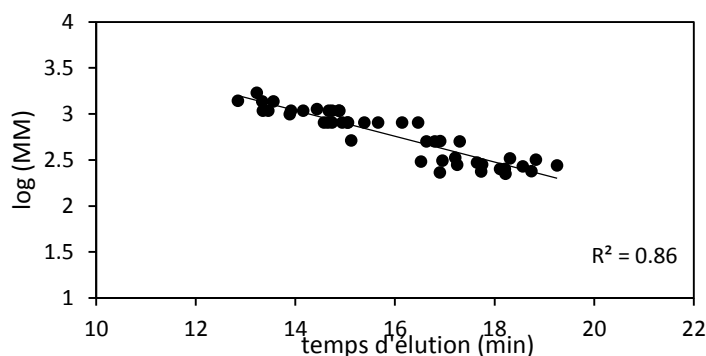


Figure 15. Etalonnage de la colonne Superdex Peptide (élution isocratique à 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ avec eau / acétonitrile 70 / 30 (v/v) avec 0,1 % (v/v) de TFA), avec 45 peptides de synthèse.

II.6.2. Détermination de $\overline{C}_{p,i}/C_{0,i}$ et $C_{r,i}/C_{0,i}$ d'une classe de masse molaire i par CES

Les calculs des rendements et des enrichissements expérimentaux d'une masse molaire i de l'hydrolysate au cours du fractionnement nécessitent de déterminer les concentrations relatives $\overline{C}_{p,i}/C_{0,i}$ et $C_{r,i}/C_{0,i}$. La masse molaire considérée est reliée à un temps d'élution en CES par la

droite de calibration (Eq 55). Les concentrations relatives sont calculées comme le rapport de l'absorbance au temps d'élution considéré dans le chromatogramme du perméat ou du rétentat sur l'absorbance dans le chromatogramme de l'hydrolysats initial (au même temps d'élution).

II.6.3. Détermination de $\overline{C_{p,i}}/C_{0,i}$ et $C_{r,i}/C_{0,i}$ d'un peptide cible i par chromatographie phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-PI-SM)

Les hydrolysats et les fractions d'ultrafiltration sont analysés par chromatographie liquide haute performance de phase inverse couplée à un spectromètre de masse. 10 μ L d'échantillon sont injectés dans une colonne C18 Prospher (2.1 mm x 250 mm, diamètre de billes 5 μ m, Alltech, France) connecté à un système Shimadzu LC20 (Shimadzu Corporation, Japon). La colonne est maintenue à 35 °C. L'élution est réalisée à 0,2 mL.min⁻¹. Un gradient de solvant A (eau / acétonitrile ratio 95 % / 5 % (w / w) avec 0,1 % de TFA (v / v)) et de solvant B (eau / acétonitrile ratio 5 % / 95 % (w / w) avec 0,1 % de TFA (v / v)) est utilisé. La colonne est conditionnée dans 100 % de solvant A. Un premier gradient est appliqué pour atteindre un rapport de 72 % A / 28 % B en 50 minutes. Un second gradient permet d'atteindre un ratio de 52 % de A / 48 % B en 20 minutes. La colonne est ensuite rincée avec 100 % de solvant V pendant 10 minutes et rééquilibré dans le solvant A pendant 15 minutes. Un débit constant d'éluant est fixé à 0,2 mL.min⁻¹. Le signal UV à 214 nm est mesuré dans une cellule avec un chemin optique de 1 cm. L'éluant en sortie de colonne est analysé par un spectromètre de masse quadripolaire à ionisation électrospray (Shimadzu Corporation, Japon). La température de la chambre d'ionisation est fixée à 200 °C, la tension du spray à 4,5 kV, le débit de gaz à 15 L.min⁻¹. En mode « total ion count » (TIC), les masses entre 50 et 2000 m/z sont scannées à une vitesse de 2143 mass units. s⁻¹. Le mode « selected-ion monitoring » (SIM) est également utilisé lorsqu'un peptide de masse connue est ciblé.

Pour un peptide cible, sa concentration relative dans les compartiments d'ultrafiltration ($\overline{C_{p,i}}/C_{0,i}$ et $C_{r,i}/C_{0,i}$) est calculé par le rapport des aires obtenues en intégrant les pics de masse en mode SIM.

L'indice d'hydrophobie (iH) des peptides ciblés a été déterminé comme décrit par Schweizer *et al.* (2007). La colonne C18 a été calibrée avec 48 peptides standards avec une séquence d'acides aminés connue. L'iH de chaque acide amine a été optimisé pour obtenir une corrélation linéaire ($R^2 = 0,93$) entre la durée d'élution des peptides et leur iH (somme des iH de chaque acide aminé). Les valeurs d'iH s'étendent de 10 à 65. L'iH des peptides ciblés dans le Lactium® a été calculé à partir de leur temps d'élution en CLHP – PI et de l'étalonnage de la colonne.

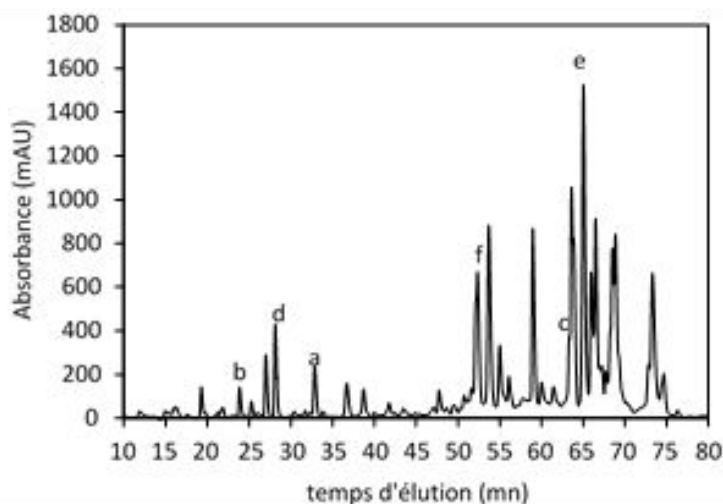


Figure 16. CLHP en phase inverse du Lactium® (colonne C18 Prospher, élution à 0,2 mL.min⁻¹ avec gradients eau/acétonitrile (0,1 % TFA) et peptides ciblés a (MM = 780 g.mol⁻¹), b (MM = 873 g.mol⁻¹), c (MM = 1267 g.mol⁻¹), d (MM = 1336 g.mol⁻¹), e (MM = 1383 g.mol⁻¹), f (MM = 1761 g.mol⁻¹).

II.6.4. Détermination de la concentration globale en peptides des hydrolysats et des fractions

Une méthodologie a été développée pour quantifier les mélanges peptidiques complexes à partir d'une analyse en chromatographie d'exclusion stérique. La quantification des peptides dans les fractions de procédé de séparation comme l'ultrafiltration permet en effet de caractériser les performances du fractionnement, et notamment de calculer les puretés / enrichissements. Si cette méthodologie est présentée dans la publication qui suit comme une alternative efficace aux dosages classiques, elle a également été développée en support de la stratégie de modélisation de l'ultrafiltration. En effet, elle peut être appliquée sur les profils d'exclusion stérique prédits.

II.6.4.1. Article publié dans Journal of Chromatography B

Size-exclusion HPLC as a sensitive and calibrationless method for complex peptide mixtures quantification

Journal of Chromatography B, 1006 (2015) 71–79

Alice Bodin, Xavier Framboisier, Dominique Alonso, Ivan Marc, Romain Kapel

➤ **Abstract**

This work describes an original methodology to quantify complex peptide mixtures by size-exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC). The methodology was first tested on simulated elutions of peptide mixtures. For this set of experiments, a good estimation of the total peptide concentration was observed (error less than 10 %). Then 30 fractions obtained by ultrafiltration of hydrolysates from two different sources were titrated by Kjeldahl or BCA analysis and analysed by SE-HPLC for an experimental validation of the methodology. Very good matches between methods were obtained. The linear working range depends on the hydrolysate but is generally between 0.2 and 4 g.L⁻¹ (i.e. between 10 and 200 µg). Moreover, the presence of organic solvents or salts in samples does not impact the accuracy of the methodology contrary to common quantification methods. Hence, the findings of this study show that total concentration of complex peptide mixture can be efficiently determined by the proposed methodology using simple SE-HPLC analysis.

➤ **Introduction**

Protein hydrolysates are complex peptide mixtures obtained by enzymatic proteolysis of proteins from various vegetable or animal agro-resources (e.g., soy, wheat, rapeseed (Cavazos and Gonzalez de Mejia, 2013; He *et al.*, 2013; Tomatsu *et al.*, 2013), milk or fish (Korhonen, 2009; Vandanjon *et al.*, 2009)). Their main applications are in different fields of human nutrition (clinical, sport or regular nutrition (Clemente, 2000), (Manninen, 2009)) or as ingredient for food product texturations due to their functional properties (such as emulsifying, foaming (Neklyudov *et al.*, 2000; Popineau *et al.*, 2002)). Besides, hydrolysates may contain biologically active peptide like antioxidative (Alashi *et al.*, 2013), opioid (Kong *et al.*, 2008), antihypertensive (Kapel *et al.*, 2006) or antimicrobial peptides (Benkerroum, 2010) that enlarge their potential of use in other high added-values industrial areas like nutraceuticals, food security or cell culture medias. Their functional properties or bioactivities are often improved by enriching mixtures in targeted peptides (Korhonen and Pihlanto, 2006; Bazinet and Firdaous, 2009; Firdaous *et al.*, 2009) or peptide fractions (Ruíz-Henestrosa *et al.*, 2009) by membrane filtration or chromatography (Korhonen and Pihlanto, 2006; Bazinet and Firdaous, 2009; Firdaous *et al.*, 2009; Ruíz-Henestrosa *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013; Kapel *et al.*, 2011).

The total quantification of hydrolysates or fractions are achieved either by Kjeldahl method (nitrogen quantification) or by spectrophotometric assays. Kjeldahl analysis consists in a mineralization of organic nitrogen into ammonia, titrated by an acid (Sáez-Plaza *et al.*, 2013). This procedure is time-consuming and requires relatively large amount of peptide fraction sample (between 0.2 and 5 g according to the sample concentration, nitrogen/proteins

converting factor and apparatus sensitivity (Persson *et al.*, 2008)). Furthermore, this method cannot be used directly when the sample contains acetonitrile (due to the large input of nitrogen) which is classically used in separation processes based on hydrophobic interactions. Spectrophotometric methods are based on the formation of colored complexes coming from reagent reactions and peptide properties (like Lowry assay or bicinchoninic acid (BCA) assay ((Amado *et al.*, 2013; Kapel *et al.*, 2006; Metsämuuronen and Nyström, 2009; Silvestre, 1997)). These methods are faster than Kjeldahl analysis, and require low sample amounts. However, the accuracy of the assay strongly depends on the calibration of the system. Unfortunately, the calibration (often realized with the initial hydrolysate) may introduce a bias for a peptide fraction quantification because of a modification of peptide composition or environment (salts, solvents, etc.).

Peptides are well known to possess intrinsic UV absorbance properties classically monitored at 214 nm. This property results in a complex contribution of peptide bonds and amino acid lateral chains (each one being able to have a varied contribution). Recently, it has been shown that the molar extinction coefficient at 214 nm ($\epsilon_{214\text{nm}}$) of a peptide can be precisely calculated on the basis of its amount of peptide bond and its peptide composition (Kuipers and Gruppen, 2007). This allows quantifying a pure peptide of known aminoacid composition by using the Beer-Lambert law but not a complex peptide mixture.

Hydrolysates or peptide fractions are systematically analyzed by size exclusion high-performance liquid chromatography (SE-HPLC) in order to assess their peptide molecular weight distribution of the mixture (Bourseau *et al.*, 2009; Johns *et al.*, 2011; Neklyudov *et al.*, 2000; Silvestre, 1997; Wang *et al.*, 2013). The aim of this work is, first, to propose an original methodology that uses SE-HPLC for fast and accurate total peptide quantification that does not necessitate calibration for each type of protein hydrolysate. The methodology was tested on simulated chromatograms of peptide mixtures in order to evaluate its applicability on controlled peptide molecular weight distributions and compositions. Then, accuracy, repeatability and linearity of the methodology were investigated using two different protein hydrolysates. In a third part, the quantification of 30 actual different ultrafiltration fractions obtained from the methodology, Kjeldahl analysis and BCA assay were compared. Eventually, the influence on the SE-HPLC assay of the potential chemical environment (organic solvent and salt) related to hydrolysate preparation techniques was investigated.

➤ **Methodology**

Theoretically, it is possible to calculate the concentration of a peptide mixture from SE-HPLC analysis by applying the Beer-Lambert law to each point 'x' of the chromatogram (in order to

convert absorbances into concentrations) and to integrate the overall concentration signal. To do so, equation 1 can be used:

$$C_{sample} = \frac{1}{V_{inj}} \int \frac{A_x}{\varepsilon_x l} dV \quad (\text{Eq. 56})$$

A_x and ε_x standing for the absorbance and the molar extinction coefficient for each point 'x' of the chromatogram, dV a fraction of the elution volume and V_{inj} the injection volume.

The difficulty lies on assigning a proper molar extinction coefficient to every chromatogram point. For pure peptides, Kuipers and Gruppen (2007) have demonstrated that the molar extinction coefficient at 214 nm can be calculated using equation 57:

$$\varepsilon_{pure\ peptide} = (n_{aminoacid} - 1) \varepsilon_{bond} + \sum_{i=1}^{20} (\varepsilon_{aa,i} \times n_{aminoacid,i}) \quad (\text{Eq. 57})$$

Equation 57 can be rearranged as in equation 58:

$$\varepsilon_{pure\ peptide} = (n_{aminoacid} - 1) \varepsilon_{bond} + \overline{\varepsilon_{aa}} \times n_{aminoacid} \quad (\text{Eq. 58})$$

With ε_{bond} , the molar extinction coefficient of peptide bond, $n_{aminoacid}$, the total number of the amino acid in the peptide and $\overline{\varepsilon_{aa}}$, the mean molar extinction coefficient by amino acid calculated from the peptide sequence.

SE-HPLC separation is based on solute steric hindrances and is not resolutive enough to separate the peptides from a complex mixture one from others. So each point 'x' of the chromatogram represents the UV signal of a peptide mixture with close molar mass. We assumed that 'x' is a mixture of peptides having a mean molar mass (MM_x) that can be determined by the column calibration which is classically under the form of equation 59:

$$MM_x = 10^{a \times V_x + b} \quad (\text{Eq. 59})$$

With V_x , the elution volume of the point 'x', a and b the coefficients of the calibration curve.

It comes, that the number of amino acids to be used in equation 58 can be calculated by equation 60:

$$n_{aminoacid} = \frac{MM_x}{\overline{MM_{aa}}} \quad (\text{Eq. 60})$$

With $\overline{MM_{aa}}$, the mean amino acid molar mass of the hydrolysate.

Other physico-chemical properties (charge, hydrophilicity...) does not modify SE-HPLC separation much. So we also hypothesized that aminoacid compositions of peptide mixture 'x' and hydrolysate is the same. As a consequence, $\overline{MM_{aa}}$ and $\overline{\varepsilon_{aa}}$ in 'x' should not differ from the

hydrolysate. Thus, hydrolysate aminogram (or the aminogram of the protein hydrolyzed) can be used to calculate \overline{MM}_{aa} and $\overline{\epsilon}_{aa}$ by applying equations 61 and 62 respectively:

$$\overline{MM}_{aa} = \sum_{i=1}^{20} w_i \times MM_i \quad (\text{Eq. 61})$$

MM_i and w_i standing for the molar mass and the mass ratio of amino acid i in the hydrolysate aminogram respectively.

$$\overline{\epsilon}_{aa} = \sum_{i=1}^{20} x_i \times \epsilon_{aminoacid,i} \quad (\text{Eq. 62})$$

With $\epsilon_{aminoacid,i}$, the molar extinction coefficient of amino acid i and x_i , the molar ratio of amino acid i in the hydrolysate aminogram.

Taking as a whole, the molar extinction coefficient to apply in equation 56 is calculated as follows for each point x :

$$\epsilon_x = \epsilon_{bond} \times \left(\frac{10^{a \times V_x + b}}{\overline{MM}_{aa}} - 1 \right) + \overline{\epsilon}_{aa} \times \frac{10^{a \times V_x + b}}{\overline{MM}_{aa}} \quad (\text{Eq. 63})$$

The overall methodology for the quantification of peptide mixture concentration on the basis of its SE-HPLC chromatogram is summarized in Figure 17.

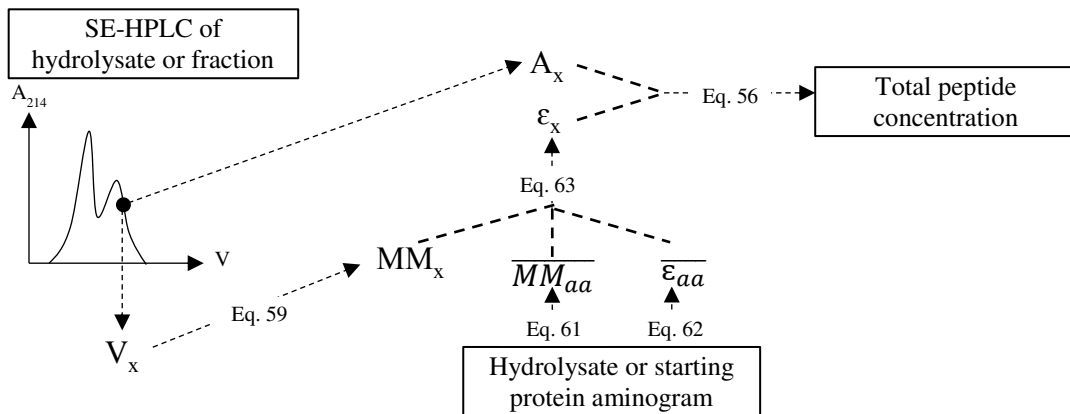


Figure 17. Diagram of the global methodology for the quantification of total peptide concentration of complex peptide mixtures. The methodology is only based on SE-HPLC and aminogram analysis of mixtures.

➤ Material and methods

○ Material

Sodium hydroxide pellets and sodium chloride were supplied by Carlo Erba Reactifs (Val de Reuil, France). HPLC grade eluents (water and acetonitrile) were both purchased from Fisher Scientific (Geel, Belgium). Trifluoroacetic acid was obtained from Arcos Organics (Geel, Belgium). For Kjeldahl analysis, sulfuric acid and chloridric acid was obtained from Carlo Erba Reactifs, ammoniac and hydrogen peroxide from Fisher Scientific. The reagents for the BCA test came from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). Synthetic peptides used for the column calibration were obtained (GeneCust, Dudelange, Luxembourg).

○ Size exclusion chromatography analysis

Samples (hydrolysates and ultrafiltration fractions) were analyzed by SE-HPLC using a Superdex peptide HR 10/300 column (10 mm x 300 mm, GE Healthcare) connected to a Shimadzu model LC20 system (Shimadzu Corporation, Japan). 50µL of sample were injected onto the column kept at 35°C. The mobile phase consisted in water and acetonitrile in a 70/30 proportion (v/v) with 0.1 % TFA (v/v). Samples were eluted at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹. UV signal was measured at 214 nm using a cell with an optical path of 1 cm. Hydrolysate and UF fraction concentrations were between 0.2 and 2 g.L⁻¹. Hydrolysates were also prepared between 0.25 and 20 g.L⁻¹ to determinate the linear working range of the methodology. Each sample was filtered through 0.22 µm filter prior analysis. Chromatograms were exported in Excel spreadsheets to apply the methodology of quantification.

The column was calibrated with 45 synthesized peptides from 220 to 1890 g.mol⁻¹ eluted in the same conditions. The equation calibration was obtained by linear regression:

$$MM_x = 10^{-0.164 \times V_x + 5.382} \quad (\text{Eq. 64})$$

The correlation coefficient (r^2) was 0.86.

○ Simulation of peptide mixtures chromatogram

The methodology was tested with chromatograms of mixtures composed of 15 peptides obtained by simulation. The simulation was based on the use of Gaussian equation (equation 65) to calculate each peptide peak of the mixture:

$$A = C_{max} \varepsilon l \exp\left(-\frac{(V - V_{max})^2}{2 \sigma^2}\right) \quad (\text{Eq. 65})$$

With A the absorbance at an elution volume V , C_{max} , the concentration at the peak maximum, σ^2 , the variance of the peak, l , the optical path, ϵ , the peptide molar extinction coefficient and V_{max} , the elution volume of the peptide.

V_{max} was calculated from the peptide molar mass using the column calibration (Eq 64). ϵ was calculated on the basis of the peptide sequence using equation 57. A peak variance and a ratio C_{max}/C_{sample} of 0.055 mL and 0.086 respectively were taken for each peptide peak calculations. These values were obtained from regression with 8 experimental peptide peaks (data not shown). The absorbance signals of each peptide of a mixture were added up to get the simulated mixture chromatogram. The global chromatogram simulation procedure is presented in Figure 18.

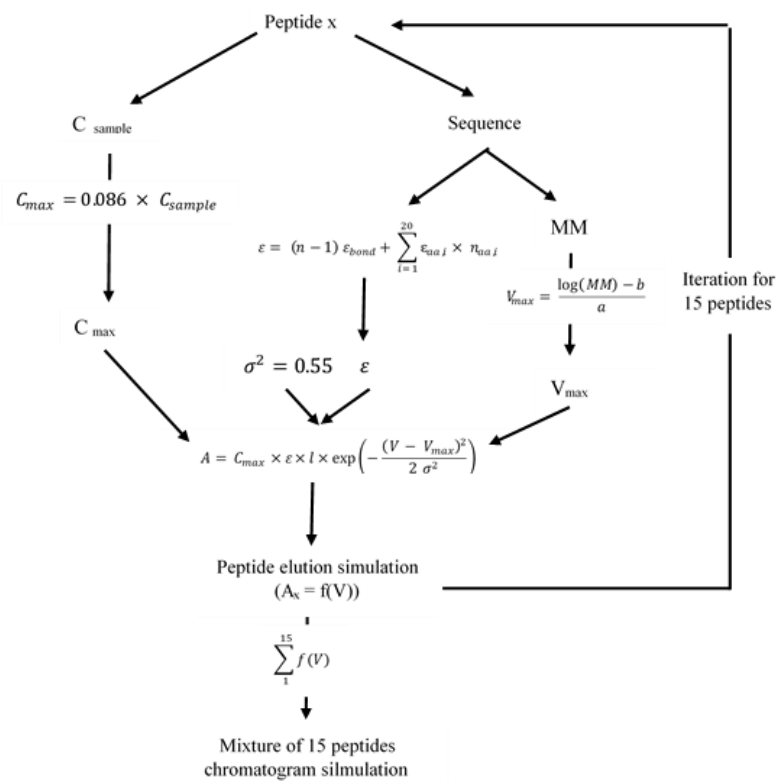


Figure 18. Methodology of generation of peptide mixture chromatogram ($A = f(V)$)

- Peptide fractions preparation

The methodology was validated with actual peptide fractions obtained by ultrafiltration of hydrolysates from two protein sources (α S1-casein and alfalfa white proteins). The hydrolysate of α S1-casein (Lactium®) was supplied by Ingredia S.A (Arras, France). The second one (alfalfa white proteins hydrolysate (AWPH)) was produced as described by Prevot-D'Alvise *et al.* (Prevot-D'Alvise *et al.*, 2004). The mean amino-acid molar mass \overline{MM}_{aa} and molar extinction

coefficient $\overline{\varepsilon_{aa}}$ calculated from their aminograms (data not shown) using equation 61 and 62 were 112 g.mol⁻¹ and 1188 L.mol⁻¹.cm⁻¹, and 115 g.mol⁻¹ and 987 L.mol⁻¹.cm⁻¹ for AWPB and Lactium®, respectively.

These hydrolysates were ultrafiltered with regenerated cellulose 88 cm² membranes (1 kDa and 3 kDa MWCO for AWPB and Lactium® respectively) using a Cogent µScale TFF system (Millipore, Billerica, USA). Ultrafiltrations were carried out at 0.3 MPa of transmembrane pressure, at 20°C and at a retentate flow rate of 100 mL.min⁻¹. Samples were taken in the retentate and permeate compartment at volume reduction factors of 1.19, 1.47, 1.92, 2.78 and 5. Every sample was quantified by SE-HPLC and BCA or Kjeldahl method for comparison. SE-HPLC quantification of these fractions were achieved using the mean aminoacid molar extinction and molar mass of hydrolysates.

- BCA analysis

Samples (25 µL) were mixed with 200 µL of the reagent and incubated at 37 °C for 30 min followed by cooling at room temperature. The absorbance at 562 nm was measured on a microplate reader (Thermo Scientific, Waltham, USA). Concentrations were calculated using a calibration curve established with the initial hydrolysate of interest as standard.

- Kjeldahl analysis

Samples (1 mL) were mineralized with 4 mL of H₂SO₄ and 1 mL of H₂O₂ at 400 °C for 150 minutes. The whole organic nitrogen was converted into ammonium salts themselves converted into ammoniac by adding alkali. Then ammoniac was distilled and titrated by HCl 0.5 M. Kjeldahl analysis were only performed for alfalfa white protein hydrolysate fractions. A nitrogen-to-protein conversion factor of 6.25 was applied to get the peptide concentration of this type of hydrolysate.

➤ Results and discussion

- Application of the methodology to simulated chromatogram

The SE-HPLC elution of 12 mixtures containing 15 peptides of different size and compositions were simulated. The ratio of aromatic amino acids and histidine was studied because of the very high molar extinction coefficients of these amino acids (29050, 5375, 5200 and 5125 L.mol⁻¹.cm⁻¹ for tryptophan, tyrosine, phenylalanine and histidine respectively) compared to the other (inferior to 1000 L.mol⁻¹.cm⁻¹) that could bias the methodology. The strategy of total peptide quantification was applied for each mixture on the simulated absorbance chromatogram and the result was compared with the real peptide concentration.

Table 3 displays the sequence of peptides, the ratio of aromatic amino acids, \overline{MM}_{aa} , $\overline{\epsilon}_{aa}$ and the concentration of chosen peptide mixtures for the simulation. The concentration estimated by the methodology and the relative error are also presented. Relative errors range from -5.7 % to 6.5 % which demonstrates that the proposed strategy enables to estimate the total peptide concentration of the twelve simulated mixtures accurately. The increase of aromatic amino acids and histidine ratio does not reduce the precision of the estimation of the overall peptide concentration.

Figure 19 shows the actual and calculated concentration in the course of the theoretical elution of mixtures in order to investigate local biases in the methodology and to check whether it can be used for improving the evaluation of molar mass repartition. From these data, it is apparent that concentration profiles calculated by the methodology for mixtures without aromatic amino acids and histidine (mixture 1, 2 and 3) are very close to the real profile. The theoretical molar extinction coefficients along profile is correctly determinate for these mixtures. However, the increase of the ratio of aromatic amino acid and histidine induces local biases along concentration profiles. This observation is explained by the use of a mean amino-acid molar extinction coefficient of the mixture to estimate the molar extinction coefficient of a point of the chromatogram. Indeed aromatic amino acids and histidine have higher molar extinction coefficients than other amino acids. Consequently, the presence of these amino acids greatly increases the mean amino-acid molar extinction coefficient of the overall mixture. However, some peptides inside the mixture do not contain these amino acids. Then, the concentration of a peptide without aromatic amino acid and histidine is underestimated by the methodology and the concentration of a peptide containing these amino acids is overestimated.

As a consequence, the local errors due to biases explained by high or low molar extinction coefficient peptides are compensated when the overall signal is integrated. The SE-HPLC methodology gives an accurate total quantification of the mixture concentration but cannot be used for improving the evaluation of the peptide molar mass distribution.

Table 3. Characteristics of simulated peptide mixtures. Comparison between real total peptide concentration

| Mixture | Sequences | % aromatic amino acids | \overline{MM}_{aa} (g.mol ⁻¹) | $\overline{\epsilon}_{aa}$ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹) | Total peptide concentration (g.L ⁻¹) | Estimated peptide concentration (g.L ⁻¹) | Relative error (%) |
|---------|--|---------------------------------|--|--|--|---|--------------------------|
| 1 | ACNS, TPR, IKLSNV, TRVKLLNAMP, QNILD, PRIISQCVV, PAI, ASALIVS, IALR, IATT, CRL, LIIA, KTV, IAAAN, MPC | 0 | 106 | 84 | 0.604 | 0.619 | 2.3 |
| 2 | GRVANSCTE, QDPMA, TL, IILK, PNSAT, MAKLIIMVT, IKSCNQ, EESPL, AV, MNS, TLAJ, TD, AIK, VTMPQLL, NILRKQTV | 0 | 107 | 131 | 0.627 | 0.631 | 0.6 |
| 3 | APLKASLL, VVTDLSPGGS, PIAA, IT, TLGSMVQDIIPA, KCSQ, GGV, AM, ASGIID, NTLI, KRGVEDCNLIR, LPRA, TD, PILT, VSQ | 0 | 102 | 71 | 0.624 | 0.650 | 3.9 |
| 4 | KMA, RQIPASDGTS, RSMS, KLLAMKIMTQC, ADILMEE, NC, VNQEHLKALA, QDKGHA, PAL, AC, TPEA, VNG, KIESRP, AGTSADE, VLI | 2 | 106.5 | 246 | 0.666 | 0.672 | 0.9 |
| 5 | APTNVSTI, LIREDSKLVSC, PAVVGEQIL, PGLG, AGISLKK, PLKQ, TPMYVLAL, AAIL, MSK, KNGGEAMCG, QIKA, SQEDVTENS, VSGVVWTNQAIR, PA, NMP | 2 | 106 | 457 | 0.798 | 0.801 | 1 |
| 6 | APER, NC, GILW, QDKI, GGA, PQ, DTIIRTVS, VI, KI, VETN, QN, SSG, ILRK, AL, IT | 2 | 110 | 598 | 0.419 | 0.434 | 3.4 |
| 7 | MAKLA, RQPIPAWDGTS, RSMS, KLAMKIMTQCAPS, ADILMEEILLA, NCTAVLTG, NQEHKAPS, QDKGHA, PYL, AC, TP, VNG, ESRP, EGTSAPVTREV, PIANATCGDK | 4 | 104 | 577 | 0.812 | 0.787 | -3 |
| 8 | API, LCVQSRKT, PENMFICSMQD, TLI, AS, LA, SVTE, DH, LKAPR, RVA, AVSCNLINE, ARKI, VIPCEWIIQAP, TEISN, ILKSTV | 4 | 109 | 612 | 0.655 | 0.637 | -2.8 |
| 9 | LIPA, VCSTIIL, LMATNQNRG, AMLTGRK, VNCTTQED, AIR, SGY, VK, TMLLRHEQNDG, LKMSRCNCP, NQUESTT, LCSG, GATMIYP, CTM, LIRKFSCVG | 4 | 112 | 321 | 0.809 | 0.865 | 6.5 |
| 10 | MW, PA, SAG, LIC, VRAK, LGPT, QSP, GAV, DWQGTLP, EPYLTIG, RPIP, PVGDMLHAMCS, AGSPEVKD, GNPPDGSVIGL, ALK | 6 | 104 | 1125 | 0.590 | 0.593 | -5.7 |
| 11 | SAMCG, LW, VQDIRSTKN, MYNSELIAVPP, QA, KSGQDWV, PSFQ, VCD, NSMNA, PM, ANLEQTTEQSM, PVNCIRK, PHMIL, LVD, CS | 6 | 110 | 1164 | 0.671 | 0.665 | -1 |
| 12 | TVCM, PALLFIT, NKEEILVSQ, ASA, MLPRE, ICS, GGMPH, TQL, EIK, KVTQDLGE, CHY, AKLRDRGLK, ITECSEWSPV, KLRG, NQEMQVK | 6 | 111 | 695 | 0.722 | 0.715 | -0.9 |

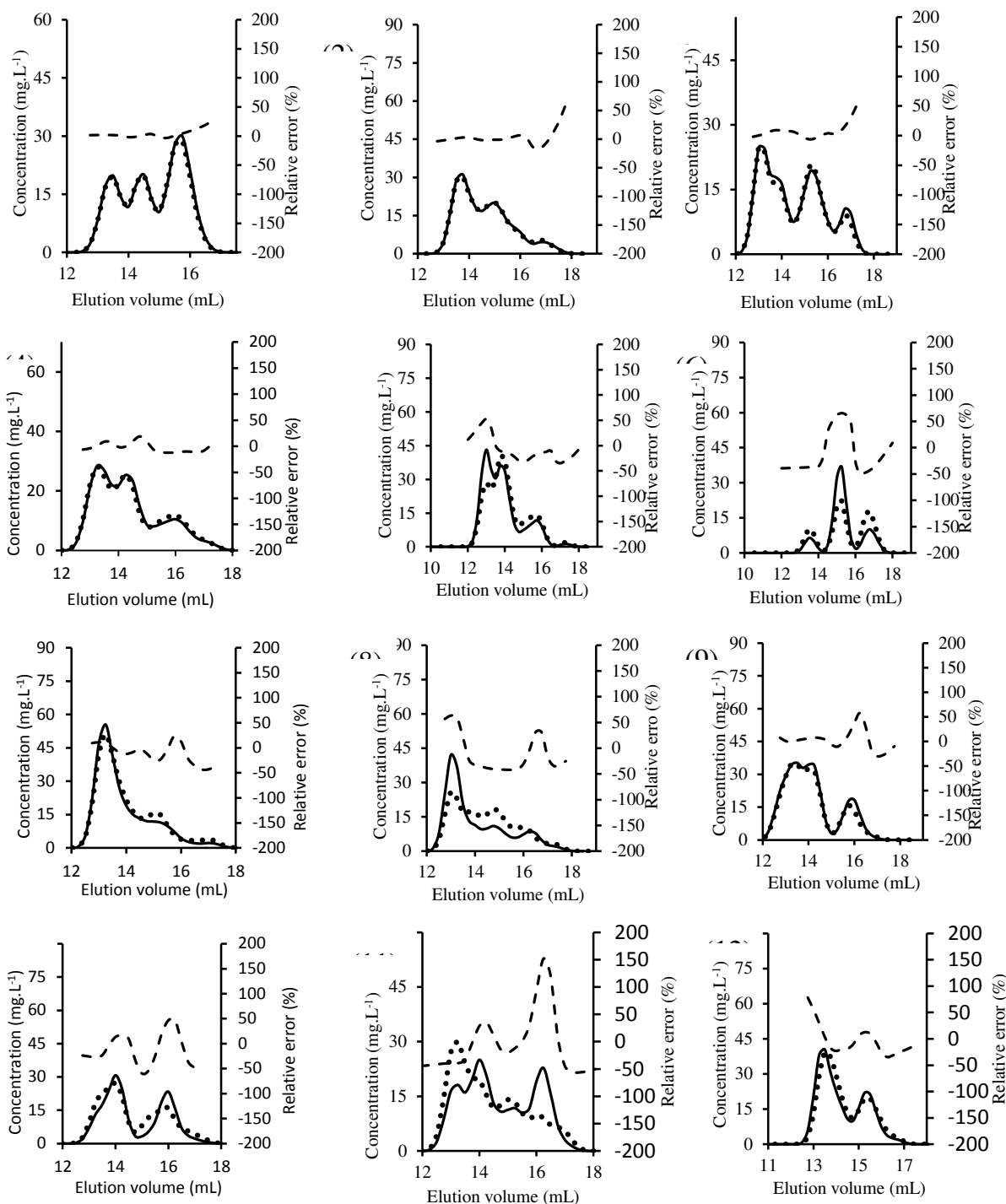


Figure 19. Simulated elution of mixtures with 0 % (1, 2, 3), 2 % (4, 5, 6), 4 % (7, 8, 9) and 6 % (10, 11, 12) of aromatic amino acids and histidine. Real concentration (Dotted line), estimated concentration (solid line) and the relative error (dashed line) are represented. See Table 3 for composition of mixtures.

- Experimental validation with complex hydrolysates and fractions
 - Accuracy, repeatability and linearity of the SE-HPLC assay

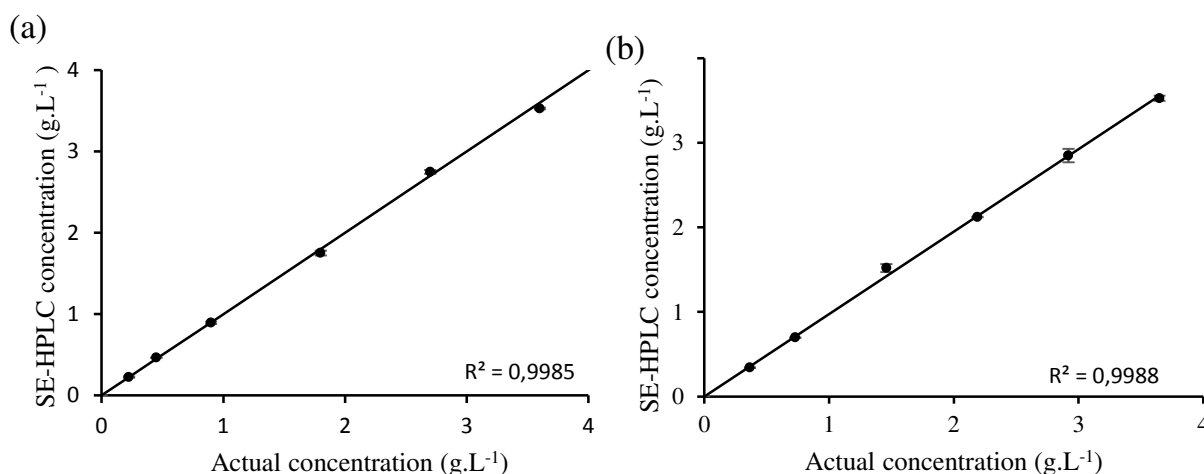
Two different complex hydrolysates (alfalfa white proteins hydrolysate, AWPB and an industrial caseins hydrolysate, Lactium®) were prepared at different concentrations and assayed using the SE-HPLC method (Table 4). Mean amino acid extinction coefficient and molar mass taken for calculations were determined from hydrolysate aminograms.

Table 4. Comparison between actual concentrations and concentrations obtained by SE-HPLC methodology for alfalfa white proteins hydrolysate and Lactium®.

| | Actual concentration (g.L ⁻¹) | Mean SE-HPLC assay concentration (g.L ⁻¹) | Standard deviation (%) | Relative error between actual and SE-HPLC concentrations (%) |
|------------------------------------|---|---|------------------------|--|
| Alfalfa white proteins hydrolysate | 0.225 | 0.225 | 4 | 0 |
| | 0.45 | 0.464 | 0 | 3 |
| | 0.9 | 0.891 | 2 | -1 |
| | 1.8 | 1.75 | 2 | -3 |
| | 2.7 | 2.748 | 1 | 2 |
| | 3.6 | 3.529 | 0 | -2 |
| | 4.5 | 4.413 | 0 | -2 |
| | 5.4 | 5.152 | 2 | -5 |
| | 7.2 | 6.735 | 4 | -6 |
| | 9 | 8.133 | 1 | -10 |
| | 10.8 | 9.434 | 2 | -13 |
| | 13.5 | 11.737 | 1 | -13 |
| 18 | 14.39 | 3 | -20 | |
| Lactium® | 0.365 | 0.341 | 5 | -6 |
| | 0.73 | 0.696 | 2 | -5 |
| | 1.46 | 1.518 | 4 | 4 |
| | 2.19 | 2.12 | 0 | -3 |
| | 2.92 | 2.848 | 3 | -2 |
| | 3.65 | 3.525 | 1 | -3 |
| | 4.38 | 3.932 | 7 | -10 |
| | 5.84 | 4.895 | 2 | -16 |
| | 7.3 | 6.049 | 1 | -17 |
| | 8.76 | 6.522 | 2 | -26 |
| | 10.95 | 8.604 | 4 | -21 |
| | 14.6 | 10.766 | 2 | -26 |

Table 4 indicates a very low standard deviation (5 % or less, except for Lactium® at 4.38 g.L⁻¹) whatever the concentration and mixture, that underlines a good repeatability of the SE-HPLC assay. The relative errors between actual and SE-HPLC concentrations are less than 5 % (except for Lactium® at 0.365 g.L⁻¹) up to around 4.50 and 3.65 g.L⁻¹ for AWPB and Lactium® respectively. At higher concentrations, SE-HPLC assay tends to underestimate hydrolysate concentrations and the underestimation worsens when concentration increases. At these high concentrations, SE-HPLC chromatograms had portion of signal reaching an absorbance higher than 1.5 AU that corresponds to the linearity threshold of the UV detector. The difference in limit concentration with the two different hydrolysates is due in particular to the repartition of peptide molar mass and high extinction coefficient peptide (rich in aromatic aminoacids or histidine).

Figure 20 shows SE-HPLC assay linearity in the valid concentration range (0.2 to 4 g.L⁻¹) with AWPB and Lactium®, respectively. The excellent correlation coefficients of linear regressions (R^2 higher than 0.99) confirms the sensitivity and accuracy of the method for assaying peptide mixture in the valid concentration range. This concentration range is rather large compared to classical colorimetric assay (like the reference bicinchinonic assay, BCA) which is claimed to be linear up to 2 g.L⁻¹). Furthermore, the valid concentration range corresponds to 10 µg to 200 µg of peptides which is five to 10 times less than what is required for Kjeldahl analysis (which is another reference analysis method for proteins and hydrolysates



quantification).

Figure 20. Total peptide concentration measured by the SE-HPLC methodology versus the actual concentration of alfalfa white proteins hydrolysate (a) and Lactium® (b) in the valid concentration range of the methodology (from 0.2 to 4 g.L⁻¹). Experiments were carried out in triplicate. Means, standard deviations and R^2 are displayed.

Besides, this method does not use any calibration (except for the SE-column calibration (MM vs elution volume) that does not need to be done each run). The only requirement is to know the aminogram of the hydrolysate (or the starting protein) in order to calculate the mean aminoacid molar mass and extinction coefficient values to be used in equation 63.

- Comparison of SE-HPLC assay with reference methods

Thirty different peptide fractions obtained by two ultrafiltrations of AWPB and one ultrafiltration of Lactium® were quantified by the SE-HPLC assay, BCA assay and Kjeldahl (as reference methods) for comparison. Samples were taken in permeate and retentate at different volume reducing factors (1.19, 1.47, 1.92, 2.78 and 5). Samples were diluted to have concentrations under 4 g.L⁻¹. Figure 21 (a and b) displays the chromatograms of initial hydrolysates and some UF fractions (multiplied by the dilution factor). SE-HPLC assay was applied using the mean molar mass and extinction coefficient of the starting hydrolysates.

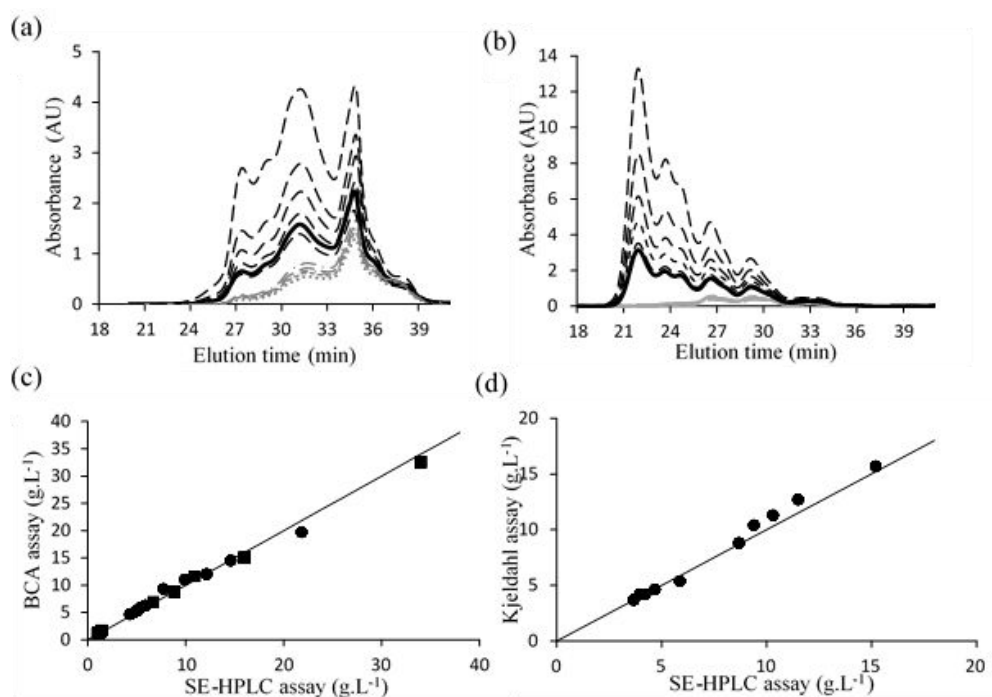


Figure 21. Size exclusion steric absorbance (multiplied by the dilution factor) of (a) alfalfa white proteins hydrolysate and (b) Lactium®. Initial hydrolysate chromatograms are represented by the thick solid line. Retentate fractions are presented by black dashed line and permeate fractions by grey dashed line. Below, comparison between concentrations obtained by integration of SE-HPLC profiles and concentrations obtained by BCA analysis (c) or by Kjeldahl analysis (d) of fractions of alfalfa white proteins hydrolysate (round mark) and Lactium® (square mark).

Table 5 and Figure 21 (c and d) compare concentration values obtained between reference and SE-HPLC method. Table 5 also presents the relative errors. A very good match between concentrations estimated by integration of SE-HPLC profiles and BCA or Kjeldahl analysis can be noticed (maximal error relative of 15 %). One would have expected that the change of composition in permeate and retentate compared to initial hydrolysates may induce a slight change of \overline{MM}_{aa} and $\overline{\varepsilon}_{aa}$ and impact the performance of the global strategy. However, the results presented in Table 5 and Figure 21 are very satisfying and show that these deviations are negligible. Hence the methodology is suitable for the quantification of total peptide concentration in complex peptide mixtures.

Table 5. Comparison between concentrations obtained by SE-HPLC assays and BCA or Kjeldahl assays of 30 UF fractions. Relative errors are displayed.

| | | Fraction | SE-HPLC assay concentration (g.L ⁻¹) | BCA assay concentration (g.L ⁻¹) | Relative error between SE-HPLC and BCA assays (%) | Kjeldahl assay concentration (g.L ⁻¹) | Relative error between SE-HPLC and Kjeldahl assays (%) |
|------------------------------------|-------------------|----------|---|--|--|--|--|
| Alfalfa white proteins hydrolysate | Permeate UF 1 | 1 | 4.29 | 4.65 | 8 | - | - |
| | | 2 | 4.82 | 5.14 | 6 | - | - |
| | | 3 | 5.07 | 5.31 | 5 | - | - |
| | | 4 | 5.36 | 5.85 | 8 | - | - |
| | | 5 | 5.88 | 6.31 | 7 | - | - |
| | Retentate UF 1 | 6 | 7.92 | 9.29 | 15 | - | - |
| | | 7 | 9.91 | 11.02 | 10 | - | - |
| | | 8 | 12.14 | 12.04 | -1 | - | - |
| | | 9 | 14.59 | 14.51 | -1 | - | - |
| | | 10 | 21.84 | 19.71 | -11 | - | - |
| | Permeate UF 2 | 11 | 3.67 | - | - | 3.7 | -1 |
| | | 12 | 3.94 | - | - | 4.22 | -7 |
| | | 13 | 4.22 | - | - | 4.22 | 0 |
| | | 14 | 4.68 | - | - | 4.63 | 1 |
| | | 15 | 5.86 | - | - | 5.39 | 9 |
| | Retentate UF 2 | 16 | 8.68 | - | - | 8.8 | -1 |
| | | 17 | 9.4 | - | - | 10.4 | -10 |
| | | 18 | 10.3 | - | - | 11.3 | -9 |
| | | 19 | 11.5 | - | - | 12.7 | -9 |
| | | 20 | 15.2 | - | - | 15.7 | -3 |
| Lactium® | Permeate | 21 | 0.99 | 1.11 | 11 | - | - |
| | | 22 | 1.12 | 1.32 | 15 | - | - |
| | | 23 | 1.17 | 1.33 | 12 | - | - |
| | | 24 | 1.23 | 1.34 | 8 | - | - |
| | | 25 | 1.42 | 1.75 | 15 | - | - |
| | Retentate | 26 | 6.69 | 6.85 | 2 | - | - |
| | | 27 | 8.84 | 8.8 | 0 | - | - |
| | | 28 | 10.9 | 11.63 | 6 | - | - |
| | | 29 | 16.01 | 15.05 | -6 | - | - |
| | | 30 | 34 | 32.52 | -5 | - | - |

- Impact of sample solvent on the SE-HPLC assay

One of the drawback of reference methods for total peptide quantification is the incompatibility with some organic solvents. Kjeldahl analysis based on nitrogen quantification cannot be carried out for sample containing solvent with nitrile or amine groups. A total evaporation of solvent and a dilution in compatible solution should be performed before Kjeldahl dosage. The calibrations of spectrophotometric quantification methods such as BCA analysis are also modified by the presence of organic solvents (e.g., acetonitrile, ethanol, methanol). The presence of salt might also impact calibration curves. However, organic solvents and salts are commonly used for the fractionation of hydrolysates by chromatography processes. The peptide quantification is therefore difficult.

To study the impact of organic solvent and salts on the quantification methodology based on SE-HPLC analysis, acetonitrile (ACN) and sodium chloride (NaCl) were chosen. Samples of alfalfa white proteins hydrolysate at the same concentration of 1.85 g.L^{-1} (in the linearity range of the methodology) were prepared in different diluent concentrations. Samples were analyzed in triplicate by size-exclusion chromatography. The methodology of quantification was applied on SE-HPLC profiles. The results are presented in Figure 22(a). The data clearly show that the presence of sodium chloride and acetonitrile has not effect on the accuracy of the peptide quantification.

The same comparison was performed for BCA assay. Samples of alfalfa white proteins hydrolysate at 1 g.L^{-1} (according to the linearity range) were analysed by BCA assay. The absorbance values for each sample are displayed in Figure 22(b). It appears that the presence of salt does not modify the absorbance response even for high salt concentration. However, a concentration of acetonitrile above 30 % induces an increase of the absorbance value of BCA assay. Consequently, a calibration curve of the BCA assay has to be established for each acetonitrile concentration or organic solvent has to be evaporated and samples diluted in appropriate solvent.

SE-HPLC method is based on a peptide UV signal at the outlet of the column. As a consequence, peptides detected by the UV detector are in the mobile phase whatever their solvent in the starting sample (because the elution is isocratic and the column is equilibrated in the same eluent). The mobile phase recommended in this methodology is a 30 % acetonitrile / water (v/v) mixture and the lateral chains and peptide bond extinction coefficients used for the calculations are valid for water / acetonitrile solvents up to 50 % acetonitrile/water (v/v) (Kuipers and Gruppen, 2007). This explains why no bias in the estimation of the concentration is observed when solvent sample is water or an ACN/water mixture. However, if the solvent is an aqueous or salted buffer, the peptide UV signal may be interfered when low molar weight salt or buffer molecules are eluted. But these solutes have low molar masses (less than 150 g.mol^{-1}), so

this hypothetical bias would take place for a very small part of the overall UV signal (at the end of it, when low molar weight peptides are eluted). The results with salts clearly demonstrate that this bias can be neglected. When sample contains buffer like tris, phosphate or citrate, the bias can also be neglected (data not shown).

Hence, these results highlight the great advantage of the SE-HPLC methodology to quantify peptide mixtures in various diluents, contrary to Kjeldahl analysis or BCA assay.

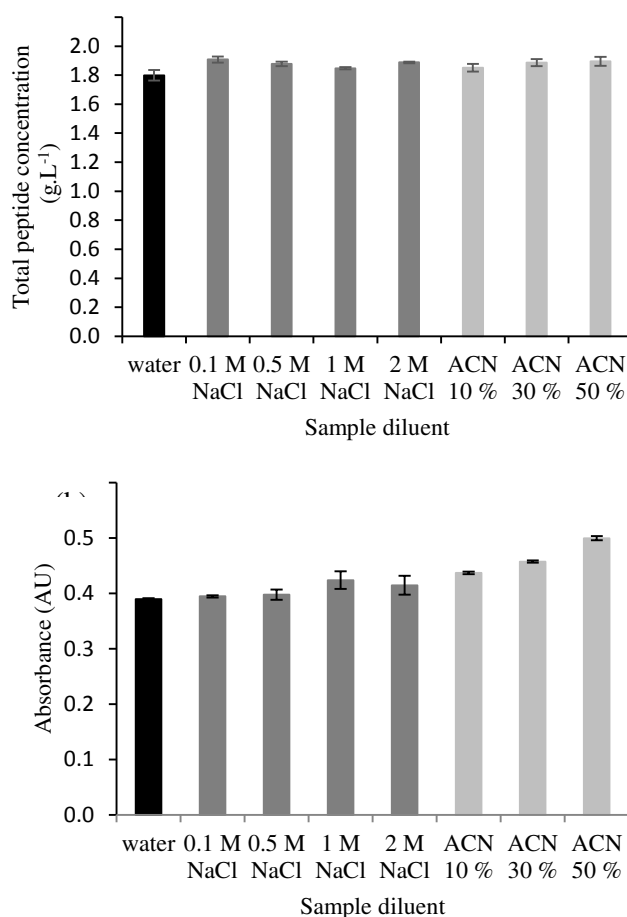


Figure 22. (a) Comparison of total peptide concentration determined by SE-HPLC methodology of alfalfa white proteins hydrolysate samples at 1.8 g.L⁻¹ (in the linearity range of the methodology) prepared in different diluents (water, NaCl from 0.1 M to 2 M and acetonitrile from 10 % to 50 %). (b) Comparison of absorbance values obtained by BCA assay of alfalfa white proteins hydrolysate samples at 1 g.L⁻¹ (in the linearity range of BCA assay) prepared in different diluents (same conditions than (a)). Experiments were carried out in triplicate. Means and standard deviations are displayed.

➤ Conclusion

To determine total peptide concentration of complex peptide mixtures, the methodology proposed in this work consists in using a simple size exclusion-HPLC coupled with UV absorption detector to escape from time-consuming physicochemical techniques such as Kjeldahl or BCA analysis. Moreover, SE-HPLC is already largely used to determine the molecular weight distribution of hydrolysates and fractions and the proposed methodology enables to obtain two major information in a single. The methodology is based on the estimation of molar extinction coefficient of each point of the chromatogram from the mixture aminogram. Hence absorbance profiles are converted to concentration profiles using the Beer-Lambert law.

The simulation of peptide elution for a large number of mixture provides a good support in the validation of the methodology. The comparison of the methodology with Kjeldahl or BCA analysis on two hydrolysates and their ultrafiltration fractions also proves the validity of the strategy with relative error inferior to 15 %. Moreover, salts or organic solvents such as acetonitrile in samples do not impact the accuracy of the quantification contrary to Kjeldahl or colorimetric assays. The linearity of the methodology also covers a large concentration range.

Overall, the methodology proposed based on a size exclusion-HPLC analysis is a powerful and simple tool to determine the total peptide concentration of all complex peptide mixtures without having to calibrate the analytical system for each mixtures and can be an interesting substituent to common methods.

II.6.4.2. Contribution de l'article

Le précédent article propose une alternative originale aux méthodes classiques de dosage des hydrolysats peptidiques (Kjeldhal, dosages colorimétriques). La méthodologie s'appuie sur le chromatogramme d'exclusion stérique et sur l'analyse de l'aminogramme de l'hydrolysat, qui sont par ailleurs des données classiques caractérisant le mélange. La difficulté de quantification par chromatographie réside dans l'estimation du coefficient d'extinction molaire ϵ pour convertir l'absorbance en concentration. A partir de l'aminogramme, un coefficient d'extinction molaire moyen $\overline{\epsilon_{aa}}$ et une masse molaire moyenne $\overline{MM_{aa}}$ par acide aminé permet d'estimer pour chaque point du profil d'exclusion stérique un ϵ . La méthodologie est résumée Figure 23. Les résultats de l'article montrent que la méthodologie proposée permet de quantifier les hydrolysats et des fractions d'ultrafiltration avec moins de 15 % d'erreur relative par rapport à un dosage BCA ou Kjeldhal. De plus, contrairement à ces deux dernières méthodes, la présence de sel ou de solvant comme l'acétonitrile dans un échantillon ne modifie pas la précision de la quantification par chromatographie d'exclusion stérique.

Cette méthodologie de quantification est également une étape clé dans la stratégie de prédiction des performances globales de l'ultrafiltration. Elle peut être appliquée sur les profils d'exclusion stérique prédits afin de déterminer la concentration globale en peptides estimée dans les deux compartiments au cours de l'ultrafiltration, et ainsi prédire les facteurs d'enrichissement.

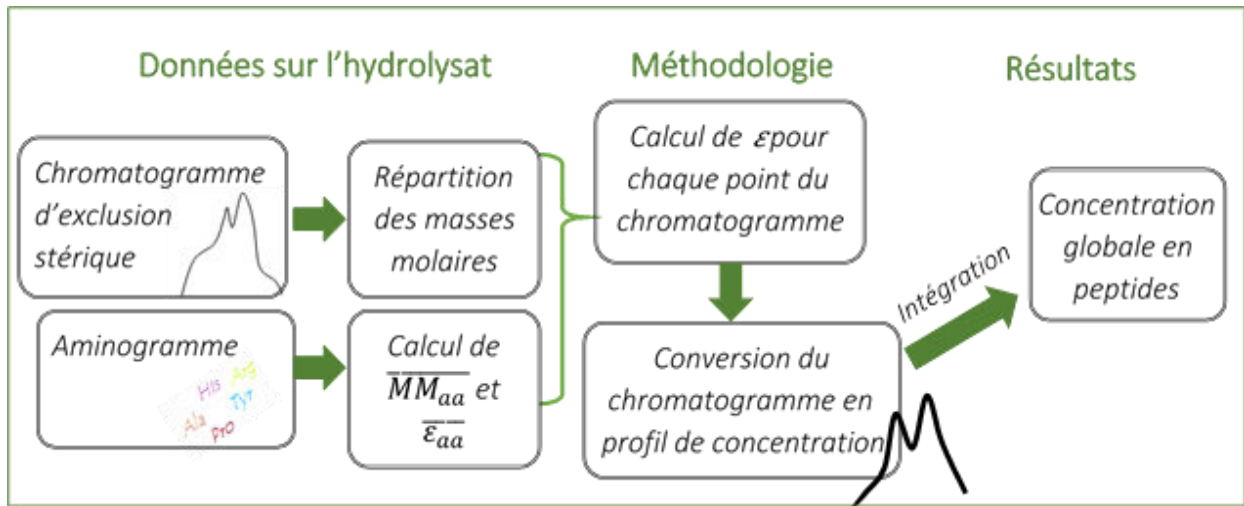


Figure 23. Schéma bilan de la méthodologie de quantification des hydrolysats

RESULTATS & DISCUSSION

Introduction

Comme décrit dans la synthèse bibliographique, l'ultrafiltration est souvent utilisée dans la littérature pour fractionner les hydrolysats protéiques et améliorer leurs propriétés nutritionnelles, techno-fonctionnelles ou bioactives. Cependant, les choix de mise en œuvre sont empiriques à cause de la complexité des mélanges et de la difficulté à modéliser et optimiser les performances du procédé. De plus, ce manque d'outils de prédiction des performances de l'ultrafiltration, en termes de qualité de séparation, de productivité ou de coûts ne permet pas de justifier rationnellement l'utilisation de ce procédé de fractionnement plutôt que d'autres, comme les procédés chromatographiques.

La modélisation des performances de l'ultrafiltration requiert de connaître la rétention, par la membrane, de chaque peptide du mélange. Cependant, un hydrolysat peut contenir plus d'une centaine de peptides, ce qui limite la détermination des rétentions individuelles. De plus, il est nécessaire de comprendre l'influence des conditions opératoires et de la mise en œuvre du procédé sur les rétentions et les performances du fractionnement. Ainsi, le premier chapitre de résultats sera consacré à l'étude expérimentale de la sélectivité d'une membrane en cellulose régénérée. Cette étape permettra de proposer un étalonnage de la membrane caractérisant sa sélectivité. L'influence des conditions opératoires et de l'implémentation du procédé sur la rétention des peptides pourra alors être mise en évidence. Les rendements et les enrichissements de plusieurs classes de masses molaires seront aussi étudiés en UF et en DF. L'ensemble du chapitre fait l'objet d'une pré-publication, qui sera soumise dans *Journal of Membrane Science*

L'étude expérimentale de la sélectivité servira alors de base pour justifier les hypothèses de la stratégie de modélisation, validée dans le chapitre suivant. Cette méthodologie consiste à appliquer les bilans de matière sur la répartition de masses molaires de l'hydrolysat (évaluée par chromatographie d'exclusion stérique), en utilisant l'étalonnage de la membrane pour évaluer la rétention des peptides selon leur masse molaire. La prédiction des rendements et enrichissements de différentes classes de masses molaires sera comparée au suivi expérimental des performances à partir des profils d'exclusion stérique des fractions. Un deuxième niveau de validation consistera à prédire les rendements et enrichissements de peptides cibles contenus dans différents hydrolysats et suivis par CLHP couplée à un spectromètre de masse. Cette deuxième partie est présentée sous forme de pré-publication, qui sera soumise dans *Journal of Membrane Science*

Le dernier chapitre de ces travaux sera consacré à l'optimisation dynamique de l'ultrafiltration. L'objectif sera de déterminer le meilleur enchaînement d'UF et de DF pour maximiser les performances de séparation en minimisant le volume d'eau consommée et le

temps opératoire, choisis comme critères économiques. Après avoir validé un modèle de résistances en série pour prédire l'évolution du flux de perméat au cours du procédé, la démarche et les résultats d'optimisation seront présentés.

La démarche et les problématiques abordées dans les chapitres suivants sont résumées en Figure 24.

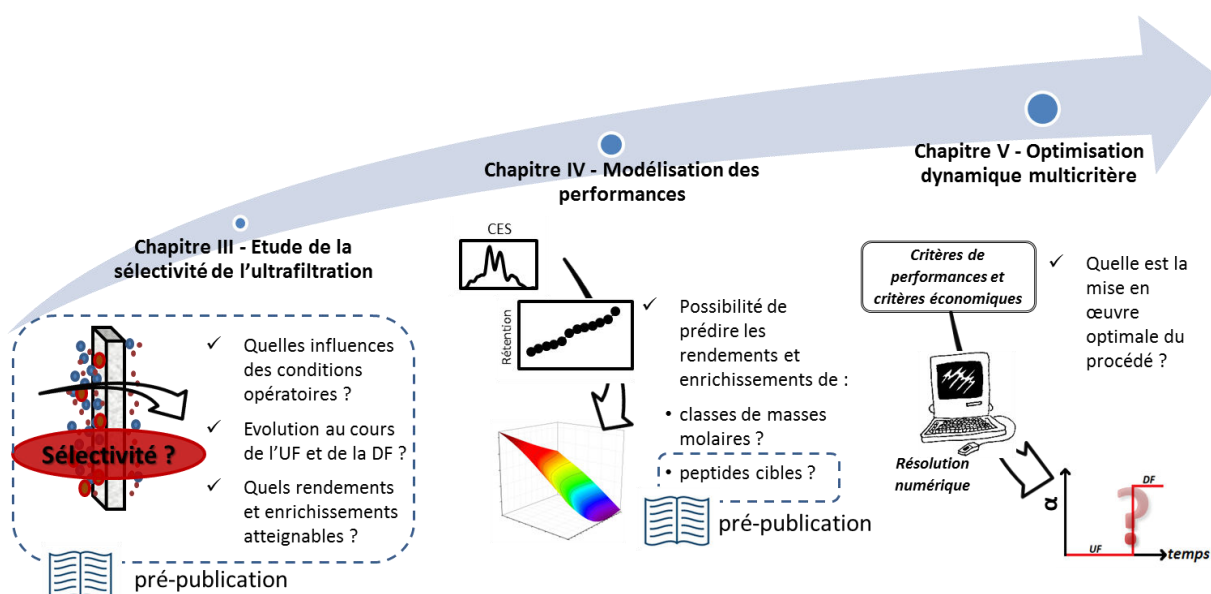


Figure 24. Démarche et problématiques de la partie résultats & discussions.

Chapitre III

Etude de la sélectivité et des performances de l'ultrafiltration en UF et en DF

Introduction

L'étude de la sélectivité des membranes d'ultrafiltration est fondamentale pour caractériser le fractionnement d'hydrolysats protéiques. La complexité des mélanges rend difficile la détermination précise des rétentions de chaque peptide en fonction des conditions opératoires ou du mode d'implémentation (concentration discontinue ou diafiltration). De plus, la plupart des études portant sur le fractionnement d'hydrolysats ne caractérisent que qualitativement la séparation en comparant les répartitions de masses molaires de fractions, obtenues par chromatographie d'exclusion stérique (CES). Des critères de performances comme le rendement, la pureté ou l'enrichissement en famille de masses molaires ou en peptides cibles sont rarement calculés. La mise en œuvre de l'ultrafiltration est donc généralement empirique.

Ces dernières années, certains chercheurs ont néanmoins développé des outils intéressants basés sur la CES permettant une meilleure analyse de la sélectivité des membranes et notamment par la construction de courbes d'étalonnage (Chabeaud *et al.*, 2009b). Dans ce chapitre, le fractionnement d'un hydrolysats de caséine, le Lactium®, sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée sera étudié afin de proposer une démarche complète pour caractériser la sélectivité et les performances du procédé. La pertinence d'une calibration des membranes à partir de la CES sera étudiée. L'influence des conditions opératoires (pression transmembranaire, concentration initiale, vitesse tangentielle) de l'ultrafiltration sur la sélectivité sera alors mise en évidence. Dans un deuxième temps, l'évolution des rétentions au cours de l'UF et de la DF, ainsi que l'évolution du flux de perméat seront analysés. Finalement, la CES sera utilisée pour calculer les performances en termes de rendement et d'enrichissement de différentes masses molaires au cours de l'UF et de la DF.

Les résultats de l'étude sont présentés sous forme de pré-publication, qui sera soumis dans *Journal of Membrane Science*.

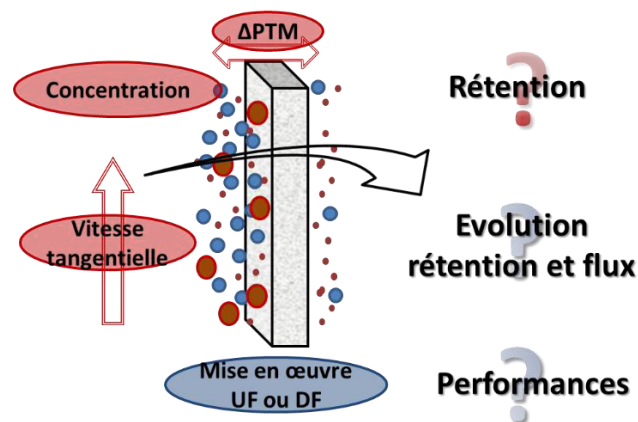


Figure 25. Problématiques du chapitre III.

Manuscript: Fractionation of a casein hydrolysate by tangential filtration using a 3 kDa regenerated cellulose membrane. Part I: membrane selectivity, UF and DF mode performances

Alice Bodin, Xavier Framboisier, Ivan Marc, Romain Kapel

III.1.Introduction

The enzymatic proteolysis transforms proteins from plants (McCarthy *et al.*, 2013) or animal resources (e.g. milk (Hernández-Ledesma *et al.*, 2014; Korhonen, 2009), fish (Centenaro *et al.*, 2014), or microalgae (Fan *et al.*, 2014; Ngo *et al.*, 2012)) into complex peptide mixtures named hydrolysates that are used for decades in food industry for their nutritional or functional properties (Aider and Barbana, 2011; Joye and McClements, 2014; Manninen, 2009). Hydrolysates may also contain bioactive peptides with a wide range of properties as antimicrobial (López-Expósito *et al.*, 2006), antihypertensive (Kapel *et al.*, 2006) or antioxidative (Uluko *et al.*, 2014) making them particularly attractive for nutraceutical industry, food safety and culture media (Chabanon *et al.*, 2008; Hashmi *et al.*, 2010). However, bioactive peptides are released during hydrolysis with hundreds of other inactive peptides. Therefore a major limitation for the use of raw hydrolysates in nutraceutical products is the low bioactivity of mixtures.

Many authors showed that tangential ultrafiltration was a separation process efficient for improving a large spectrum of hydrolysate bioactivities due to bioactive peptide enrichments (He *et al.*, 2013; Onuh *et al.*, 2014; Picot *et al.*, 2010; Ranamukhaarachchi *et al.*, 2013; Saidi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2013). In these studies, membrane molecular weight cut-off (MWCO) were ranged between 1 and 150 kDa. Most of them were organic membranes (PES, cellulose) but ceramic membranes were also used. In most of the cases, ultrafiltrations were all carried out in batch concentration (UF) mode (permeate outlet collected while the retentate outlet is recycled in the feed tank). Only Saidi *et al.* (2014), used diafiltration (DF) mode (permeate outlet collected, retentate recycled while water is added to the feed tank) to obtain fractions with nutraceutical and pharmaceutical interests. However, in all these studies, UF operating conditions, MWCO and implementation mode were chosen empirically. This is due to the lack of knowledge in peptide transport throughout membranes during fractionation of complex mixtures like hydrolysates (that may be composed of up to hundreds of different peptides) and the impact of operating conditions on it.

In the spite of protein hydrolysate complexity, few authors tried to better characterize their fractionation by tangential filtration processes. Vandanjon *et al.* (2009) proposed to use simple SE-HPLC analysis of the retentate and the permeate in order to estimate retention values of peptide groups of close molar mass ranges. This method was used for choosing the most appropriate cut-off membranes for the separation of macropeptides from micropeptides and to give an assessment of the actual sieving curve and nominal weight mass cut-off of membranes (Bourseau *et al.*, 2009; Chabeaud *et al.*, 2009a, 2009b). These authors demonstrated that operating conditions impact the selectivity of membranes. Chabeaud *et al.* (2009a) showed that an increase of the transmembrane pressure from 10 to 30 bar increases the retention of peptides leading to a diminution of the actual MWCO from 1600 Da to 800 Da. They also demonstrated that the increase of the feed concentration slightly decrease the peptide retention. Fernandez *et al.* (2012) finely studied the retention of some targeted peptides analyzed by mass spectroscopy in β -lactoglobulin tryptic digest. They showed that the change of the feed concentration slightly modulate the peptide retention, but mostly for peptides having a molar mass largely inferior to the MWCO of the membrane. These studies were mostly carried out in total recirculating mode. Only Chabeaud *et al.* (2009a) studied the evolution of calibration curves during UF at different volumic reduction factors and showed that retention might be considered constant. To our knowledge, the evolution of the peptide retentions or membrane selectivity during diafiltration (DF) remains not investigated.

Beside these few studies on peptide transport, even fewer studies report the monitoring of UF separation performances for enriching a peptide or a peptide family (defined by a molar mass range). Some authors monitored the yield and the enrichment of micropeptides family during UF as a function of the volume reduction factor (Bourseau *et al.*, 2009; Chabeaud *et al.*, 2009a). Kapel *et al.* (2011) have characterized the yield and the enrichment in permeate of a targeted bioactive peptide during alfalfa white protein hydrolysate ultrafiltration. Nevertheless, the fractionation performances of hydrolysates are rarely quantified and the impact of the implementation modes remains unknown.

The aim of the present work is to improve the knowledge in peptide transport during fractionation of complex hydrolysates by tangential filtration processes. An industrial hydrolysate of bovine caseins containing a bioactive peptide (Lactium®) and a 3 kDa regenerated cellulosis (RC) membrane was chosen as a separation system for this study. In the first part, the membrane selectivity and calibration curves (peptide molar mass vs retentions) are assessed in different operating conditions (TMP, initial concentration and recirculating rate). In the second part, the evolution of the peptide retentions in the course of the UF and DF is studied. Finally, the performances of tangential filtration in terms of yield and enrichment of

peptides as a function of their molar mass and process advancement (volume reducing factor in UF and number of diavolumes in DF) is investigated.

III.2. Materials and methods

III.2.1. Material

HPLC grade eluents (water and acetonitrile) were both purchased from Fisher Scientific (Geel, Belgium). Trifluoroacetic acid was obtained from Arcos Organics (Geel, Belgium). Sodium hydroxide pellets were supplied by Carlo Erba Reactifs (Val de Reuil, France). Peptides from chemical synthesis used for the columns calibration were obtained from GeneCust (Dudelange, Luxembourg). Lactium® provided by Ingredia SA (Arras, France) was under a spray-dried powder composed of peptides (78.5 %), minerals (15 %), water (5 %) carbonhydrates (1 %) and fat (0.5 %). Lactium® was microfiltrated at pH 7 with 0.22 µm membrane and lyophilized before ultrafiltration experiments to eliminate insolubilities.

III.2.2. Ultrafiltration experiments

III.2.2.1. Pilot and membrane description

Ultrafiltration experiments were conducted on a Cogent µScale TFF system (Millipore) at room temperature (22 °C +/- 2 °C). A flat sheet membrane with a molecular weight cut-off (MWCO) of 3 kDa (regenerated cellulose, surface of 88 cm², Millipore, Billerica, USA) was selected to fractionate the Lactium®. The membrane was cleaned and stored in 0.1 M NaOH at 4 °C after each use.

Ultrafiltration process is represented in

Figure 26. The retentate is recycled in the feed tank whereas permeate is recovered throughout experiment. A transmembrane pressure is applied thanks to the feed pump and the counter pressure valve on the retentate pipe. In concentration mode, no water is added to the feed tank. In diafiltration mode, the retentate volume is keep constant by the addition of milli-Q water.

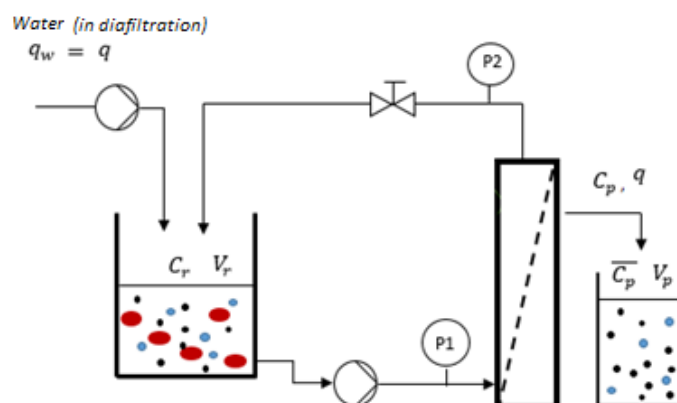


Figure 26. Schema of ultrafiltration process.

III.2.2.2. Influence of operating conditions on membrane selectivity

The influence of the initial hydrolysate concentration C_0 (10, 30 and 50 g.L⁻¹), the transmembrane pressure TMP (1, 2, 3 bar), the retentate recirculating velocity (50, 75 and 100 mL.mn⁻¹) on the UF selectivity were studied in total recirculating mode. Permeate and retentate were analyzed by SE-HPLC after 20 min of total recirculation (for stabilizing permeate flux). SE-HPLC analyses were performed for establishing membrane calibration curves and peptide molar masse distributions. Samples were also taken for RP-HPLC/MS analysis in order to determine retention values of actual peptides of known molar masses.

III.2.2.3. Implementation in batch concentration and diafiltration modes

Batch concentration (UF) and diafiltration (DF) experiments were performed at 3 bar of transmembrane pressure (TMP), the retentate was recirculated at 100 mL.min⁻¹ and the initial concentration of Lactium® was 10 g.L⁻¹. The pH was around 7 (pH of Lactium® in water). The initial volume of hydrolysate was 200 mL. Total recirculation was applied for 20 minutes before collecting the permeate. UF experiments were stopped at volume factor reduction (VRF) of 5. Samples of retentate and permeate were taken at VRF 1.19, 1.47, 1.92, 2.78, 5 for SE-HPLC. In continuous diafiltration mode, milli-Q water was added to keep constant the retentate volume throughout the experiments. DF experiments were stopped when 10 diavolumes (DV) passed through the membrane. Samples in permeate and retentate compartments were taken one out of two diavolumes for analyses. Permeate flux was monitored during UF and DF fractionations. Experiments were performed in triplicate for both operating modes. Water flushing is enough to recover the initial membrane resistance of $1.7 \pm 0.1 \times 10^{13} \text{ m}^{-1}$ suggesting that no irreversible membrane fouling occurred during experiments.

III.2.3. Membrane calibration curves (peptide molar mass vs retentions)

Permeate and retentate outlets in recirculating mode were analyzed by SE-HPLC. To do so, samples were eluted onto a Superdex peptide column (GE Healthcare, GB) connected to a Shimadzu LC20 system. The injection volume was 50 μL and the elution was performed with Water/acetonitrile/TFA: 70 / 30 / 0.1 v/v % at 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The elution was monitored at 214 nm. Membrane calibrations were drawn according to a previous work (Kapel *et al.*, 2011). For i point of the chromatogram of a elution volume, a retention value was calculated as:

$$R_i = 1 - \frac{A_{p,i}}{A_{r,i}} \quad (\text{Eq. 66})$$

With $A_{p,i}$ and $A_{r,i}$ the absorbances of i on permeate and retentate chromatogram.

Retention values were plotted against log MM with MM calculated from chromatogram elution volume and column calibration curve. The Superdex peptide column was calibrated with 45 different peptides eluted in the same conditions.

III.2.4. Peptide mixture molar mass distribution

Membrane selectivity was investigated in different conditions by comparing peptide molar mass distributions in UF or DF compartments. These distributions were obtained from SE-HPLC chromatogram. The mass ratio of each molar mass in compartments was calculated using a method to convert absorbance profiles into concentration ones (Bodin *et al.*, 2015). Then, the cumulative mass frequency can be calculated.

III.2.5. Actual peptide retention assessment

Retentate and permeate in recirculating mode were analyzed by RP-HPLC/MS. The column used was a C18 Prospher (2.1 mm x 250 mm, 5 μm diameter beads) provided by Alltech (Carquefou, France) connected to the Shimadzu model LC20 system. 10 μL of sample were injected. For the elution, gradients of solvent A (water/acetonitrile in 95/5 proportion (v/v) with 0.1 % TFA (v/v)) and solvent B (water/acetonitrile in 5/95 proportion (v/v) with 0.1 % TFA (v/v)) were used. The starting condition was 100 % A. A first gradient was applied to reach 28 % B/72 % A in 50 min. Then a second gradient was applied to reach 48 % B/52 % A in 20 min. The column was finally washed with 100 % B for 10 min and re-equilibrated in 100 % A for 15 min. Elutions were done at 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and 35 $^{\circ}\text{C}$. The eluent was analyzed on-line by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) (Shimadzu Corporation, Japan) in positive mode. The following operating parameters were used in TIC mode: mass scan = 50-2000 m/z, ion spray tension = 4.5 kV, heat block temperature = 200 $^{\circ}\text{C}$, drying gas flow = 15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, scan speed = 2143 mass units/s. SIM mode was used to monitor targeted peptides. Mass peaks of the

targeted peptide in compartments were integrated and relative concentrations were calculated by dividing peak areas. 6 peptides of Lactium® with molar masses ranging from 600 to 1800 g.mol⁻¹ (780, 873, 1267, 1336, 1383, 1761 g.mol⁻¹) had a significant signal in MS. The retention of these peptides was determined from their MS signal integration in permeate and retentate using the classical equation of retention ($R = 1 - C_p/C_r$).

III.2.6. Actual peptides hydrophobicity assessment

Hydrophobic index (iH) of targeted peptides were determined has described in a previous work (Schweizer *et al.*, 2007). The C18 column was calibrated with 48 standard peptides with known amino acids sequence. The iH of each amino acid was optimized to obtain a linear correlation ($R^2 = 0.93$) between the elution time of peptides and their iH (sum of iH of amino acid in sequence). Values of iH for standard peptides were spread between 10 and 65. iH of targeted peptides in Lactium® were calculated from their elution time during RP-HPLC.

III.2.7. UF and DF performances calculation

The mass balances of a peptide “i” in permeate and retentate during UF and DF are displayed in Table 6.

Table 6. Calculation of relative peptide concentration from UF and DF mass balances (Muller *et al.*, 1999)

| | Permeate | Retentate |
|--------------------------|--|--|
| Batch concentration (UF) | $\frac{\overline{C}_{p,i}}{C_{0,i}} = \frac{VRF - VRF^{R_i}}{VRF - 1} \text{ (Eq. 67)}$ | $\frac{C_{r,i}}{C_{0,i}} = VRF^{R_i} \text{ (Eq. 69)}$ |
| Diafiltration (DF) | $\frac{\overline{C}_{p,i}}{C_{0,i}} = \frac{1 - e^{(R_i - 1) \times DV}}{DV} \text{ (Eq. 68)}$ | $\frac{C_{r,i}}{C_{0,i}} = e^{(R_i - 1) \times DV} \text{ (Eq. 70)}$ |

Peptide yield in a UF or DF compartment is given by the following equation:

$$\eta_i = \frac{C_i \cdot V}{C_{0,i} \cdot V_0} \quad \text{(Eq. 71)}$$

With C_i and V the concentration of a peptide “i” in a compartment and the volume of the compartment at any process advancement.

As a consequence, the peptide yield can be monitored in the course of the process by combining equations 67-70 (depending on the compartment and the implementation mode considered) and the equation 71. In our study, the yield of peptide of a given molar mass was calculated from SE-chromatograms of the considered compartment and the initial hydrolysate. To do so, the SE-column calibration curve was used for calculating the elution volume of the

chosen molar masses (600, 900, 1200, 1500, 1800, 2100 g.mol⁻¹). The absorbance at the elution volume of a “i” molar mass was taken on the hydrolysate chromatogram ($A_{i,0}$) and compartment (A_i). The ratio $A_i/A_{0,i}$ was used to calculate the corresponding $C_i/C_{0,i}$ and apply equation 66.

The enrichment in a UF or DF compartment is given by the following equation:

$$\tau_i = \frac{C_i \cdot V \cdot \sum C_0}{C_{0,i} \cdot V_0 \cdot \sum C} \quad (\text{Eq. 72})$$

$C_i/C_{0,i}$ was calculated as explained above. The total concentrations of peptides in the initial hydrolysate ($\sum C_0$) and in a compartment ($\sum C$) were also obtained from the size-exclusion chromatograms according to a previous work (Bodin *et al.*, 2015). On the chromatograms, absorbance signal at 214 nm was converted into concentration using mean amino acid molar extinction coefficient and mean amino acid molar mass (987 L.mol⁻¹.cm⁻¹ and 115 g.mol⁻¹, respectively) established from Lactium® aminogram. Then the overall signal was integrated to give the total peptide content.

III.2.8. Polarization layer resistance calculations

The resistance of the reversible polarization layer at the membrane surface was calculated from permeate flux (J_p) using the resistance-in-series model:

$$J_p = \frac{TMP}{\mu \cdot (Res_m + Res_{pl})} \quad (\text{Eq. 73})$$

With μ , the dynamic viscosity of hydrolysate (considered equals to the viscosity of water), Res_m , the intrinsic membrane resistance and Res_{pl} , the polarization layer resistance.

III.3. Results and discussion

III.3.1. Influence of operating conditions on membrane selectivity and peptide transport

Figure 27 shows the HPLC-SE chromatogram and the deduced peptide molar mass distribution of Lactium® (blue line). It indicates that no peptide has molar masses over 5 kg.mol⁻¹, a small proportion of peptides (20 %) have molar masses under 1 kg.mol⁻¹ and the main peptide fraction displays molar mass between 1 kg.mol⁻¹ and 3 kg.mol⁻¹. Based on this molar mass distribution, a nominal molecular weight cut-off of 3 kDa was chosen in order to obtain a good selectivity.

Figure 27 A shows permeate and retentate chromatograms at 3 bar of TMP, 10 g.L⁻¹ and a recirculation flow rate of 100 mL.min⁻¹ in total recycling mode. Figure 27 B compares the molar

mass distribution of peptides in permeate, retentate and hydrolysate. As expected, hydrolysate and retentate have the same distribution. In permeate, half of the peptides have molar masses less than 1 kg.mol⁻¹ and the other part are up to 3 kg.mol⁻¹. It indicates a good membrane selectivity in a relatively large range of molar masses and validates the choice of 3 kDa cut-off membrane regarding to the purpose of the study. From retentate and permeate SE-HPLC chromatograms, membrane calibration was deduced (Figure 27 C). This Retention vs Log MM curve has a linear trend between retentions of 0.4 and 0.95. This had already been observed by Kapel *et al.* (2011) with a regenerated cellulose membrane (1 kDa) for an alfalfa white proteins hydrolysate. The linear regression of the linear part indicates an apparent MWCO of around 2 kDa instead of 3 kDa. Chabeaud *et al.* (2009a) also observed this phenomena with a PES membrane (4 kDa) using a fish protein hydrolysate. This is explained by the fact that manufacturers establish membranes MWCO on the basis of polyethylene glycol standards with shapes and properties different from peptides.

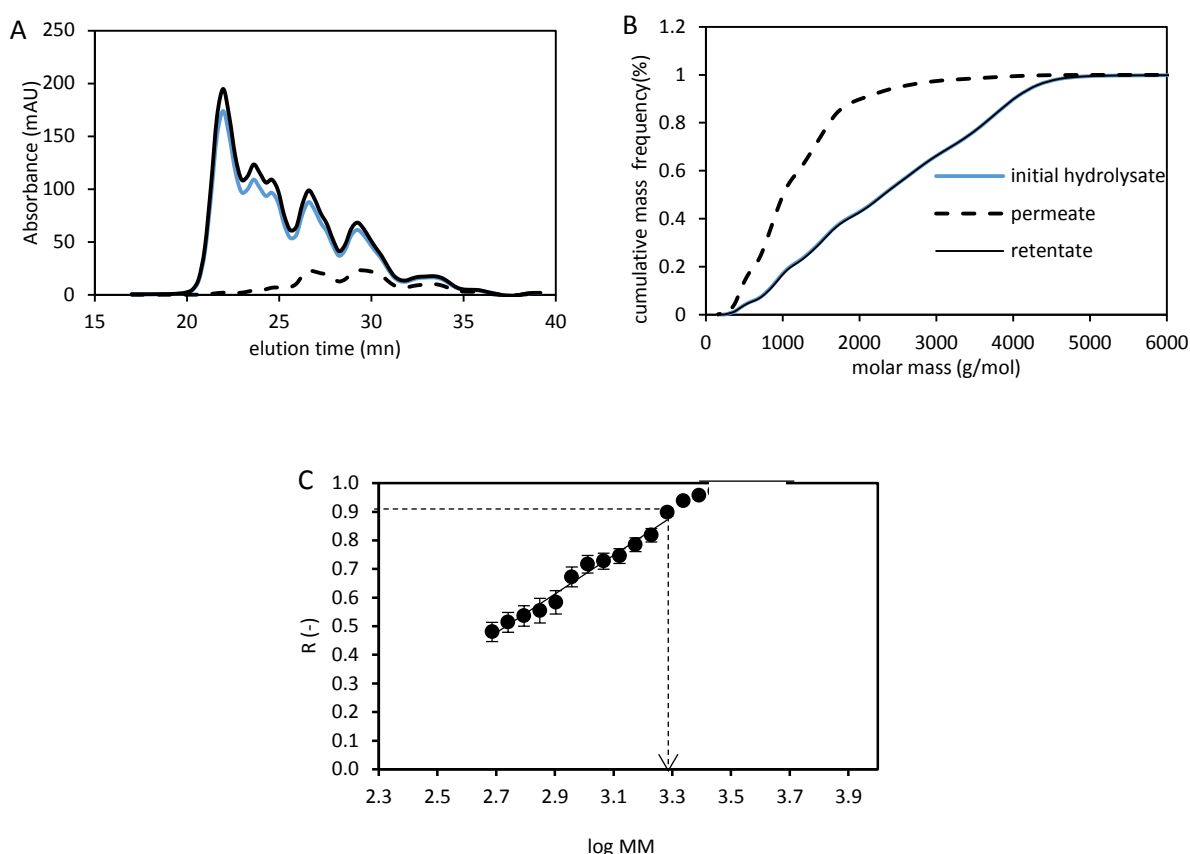


Figure 27. A – SE-HPLC profile (Superdex peptide HR 10 / 300 – eluent: water / ACN / TFA: 70 / 30 / 0.1 v/v %) of Lactium® (blue solid line), retentate (black solid line) and permeate (dashed line) in total recirculation, 10 g.L⁻¹, 3 bar of PTM, 100 mL.min⁻¹ of recirculation rate. B - Molar mass distribution of peptides. C – Calibration curve and real MWCO of the 3 kDa regenerated cellulose membrane determinate by the size-exclusion analysis of the permeate and retentate of Lactium®. Linear regression: $R = 0.72 \times \log(\text{MM}) - 1.51$.

The linear trend of the curve also confirms that the mass transport through the membrane is mainly due to steric hindrance. We recently demonstrated that each point of a SE-HPLC chromatogram can be considered as a peptide mixture having a mean molar mass estimated by the column calibration (Kapel *et al.*, 2011). Consequently, the influence on membrane retention of other physicochemical properties of a single peptide might be smoothed by the method. To check this out, the retention of actual hydrolysate peptides of molar mass and hydrophobicity index estimated by RP-HPLC/MS as described in (Schweizer *et al.*, 2007) was measured and compared to the retention assessed from the membrane calibration. These peptides were chosen on the basis their different hydrophobicity index and molar mass and because of their strong signal in mass spectrometry (that guaranty an accurate quantification). Table 7 indicates that both retention values are very close (relative errors ranging from 1 % to 13 %). This strengthens the hypothesis that the retention of peptides is predominantly driven by steric effect and confirms that SE-HPLC is simple and precise tool to characterize membrane selectivity and calibrate membranes.

Table 7. MM and iH of targeted peptides and comparison between HPLC measured retention and retention predicted from membrane calibration

| Peptide molar mass (g.mol ⁻¹) | iH | R measured by HPLC-MS | R from membrane calibration | Relative error (%) |
|---|----|-----------------------|-----------------------------|--------------------|
| a - 780 | 26 | 0.53 | 0.60 | 13 |
| b - 873 | 16 | 0.57 | 0.63 | 11 |
| c - 1267 | 59 | 0.67 | 0.75 | 12 |
| d - 1336 | 20 | 0.80 | 0.77 | -4 |
| e - 1383 | 61 | 0.73 | 0.78 | 7 |
| f - 1761 | 49 | 0.85 | 0.85 | 1 |

Figure 28 shows the membrane calibration curves obtained in total recycling mode at different operating conditions (recirculation rate (A), initial concentration (B), TMP(C)). The polarization layer resistance was measured in every condition and is displayed in Figure 28. This figure indicates that the recirculating rate (from 50 to 100 mL.min⁻¹) has no influence on the peptide transport. A significant modification in the polarization layer resistance is observed though. Indeed, a decrease of the recirculation rate from 100 mL.min⁻¹ to 50 mL.min⁻¹ increases the polarization layer resistance from 3 x 10¹² m⁻¹ to 6.6 x 10¹² m⁻¹. This parameter probably modifies the thickness of the boundary layer near the membrane (by erosion thanks to

tangential velocity) without impacting its structure, making no difference in the peptide transport.

An increase of the initial concentration (from 10 to 50 g.L⁻¹) also doubles the polarization layer resistance without affecting the retention of peptide. Interestingly, Chabeaud *et al.* (2009a) came to a different observation and conclusion with the ultrafiltration of a fish muscle hydrolysate. They observed a diminution of the retention when initial concentration increases. They explained that the increase of the concentration in feed leads to an increase of the viscosity of the polarization layer. This change of viscosity may (i) weaken retro diffusion and so decrease the apparent retention and / or (ii) form a second “dynamic” membrane less permeable to solutes decreasing the peptide transfer. In the study of Chabeaud *et al.* (2009), the first effect is predominant, but they worked at extreme TMP for ultrafiltration process (between 10 and 30 bar) In the present study, the TMP (3 bar) is in a classical range for UF and both effects might be equivalent leading to a constant apparent retention with the increase of the initial concentration.

Figure 28 C shows that TMP has a different kind of effect. Indeed, an increase of TMP from 1 to 3 bar results in an increase of the peptide retentions. This phenomenon is particularly marked

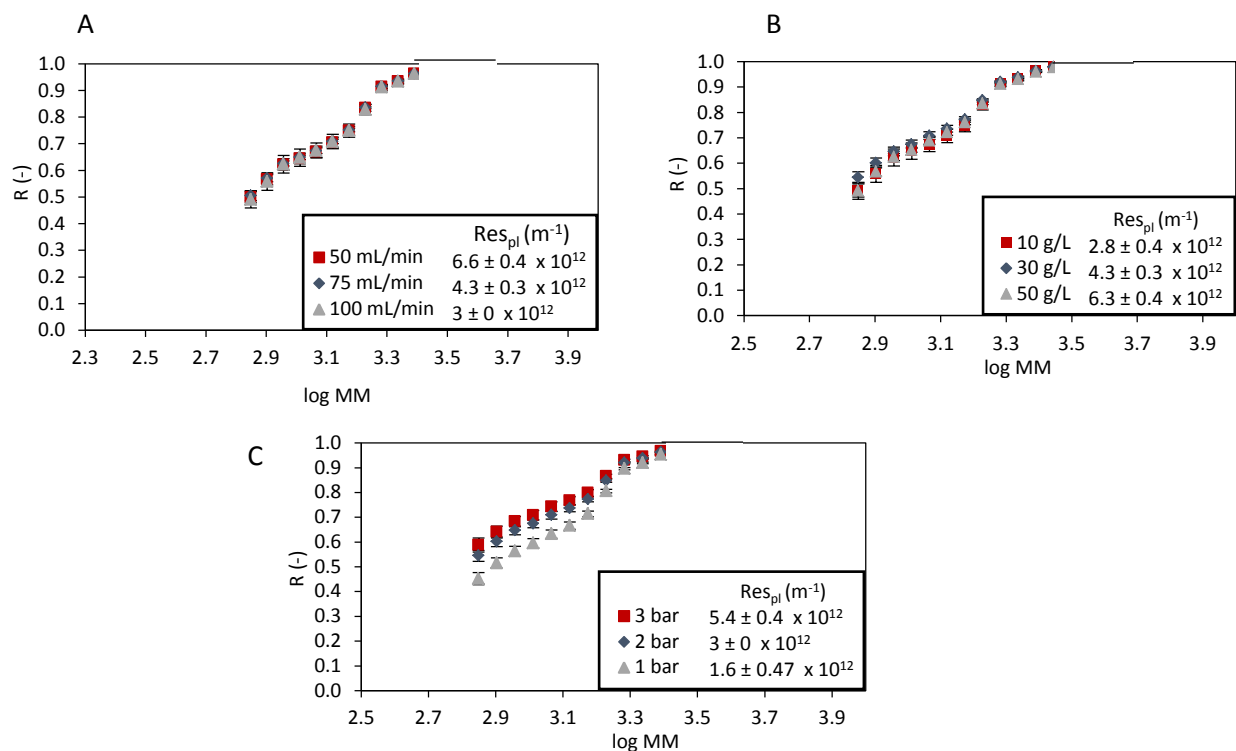


Figure 28. Sieving curves of the 3 kDa regenerated cellulose membrane obtained in total recirculation mode with Lactium® as a function of (A) the recirculation rate of the retentate (C0 = 30 g.L⁻¹, TPM = 2 bar), (B) the initial retentate concentration (TPM = 2 bar, vfeed = 75 mL.min⁻¹), (C) the transmembrane pressure (C0 = 30 g.L⁻¹, vfeed = 100 mL.min⁻¹). Polarization layer resistance is displayed for each condition.

with peptides having molar mass below the MWCO of the membrane. Besides, the increase in TMP comes along with an increase in polarization layer resistance. It can be explained by a compression of the polarization layer due to the larger TMP. This modification of the layer structure probably modulates the peptide transport.

The influence of this peptide retention modulation on the membrane selectivity has been investigated. Figure 29 presents the distribution of the peptide molar masses at the permeate outlets in every operating conditions. As expected, no difference in the selectivity is observed at the different concentration and recirculation rate. Most surprisingly, the distribution obtained at 1 bar of TMP is similar than the others. It means that the difference observed in peptide retentions that can be up to 20 % for low molar mass peptides did not impacted the membrane selectivity much.

As a conclusion, this work indicates that UF operating conditions (PTM, recirculating rate and initial concentration) does not impact the selectivity of the studied membrane for the fractionation of Lactium®. However, the change of operating conditions modifies the polarization layer and its resistance.

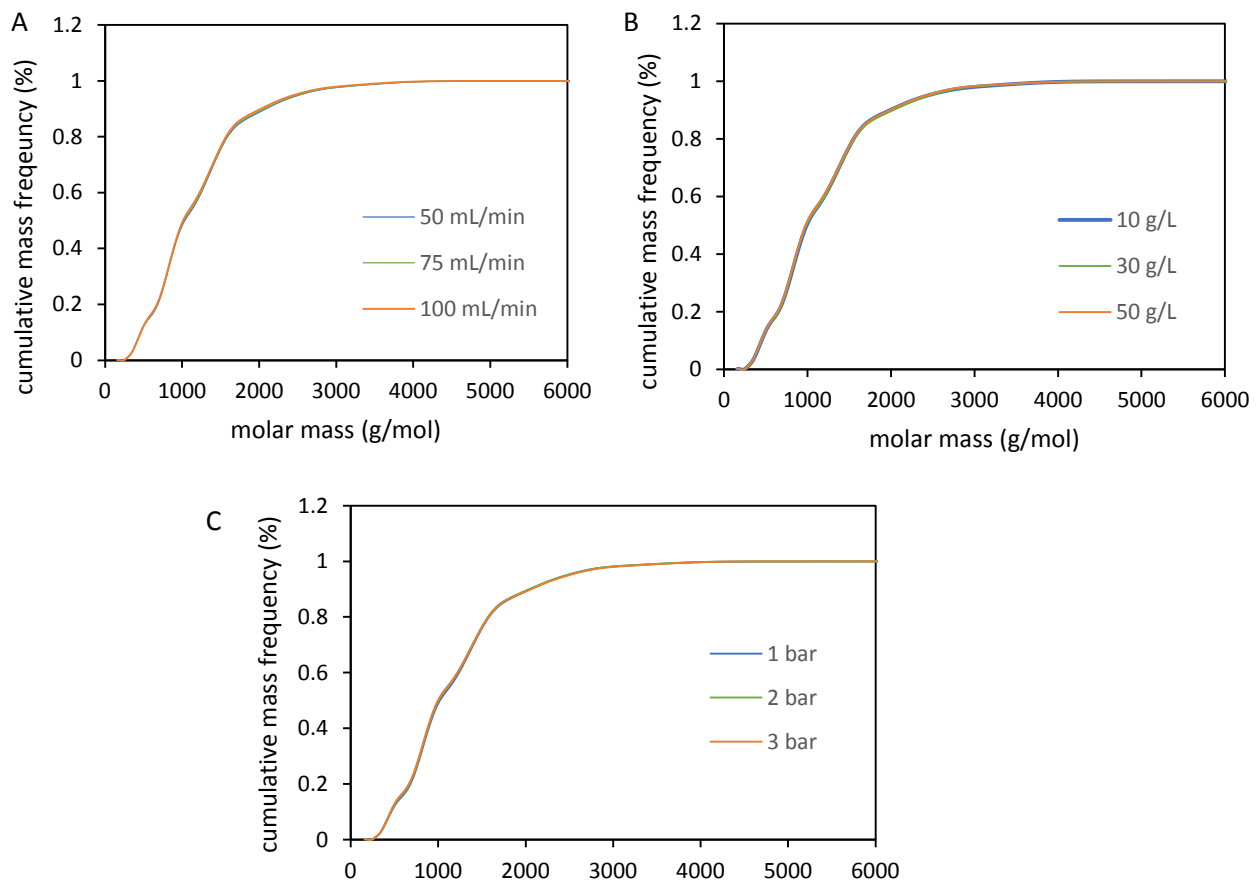


Figure 29. Molar mass distribution of permeate obtained with the 3 kDa regenerated cellulose membrane in total recirculation mode with Lactium® as a function of (A) the recirculation rate of the retentate ($C_0 = 30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{TPM} = 2 \text{ bar}$), (B) the initial retentate concentration ($\text{TPM} = 2 \text{ bar}$, $v_{\text{feed}} = 75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), (C) the transmembrane pressure ($C_0 = 30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $v_{\text{feed}} = 100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

III.3.2. Peptide transport during UF and DF

To characterize the evolution of peptide retentions during UF or DF of complex hydrolysate, it is not possible to monitor the modification of the membrane calibration curves in the course or DF because of the too low concentration of low molar mass peptides in retentate and at the permeate (C_p) outlet. As a consequence, we investigated the evolution of R indirectly by regressing experimental relative permeate concentration ($\overline{C_p}/C_{0,i}$) in the course of UF and DF with mass balance equations (Table 6). Figure 30 shows the evolution of relative concentrations of peptides ranging to 600 g.mol⁻¹ to 3500 g.mol⁻¹ in the permeate compartment in the course of the UF and the DF. Relative concentration values were calculated as the ratio of the absorbance at elution time corresponding to a given molar mass in permeate chromatogram over the absorbance in the hydrolysate chromatogram (at the same elution time). The regression was done by adjusting the retention value by the least squares method.

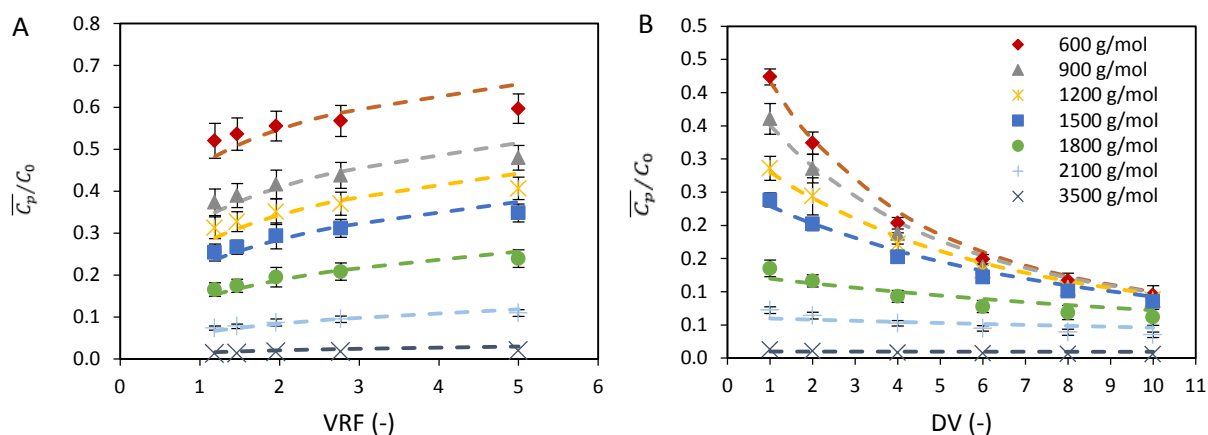


Figure 30. Evolution of $\overline{C_p}/C_0$ during UF (A) and DF (B) (10 g.L⁻¹ of Lactium®, 3 bar of TMP, 100 mL.min⁻¹ of recirculation rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane. Symbols represents experimental data. Dashed lines result from the regression of experimental values using mass balance equations in permeate.

Table 8. Comparison of retention of different molar masses obtained from initial calibration curves obtained in total recirculation, from the fitting regression of UF data and from fitting regression of DF data.

| Molar mass (g.mol ⁻¹) | R from initial calibration curve in recirculation | R from fitting $\overline{C_p}/C_0$ values in UF | Relative error (%) | R from fitting $\overline{C_p}/C_0$ values in DF | Relative error (%) |
|-----------------------------------|---|--|--------------------|--|--------------------|
| 600 | 0.51 | 0.54 | -6 | 0.47 | 9 |
| 900 | 0.63 | 0.67 | -6 | 0.57 | 11 |

| | | | | | |
|------|------|------|----|------|----|
| 1200 | 0.72 | 0.73 | -1 | 0.67 | 7 |
| 1500 | 0.79 | 0.78 | 1 | 0.74 | 7 |
| 1800 | 0.86 | 0.86 | 0 | 0.87 | -1 |
| 2100 | 0.93 | 0.94 | -1 | 0.94 | -1 |
| 3500 | 0.99 | 0.98 | 1 | 0.99 | 0 |

The retentions obtained in UF and DF modes for the considered molar masses were compared to retention of the corresponding molar mass obtained in total recirculation through the membrane calibration (Table 8). Table 8 shows that R from UF data fittings and R from the calibration curve (in total recirculation mode) are very close (1 % relative difference or less). Slight discrepancies can be noticed for low molar masses (600 and 900 g.mol⁻¹ with relative differences of 6 %). The same behavior is observed comparing R from calibration and from DF results regression except that for low molar mass, R values from DF are higher than calibration contrarily to UF. These results tend to indicate that the retention of large peptides remain the same during the process whatever the implementation mode. The retention of small peptides (far from the molar weight cut-off) probably change during the process (DF or UF), but the modification is probably very limited.

Figure 31 compares experimental relative concentrations in the course of the process in permeate (\overline{C}_p/C_0) and simulated relative concentrations using mass balance equations with

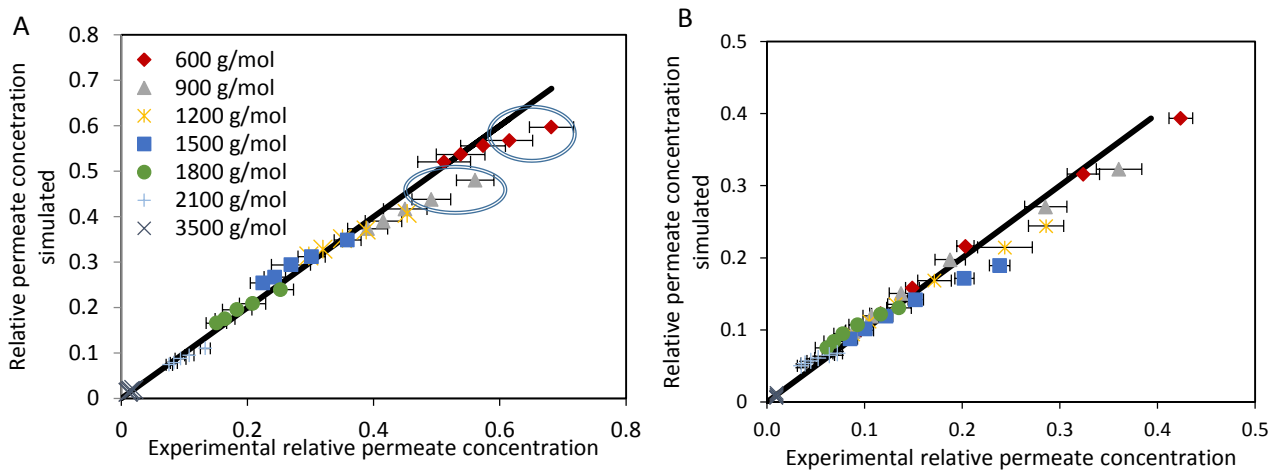


Figure 31. \overline{C}_p/C_0 simulated using mass balance equations and R from initial calibration curve for each molar masses are represented as a function of experimental \overline{C}_p/C_0 in UF (A) and DF (B) (10 g.L⁻¹ of Lactium®, 3 bar of TMP, 100 mL/min of recirculating rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane.

retention values from calibration curves. In DF mode (B), calculated and experimental values are very close, either indicating that there is no significant modification of R during the process or that the errors on R estimation have a poor impact on relative concentration calculations in DF. In UF mode, values are similar for largest peptides at any volume reduction factor (VRF). This is also the case for low molar mass peptides in the early stage of the process (up to 2). Interestingly, discrepancies are only observed at higher VRF (surrounded points). This confirms a discrete modification of low molar mass peptide transport in UF while largest peptides transport remains unchanged.

Peptide concentration and polarization layer resistance evolutions were monitored during UF and DF in order to discuss these results (Figure 32). In UF, the flux is constant (54 L/h/m²) until a VRF of 2, then just slight decreased (- 12 %) until VRF 5. Consequently, the polarization layer resistance increases from 3.6 x 10¹² to 4.85 x 10¹² m⁻¹ while retentate concentration continually increases from 8 g.L⁻¹ to 35 g.L⁻¹. Eventually, a simple membrane wash with deionized water is sufficient to get back to the starting membrane resistance (1.7 ± 0.1 x 10¹³ m⁻¹), suggesting that no irreversible fouling occurred. The increase of the polarization layer resistance at high VRF is probably due to an increase of concentration at the membrane surface in the course of UF. However, we observed that an increase of concentration only does not modify the peptide transfer (Figure 28 B). So the modification of low molar mass peptide transport during the UF should be explained otherwise. The change of peptide composition at the retentate side of the membrane may provoke a change in the structure of the polarization layer that impacts the smallest peptides (like when modifying TMP).

In DF mode, there is a moderate decrease of peptide concentration and a slight (may be insignificant) decrease in resistance (Figure 32 B). These slight modifications in polarization layer probably explain the poor modification of peptide transport during DF.

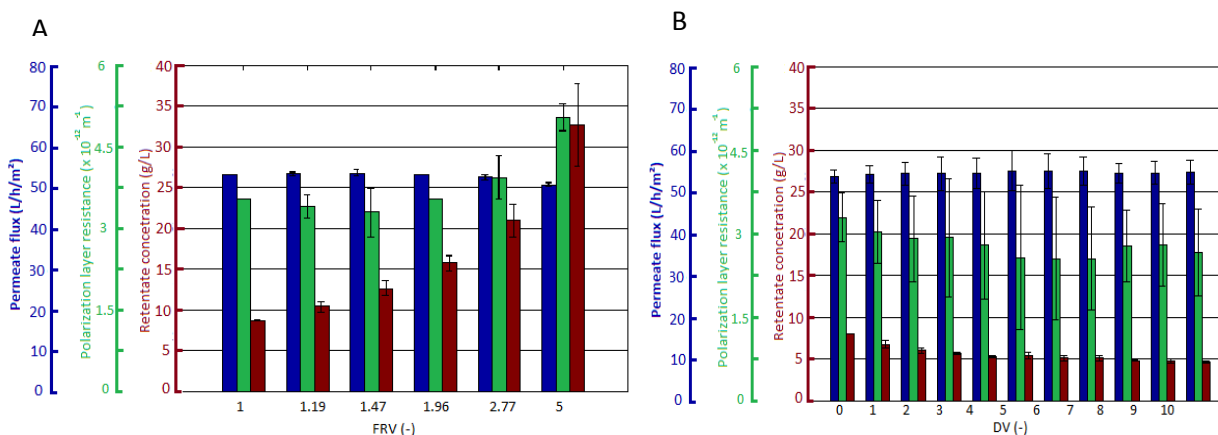


Figure 32. Permeate flux (blue), polarization layer resistance (green) and total retentate concentration (red) during batch concentration (A) and diafiltration (B) of Lactium® (10 g.L⁻¹, 3 bar of TMP, 100 mL.min⁻¹ of recirculating rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane. Experiments were performed after 20 minutes of total recirculation.

III.3.3. Performances of UF and DF fractionation as a function of peptide molar masses

The yield and the enrichment of different classes of molar mass were calculated from the SE-HPLC analysis to compare the performances of UF and DF.

- Permeate

Figure 33 displays the yield and the enrichment of the different classes of molar mass, in permeate during concentration and diafiltration. In both implementation modes, the yield and enrichment of class of molar mass are directly related to their size range. The largest molar masses present the lowest yields, whereas the smallest molar mass (600 g.mol⁻¹) shows the best yield and enrichment.

During concentration, the yield in permeate increases for all classes of molar mass or

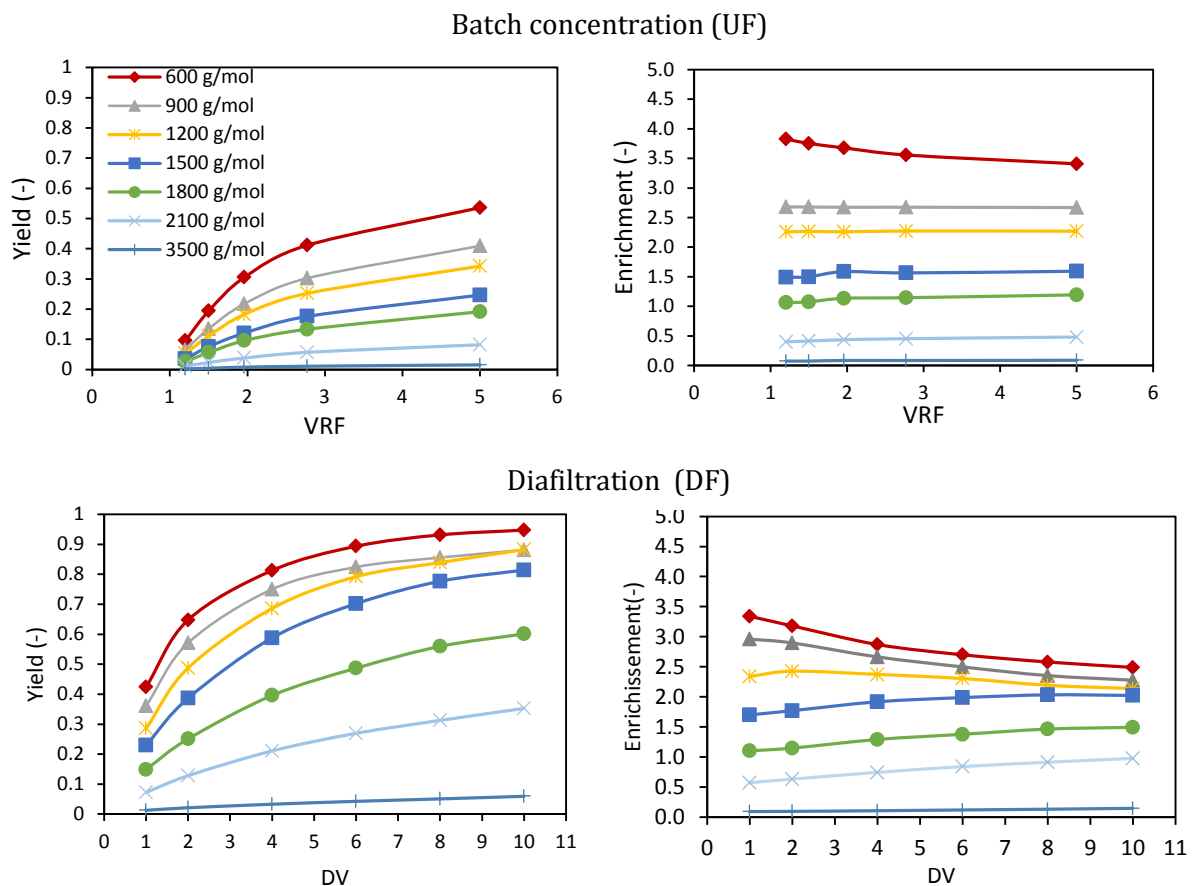


Figure 33. Yield and enrichment in permeate of molar masses monitored by SE-HPLC during UF and DF of Lactium® (10 g.L⁻¹, 3 bar of TMP, 100 mL.min⁻¹ of recirculating rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane.

targeted peptide whereas the enrichment is almost constant. In diafiltration, better yield are obtained. This result was expected because of the addition of water in retentate flushing out small solutes in permeate. Interestingly, the enrichment of small peptides decreases During DF whereas the enrichment of larger peptide (above 1500 g.mol⁻¹) grows continually. The enrichment of all classes of molar mass would actually tend towards the same value when all the peptides transferred in permeate reached a yield of 100 %.

What is interesting in this result is that yield superior to 80 % can be obtain in diafiltration for peptides below 1000 g.mol⁻¹ with an enrichment similar to concentration experiment. For example, the molar mass class of 900 g.mol⁻¹ is recovered in permeate at 80 % after 6 DV for an enrichment above 2.5. The same enrichment can be obtained in concentration at a VRF of 5 but for a yield of around 40 %.

- Retentate

The results of yields and enrichments in retentate during both implementations are presented in Figure 34. Regarding the yield, it clearly appears that the diafiltration enables to

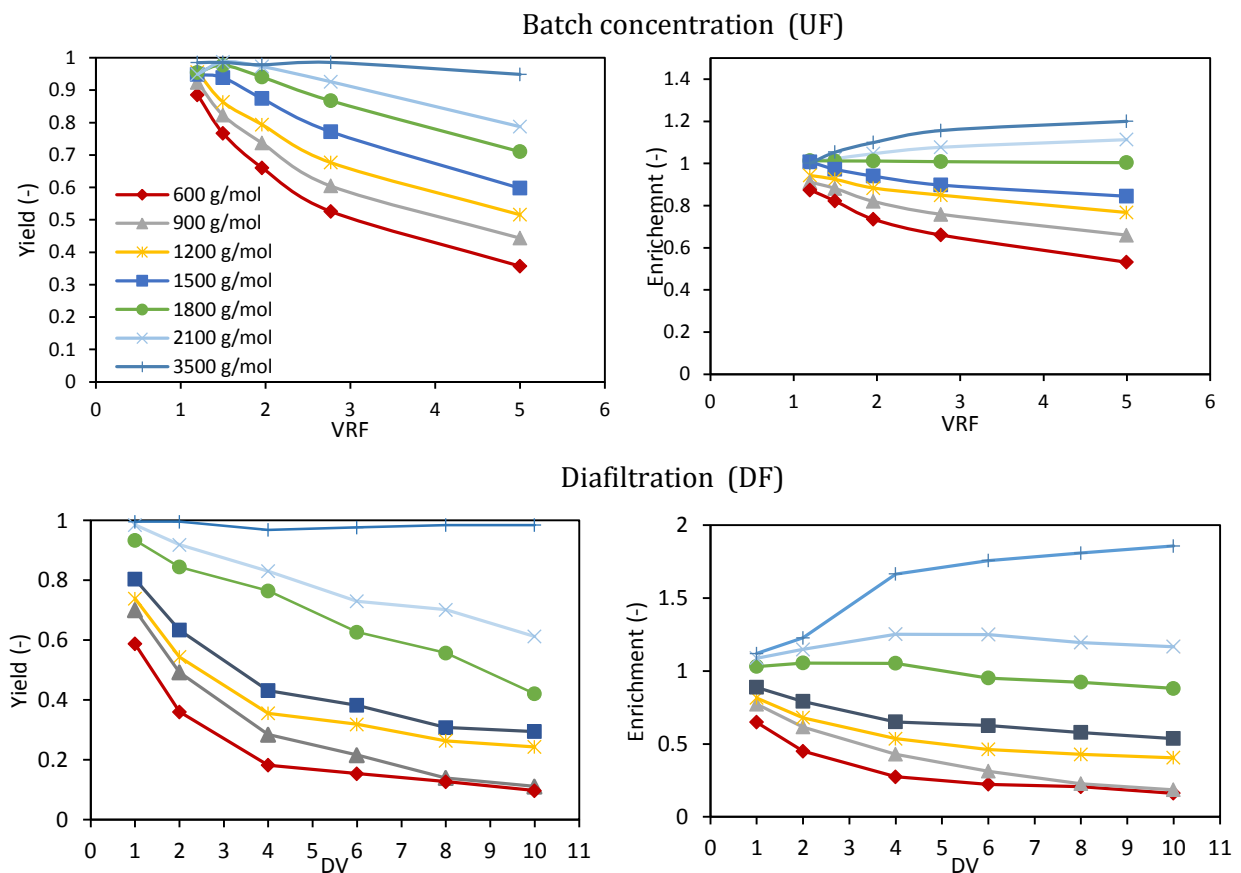


Figure 34. Yield and enrichment in retentate of molar masses monitored by SE-HPLC during UF and DF of Lactium® (10 g.L⁻¹, 3 bar of TMP, 100 mL.min⁻¹ of recirculating rate) on a 3 kDa regenerated cellulose membrane.

largely eliminate the molar masses below the MWCO of the membrane from the retentate compartment. Consequently, molar masses above 3000 g.mol⁻¹ can be enriched in retentate during diafiltration, contrary to batch concentration during which the enrichment is very limited in retentate. The enrichment in diafiltration would increase as long as small peptides are eliminated. In UF, only the permeate fraction is enriched in some molar masses compared to the initial hydrolysate. The use of diafiltration enables to obtain two fractions completely different to the initial mixture and potentially with two different functionality and or bioactivity.

These results in permeate and retentate show the benefit of diafiltration to improve the fractionation of hydrolysates. However, the addition of water during DF leads to a dilution of fractions. Upon the final application, a concentration step might be required after membrane fractionation upon the final application. Moreover, the time needed to achieve diafiltration performances is relatively longer. These drawbacks would increase the global cost of diafiltration process.

Conclusion chapitre III (apport de la pré-publication)

En résumé

L'étude du fractionnement du Lactium® sur une membrane en cellulose régénérée de 3 kDa a été détaillée dans ce chapitre, rédigée sous forme de pré-publication. Premièrement, il a été montré que le transfert d'un peptide était régi majoritairement par sa taille. Sa rétention par la membrane peut donc être reliée à sa masse molaire et être évaluée grâce à un étalonnage en chromatographie d'exclusion stérique. Le flux de solvant initial, à travers la membrane, lui, dépend de la concentration globale en peptides dans le rétentat, de la pression transmembranaire et de la vitesse tangentielle.

Dans un deuxième temps, il a été conclu que la rétention d'un peptide pouvait être raisonnablement considérée constante au cours de l'UF et de la DF. Le flux de perméat, lui, tend à diminuer avec l'augmentation de la concentration dans le rétentat. Cependant, le changement de composition en peptides dans le rétentat, au cours du procédé, semble également influencer la structure de la couche de polarisation augmentant sa résistance. Ainsi, le flux de perméat en DF est constant malgré la diminution de la concentration en peptides.

Enfin, les rendements et enrichissements de différentes masses molaires, suivies par CES, ont été comparés en UF et en DF. L'utilisation de la diafiltration permet d'atteindre des rendements proches de 100 % en petits peptides pour un enrichissement similaire à celui atteint en UF. Dans le rétentat, la DF permet d'augmenter la pureté de la fraction retenue grâce à l'élimination totale des petits peptides.

L'UF permet à la fois de concentrer la fraction retenue et de récupérer une fraction enrichie en petits peptides, alors que la DF permet de séparer le mélange en deux familles de masses molaires distinctes. Lorsque les propriétés d'un hydrolysat peuvent être reliées à une famille de masses molaires ou un peptide ciblé, la mise en œuvre de l'UF ou de la DF peut être discutée. Pour un choix rationnel, intégrant des critères de performances économiques, la modélisation du procédé est requise et fait l'objet de la suite de ce travail.

CHAPITRE IV

Modélisation des performances de l'ultrafiltration pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques

Introduction

Le développement de modèle de prédiction des performances de l'ultrafiltration pour la production de fractions peptidiques d'intérêt s'inscrit dans une démarche globale de valorisation rationnelle des ressources protéiques. La modélisation de l'ultrafiltration doit permettre de déterminer la pertinence du procédé pour le traitement d'un mélange donné et optimiser sa mise en œuvre. La résolution des équations de bilans de matière requiert de connaître la rétention de chaque peptide de l'hydrolysate. Pour une modélisation basée sur des principes théoriques du transfert membranaire, une caractérisation précise de la membrane et les propriétés physico-chimiques de chaque peptide sont nécessaires. Ces données sur les hydrolysats ne sont souvent pas accessibles de par la complexité des mélanges. La modélisation des interactions inter-solutés et solutés / membrane et des phénomènes de transfert est alors complexe.

Ce chapitre propose une méthodologie de prédiction originale de prédiction du rendement et de l'enrichissement d'une fraction ou d'un peptide cible en fonction du FRV (en concentration discontinue) ou du DV (en diafiltration). D'après les résultats expérimentaux observés dans le chapitre précédent, plusieurs hypothèses sont faites :

- La rétention d'un peptide est régie par sa masse molaire.
- La rétention d'un peptide est considérée constante au cours de l'ultrafiltration en UF et en DF.
- La rétention d'un peptide peut être prédite par un étalonnage de la membrane obtenu par l'analyse en chromatographie d'exclusion stérique du perméat et du rétentat en recirculation totale dans une condition opératoire donnée.

La stratégie de prédiction des performances de l'ultrafiltration est détaillée dans le chapitre matériel & méthodes (§ II.3). Elle est basée sur les hypothèses précédentes et les équations de bilan de l'ultrafiltration (Rappel, Tableau 2). La stratégie, résumée sur la Figure 35, peut se décomposer en 4 étapes :

- la membrane est étalonnée avec l'hydrolysate étudié ;
- la prédiction de la rétention d'un peptide ou d'une masse molaire à partir de l'étalonnage de la membrane permet de simuler directement sa concentration relative et son rendement dans les compartiments au cours de l'ultrafiltration à partir des bilans de matière ;

- la concentration globale en peptides dans les compartiments est ensuite simulée. Pour cela, la méthodologie développée se base sur le chromatogramme d'exclusion stérique de l'hydrolysats initial. A chaque point du profil, considéré comme un mélange de peptides ayant la même masse molaire, est associée une rétention à partir de l'étalonnage de la membrane. Les chromatogrammes d'exclusion stérique du rétentat et du perméat sont alors prédits en appliquant les bilans de matière à chaque point du profil initial. La concentration globale en peptides est alors obtenue par intégration des profils simulés grâce à la méthode de quantification des fractions peptidiques développées (§ II.6.4) ;
- la prédiction de l'enrichissement du peptide ou de la masse molaire cible dans le perméat ou le rétentat est obtenue à partir de sa rétention et des concentrations globales.

Rappel : Tableau 2. Formules du rendement et de l'enrichissement dans le perméat et dans le rétentat en concentration et en diafiltration.

| | | Rendement (η_i) | Facteur d'enrichissement (τ_i) | Concentration relative $\frac{\bar{c}_{p,i}}{c_{0,i}}$ ou $\frac{c_{r,i}}{c_{0,i}}$ |
|--------------------|----------|--|---|---|
| Concentration (UF) | Perméat | $\frac{\bar{c}_{p,i}}{c_{0,i}} \times \left(1 - \frac{1}{VRF}\right)$ (Eq. 39) | $\frac{\bar{c}_{p,i}}{c_{0,i}} \times \frac{\sum_j c_{0,j}}{\sum_j \bar{c}_{p,j}}$ (Eq. 43) | $\frac{FRV - FRV^{R_i}}{FRV - 1}$ (Eq. 47) |
| | Rétentat | $\frac{c_{r,i}}{c_{0,i}} \times \left(\frac{1}{VRF}\right)$ (Eq. 40) | $\frac{c_{r,i}}{c_{0,i}} \times \frac{\sum_j c_{0,j}}{\sum_j c_{r,j}}$ (Eq. 44) | FRV^{R_i} (Eq. 48) |
| Diafiltration (DF) | Perméat | $\frac{\bar{c}_{p,i}}{c_{0,i}} \times DV$ (Eq. 41) | $\frac{\bar{c}_{p,i}}{c_{0,i}} \times \frac{\sum_j c_{0,j}}{\sum_j \bar{c}_{p,j}}$ (Eq. 45) | $\frac{1 - e^{(R_i-1) \times DV}}{DV}$ (Eq. 49) |
| | Rétentat | $\frac{c_{r,i}}{c_{0,i}}$ (Eq. 42) | $\frac{c_{r,i}}{c_{0,i}} \times \frac{\sum_j c_{0,j}}{\sum_j c_{r,j}}$ (Eq. 46) | $e^{(R_i-1) \times DV}$ (Eq. 50) |

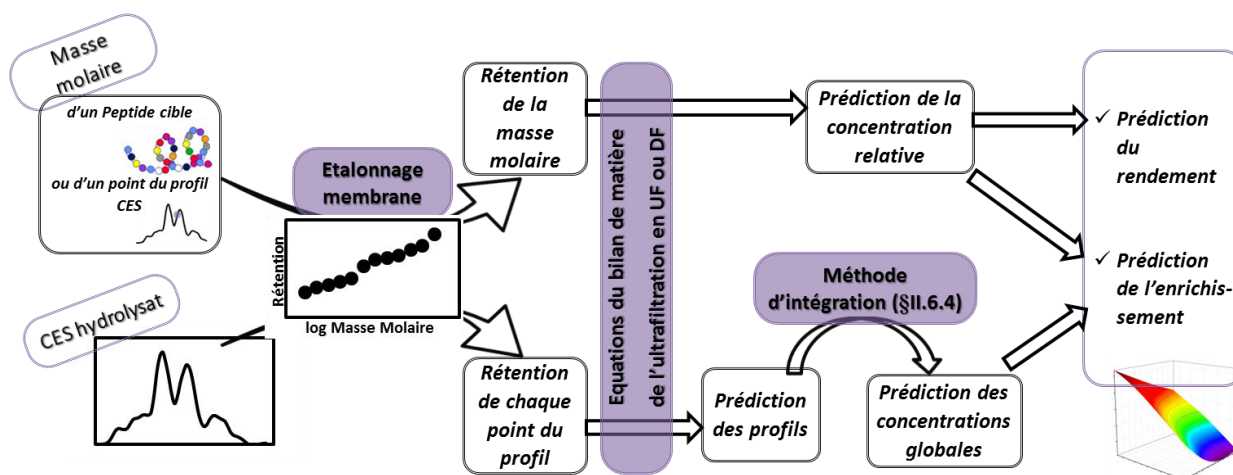


Figure 35. Résumé de la stratégie de modélisation de l'ultrafiltration

L'objectif de ce chapitre est de valider ces hypothèses et cette stratégie. La démarche de validation est résumée dans la Figure 36. Dans un premier temps, les rendements et enrichissements expérimentaux de différentes classes de masses molaires du Lactium®, suivies par chromatographie d'exclusion stérique, seront comparés aux résultats de simulation. Puis, la validation sur des peptides du Lactium® et d'hydrolysats d'hémoglobine bovine ciblés par CLHP-SM sera présentée sous-forme de pré-publication. Enfin, l'influence des variations des conditions opératoires sur la précision de la stratégie de modélisation sera étudiée.

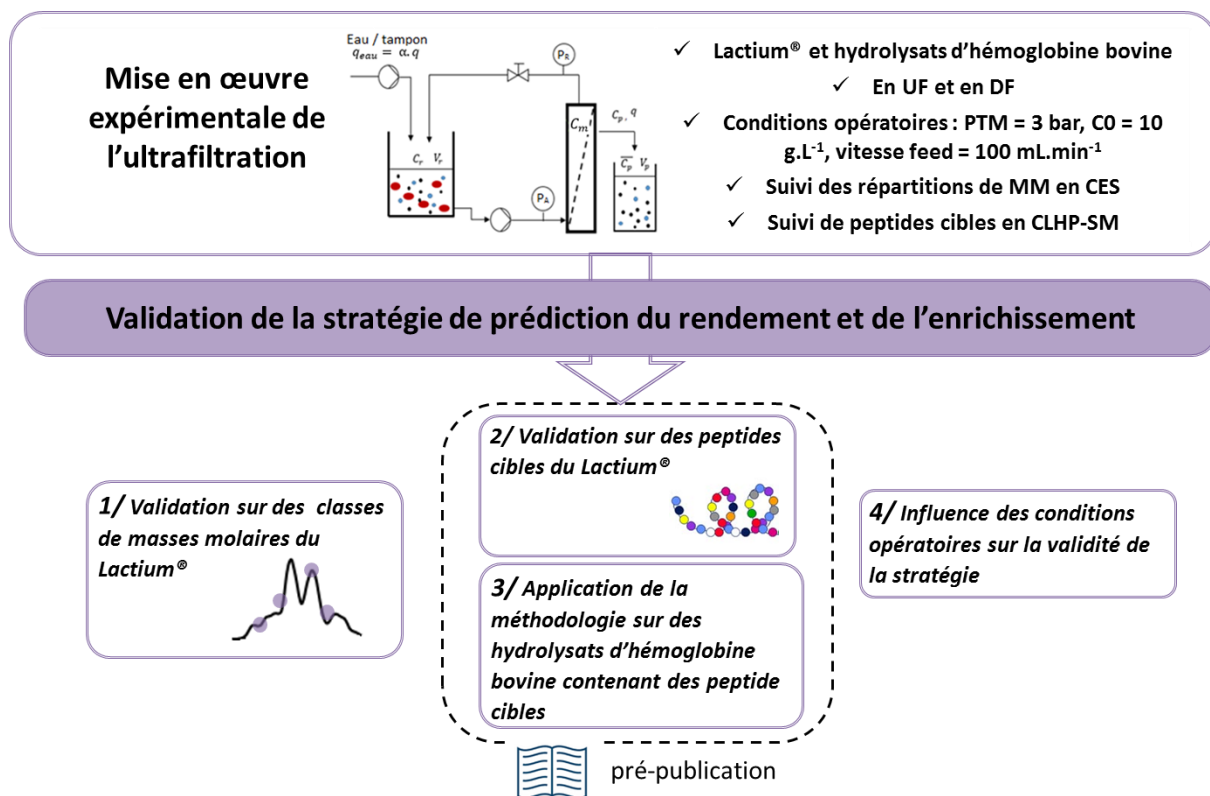


Figure 36. Etapes de validation de la stratégie de prédiction des performances de l'ultrafiltration

IV.1. Validation de la méthodologie sur des classes de masses molaires suivies en chromatographie d'exclusion stérique

Dans cette partie, la stratégie de prédiction est appliquée pour prédire le rendement et l'enrichissement, au cours de l'UF et de la DF, de différentes classes de masses molaires, représentées par un point du chromatogramme d'exclusion stérique de l'hydrolysats. Sept masses molaires du profil du Lactium® (Figure 37) ont été suivies au cours du fractionnement sur la membrane de 3 kDa en cellulose régénérée. Les résultats du chapitre précédents ayant montré que l'influence des conditions opératoires sur la sélectivité de la membrane est négligeable, la pression transmembranaire (3 bar) et le débit de recirculation de rétentat (100 mL.min⁻¹) ont été choisis dans cette étude pour maximiser le flux de perméat.

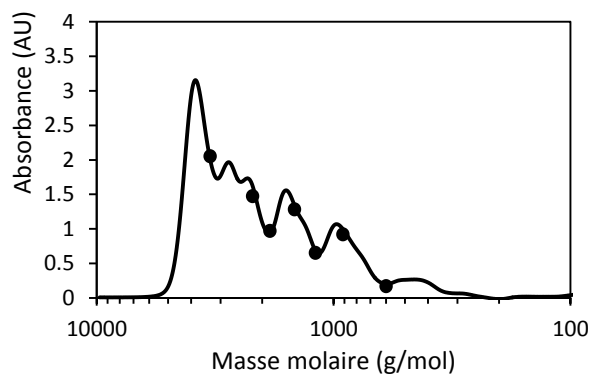


Figure 37. Chromatogramme d'exclusion stérique (colonne Superdex peptide) du Lactium® et les masses molaires suivies

IV.1.1. Etalonnage de la membrane

La première étape de la méthodologie est d'étalonner la membrane à partir des profils CES du perméat et du rétentat initiaux. La courbe d'étalonnage a été présentée précédemment (Figure 27 C, p 83) et l'équation suivante a été établie :

$$\left[\begin{array}{l} R_i = 0.72 \times \log(MM_i) - 1.51 \\ \text{Si } R_i > 1, \text{ alors } R_i \text{ est fixé à } 1. \end{array} \right. \quad (\text{Eq 74})$$

IV.1.2. Prédiction des rendements

La rétention d'une masse molaire du mélange est prédite à partir de l'équation d'étalonnage, puis le bilan matière de l'UF ou de la DF est appliqué sur le point du chromatogramme d'exclusion stérique de l'hydrolysats initial correspondant à cette masse molaire. La comparaison des rendements expérimentaux et simulés est présentée dans la Figure 38.

La prédiction des rendements dans le perméat de l'UF sont très satisfaisants pour toutes les masses molaires ciblées. Dans le chapitre précédent, il a été montré que les concentrations relatives \bar{C}_p/C_o étaient simulées convenablement pour les masses molaires proches du seuil de coupure et de légères déviations étaient observées pour les plus faibles masses molaires en UF. Ces déviations sont minimales sur la prédiction du rendement et confirment que le transfert des solutés à travers la membrane peut être considéré constant au cours de l'ultrafiltration.

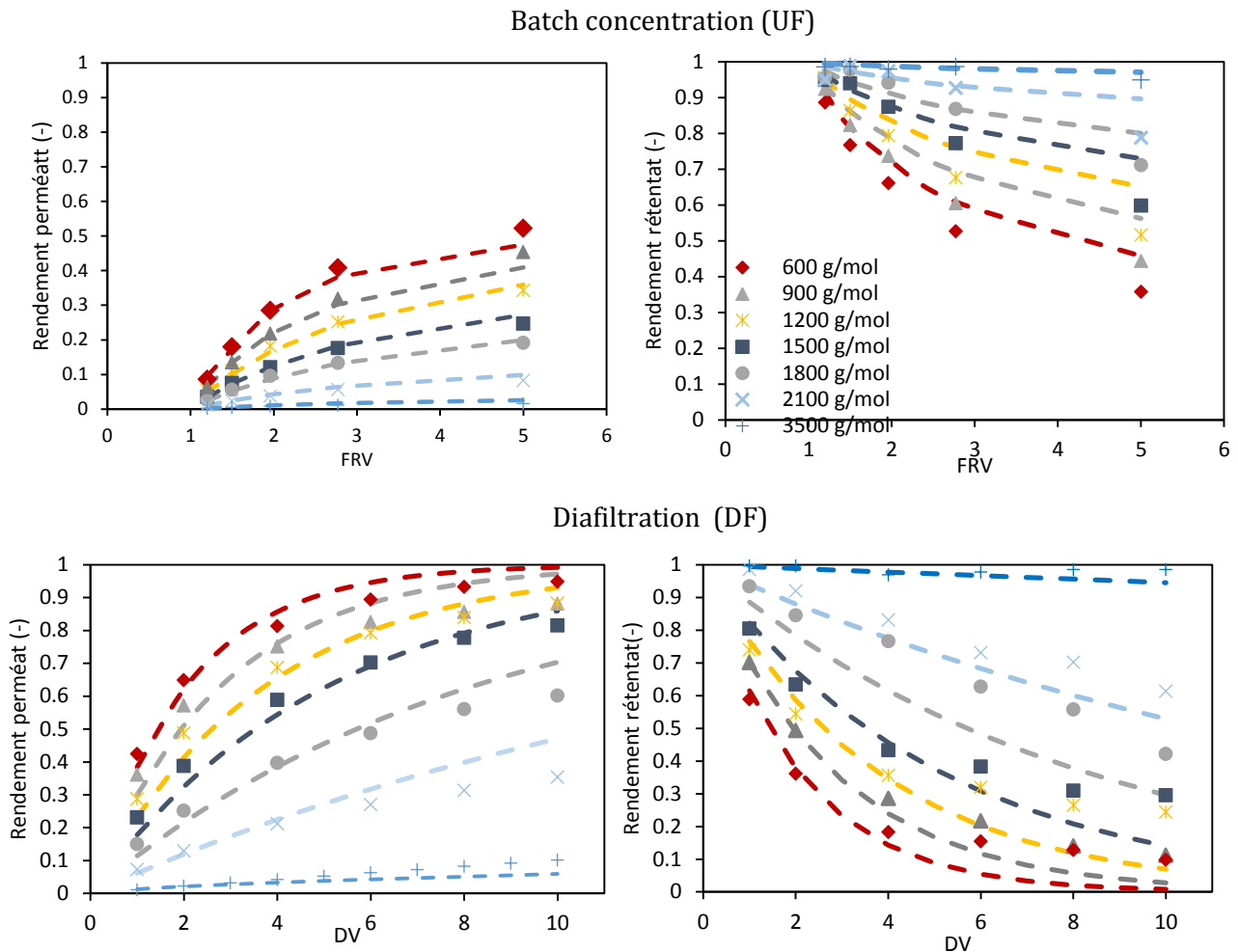


Figure 38. Comparaison des rendements expérimentaux (symboles) et prédits (tirets) dans le perméat (gauche) et le rétentat (droite) de sept masses molaires au cours de l'UF et de la DF du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée ($C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $PTM = 3 \text{ bar}$, débit de recirculation = 100 mL.min^{-1})

Dans le rétentat, une bonne prédiction des rendements est observée en début d'UF, puis une légère surestimation est observée. Un écart maximal de 28 % est obtenu. Cette déviation est certainement due à une légère accumulation des peptides à la surface de la membrane au cours de l'UF. Le bilan matière calculé au cours de l'UF montre en effet une perte de matière d'environ 10 % à un FRV de 5. Dans le chapitre précédent, la régression des valeurs de rétentions des

différentes masses molaires a été réalisée sur les concentrations relatives expérimentales obtenues dans le perméat. Les valeurs de concentrations relatives dans le rétentat ne permettaient pas d'obtenir une régression satisfaisante de la rétention apparente, à cause de cette légère accumulation de matière en surface de membrane. Les bonnes prédictions dans le perméat indiquent néanmoins un transfert constant à travers la membrane et indiquent que la rétention réelle des solutés est constante au cours de l'UF.

En diafiltration, une bonne prédiction des rendements est observée en début de DF dans le perméat et le rétentat pour toutes les masses molaires suivies. Après 6 diavolumes, les rendements sont légèrement surestimés dans le perméat et sous-estimés dans le rétentat. Ces déviations montrent que les rétentions ne sont pas parfaitement constantes et qu'une légère erreur d'estimation de la rétention engendre des erreurs plus conséquentes sur les rendements en diafiltration. Par ailleurs, les concentrations étant très faibles pour certaines masses molaires en fin de DF, certaines erreurs peuvent être liées à la sensibilité de l'analyse en chromatographie d'exclusion stérique. Toutefois, l'erreur relative maximale de prédiction du rendement est de 35 % et la majorité des rendements est prédits avec moins de 20 % d'erreur. La précision de la méthodologie est donc satisfaisante au regard de la complexité des mélanges.

IV.1.3. Prédiction des enrichissements

La prédiction de l'enrichissement nécessite le calcul de la concentration globale des fractions au cours du procédé. La simulation de l'évolution des répartitions de masses molaires dans les compartiments permet ensuite de prédire les concentrations globales grâce à la méthode de quantification des mélanges peptidiques (§ II.6.4).

IV.1.3.1. Prédiction des profils de masses molaires

La simulation des profils de masses molaires dans le perméat et le rétentat au cours de l'UF (à FRV 1.19 et FRV 5) et de la DF (à DV 1 et DV 10) est présentée dans la Figure 39. Globalement, une très bonne prédiction des distributions des masses molaires est obtenue dans le perméat et le rétentat, en UF et en DF. Une légère déviation est observée en fin de concentration discontinue (FRV 5) dans le rétentat. La surestimation du profil de rétentat confirme la tendance observée pour le rendement des masses molaires ciblées dans le rétentat et l'hypothèse d'une légère accumulation des peptides à la surface de la membrane au cours de l'UF. En diafiltration, le profil prédit dans le perméat à DV 10 est sensiblement erroné pour les masses molaires supérieures à 1800 g.mol⁻¹ (éluées avant 26 minutes). Cette observation suggère que le modèle est moins précis pour les masses molaires proches du seuil de coupure de la membrane.

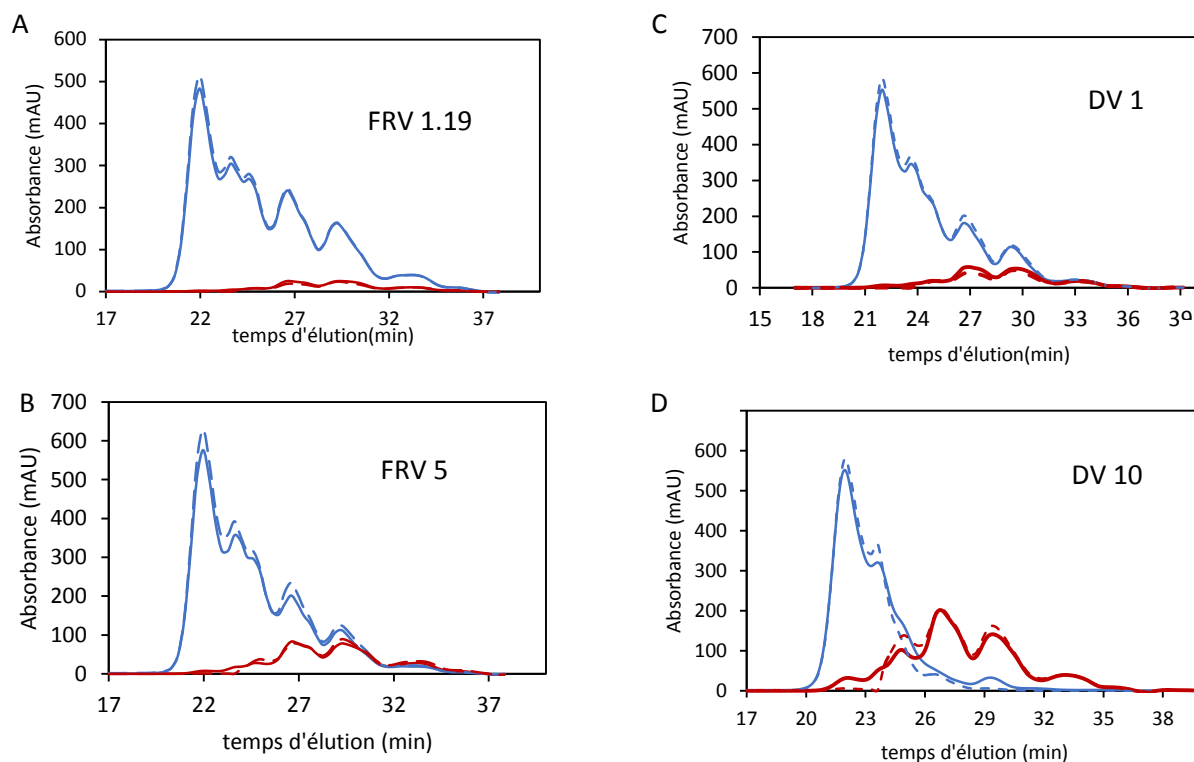


Figure 39. Chromatogramme d'exclusion stérique du rétentat (bleu) et du perméat (rouge) en concentration discontinue (A et B) et en diafiltration (C et D) du Lactium®. Comparaison des profils expérimentaux (ligne) et simulés (tiret). Conditions opératoires : $C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $PTM = 3 \text{ bar}$, débit de recirculation = 100 mL.min^{-1})

IV.1.3.2. Prédiction des concentrations globales des fractions

La prédiction des concentrations globales des fractions dans le perméat et le rétentat est obtenue par intégration des profils de masses molaires au cours de l'UF et de la DF grâce à la méthode de quantification des mélanges peptidiques validée précédemment (§II.6.4). La Figure 40 montre l'évolution des concentrations globales. La bonne prédiction des profils de masses molaires présentés plus haut se traduit par une bonne estimation des concentrations dans les compartiments de l'ultrafiltration (moins de 15 % d'erreurs relatives).

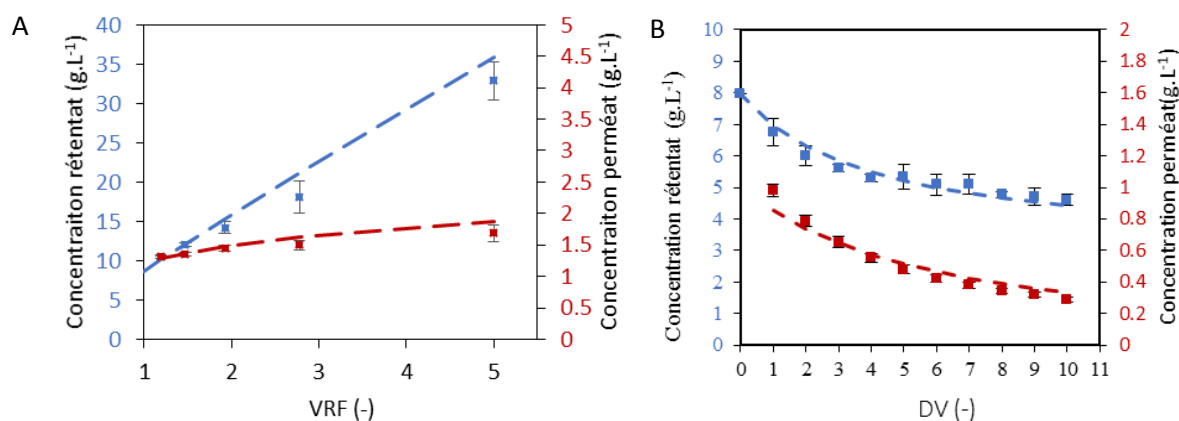


Figure 40. Concentration globale en peptides dans le rétentat (bleu) et le perméat (rouge) au cours de l'UF (A) et de la DF (B) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa. Comparaison de la simulation (tiret) et des valeurs expérimentales (symboles).

IV.1.3.3. Prédiction des enrichissements de masses molaires ciblées

La Figure 41 compare les enrichissements expérimentaux et prédits des sept masses molaires sélectionnées sur le chromatogramme d'exclusion stérique du Lactium®. La stratégie de prédiction apparaît efficace pour prédire les enrichissements. Dans le rétentat d'UF, il est intéressant de noter que la surestimation du rendement aux FRV élevés est compensée par la surestimation de la concentration totale et une bonne prédiction des enrichissements est obtenue. De plus, les erreurs relatives les plus importantes (35 %) sont obtenues dans le rétentat de DF pour les masses molaires proches du seuil de coupure. Cette déviation est directement liée aux erreurs de prédiction du rendement observé en DF.

IV.1.4. Conclusion

En résumé, l'ensemble des rendements et enrichissements des classes de masses molaires suivies en CES peuvent être prédits avec une erreur relative maximale de 35 %. Ces erreurs restent acceptables compte tenu de la complexité du mélange initiale et de la simplicité de la stratégie. Il est alors possible de prédire les performances de l'ultrafiltration pour enrichir une fraction avec une classe de masses molaires données. Cette méthode peut alors être très utile quand une famille de masses molaires est liée à une propriété nutritive ou fonctionnelle.

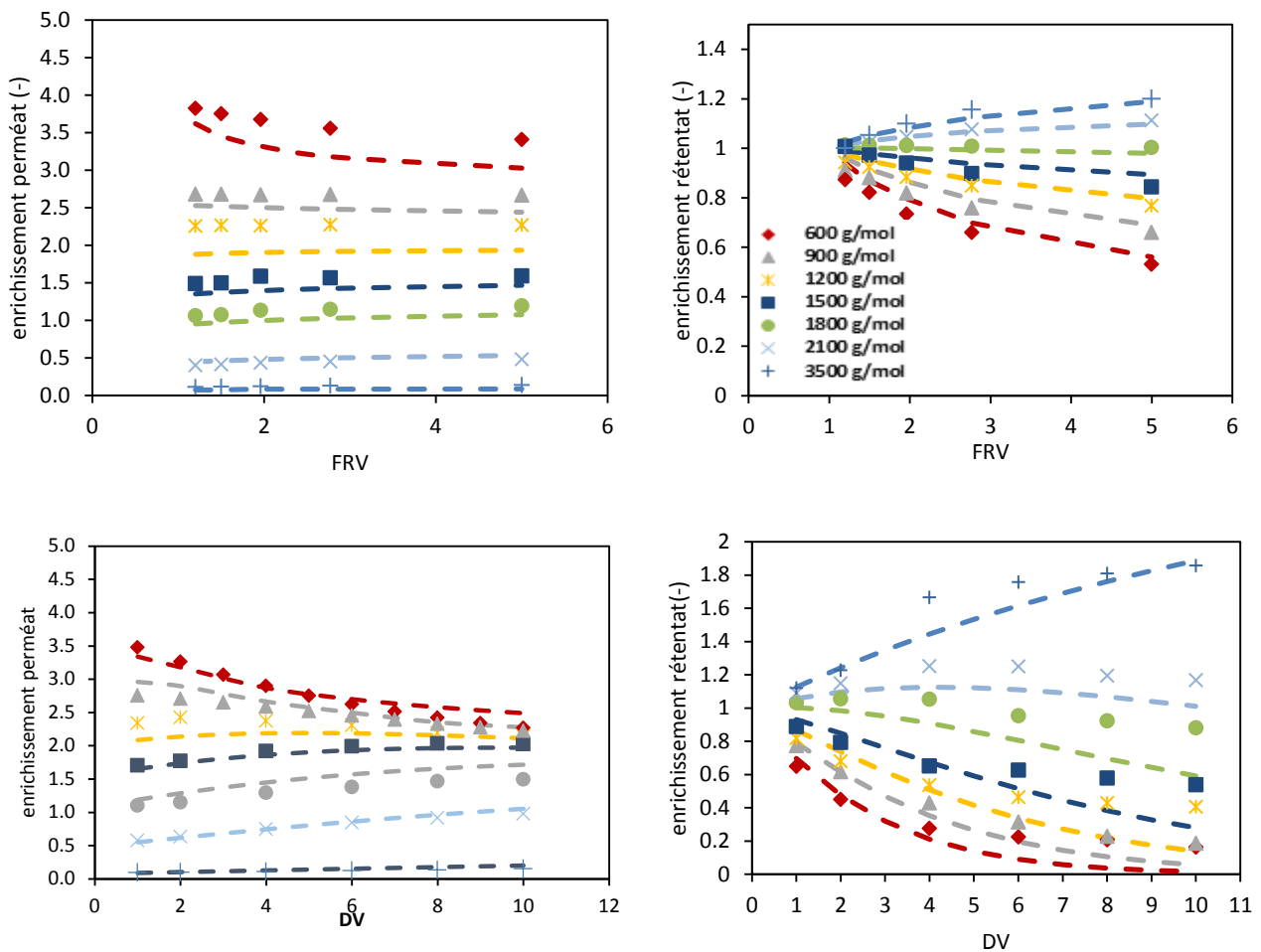


Figure 41. Comparaison des enrichissements expérimentaux (points) et prédits (tirets) dans le perméat (gauche) et le rétentat (droite) de sept masses molaires au cours de l'UF et de la DF du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée ($C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $PTM = 3 \text{ bar}$, débit de recirculation = 100 mL.min^{-1})

IV.2. Validation de la méthodologie sur des peptides cibles suivis par CLHP-SM

La stratégie de prédiction des performances de l'ultrafiltration a été validée dans la partie précédente sur des masses molaires représentées par un point du chromatogramme CES. Dans le manuscrit qui suit, la méthodologie sera validée avec des peptides réels des mélanges suivis par CLHP-SM. Sept peptides du Lactium® seront ciblés dans le perméat et le rétentat d'UF et de DF. Trois peptides bioactifs d'hydrolysats d'hémoglobine bovine seront également suivis pour illustrer les applications potentielles de la méthodologie.

Manuscript: Fractionation of a casein hydrolysate by tangential filtration using a 3 kDa regenerated cellulose membrane. Part II: Yield and enrichment prediction of targeted peptides in UF and DF

Alice Bodin, Xavier Framboisier, Frantz Fournier, Ivan Marc, Romain Kapel

IV.2.1. Introduction

The interest for bioactive peptides present in protein hydrolysates is continually growing for their potential use in high-values sectors, such as nutraceutical industry, food safety and culture media (Arroume *et al.*, 2016; Chabanon *et al.*, 2008; Hashmi *et al.*, 2010; Korhonen and Pihlanto, 2006). A wide range of bioactive properties has been attributed to peptides like antimicrobial (Benkerroum, 2010; López-Expósito *et al.*, 2006), antihypertensive (He *et al.*, 2013a; Kapel *et al.*, 2006) or antioxidative (Alashi *et al.*, 2013; Chay Pak Ting *et al.*, 2011; Ranamukhaarachchi *et al.*, 2013; Sarmadi and Ismail, 2010), anxiolytic (Beata *et al.*, 2007) or opioidic (Kong *et al.*, 2008) activities. However, the bioactivity of hydrolysates is often limited by the presence of many inactive peptides and the low purity of the bioactive peptides in raw hydrolysate.

Ultrafiltration is therefore frequently used for the enrichment of hydrolysates in bioactive peptides (He *et al.* 2013; Alashi *et al.* 2014; Ranamukhaarachchi, *et al.* 2013; Power *et al.* 2014; Holder *et al.* 2013; Akin *et al.* 2012; Picot *et al.* 2010). Based on the transfer of solute through porous membrane driven by a transmembrane pressure, the molecules retained by the membrane are recycled in the retentate and the molecules passing through are collected in the permeate. For the fractionation of hydrolysate, ultrafiltration in batch concentration mode (UF) is widely used. This implementation is characterized by a reduction of the retentate volume during experiments that leads to a concentration of retained solutes and an enrichment of small solutes in permeate. Continuous diafiltration (DF) is rarely used because of the addition of water to keep retentate volume constant, causing the dilution of permeate. However, this implementation enables to improve the yield of peptides in permeate and the enrichment of large peptides in retentate (Bodin *et al.*, submitted).

The lack of prediction tool of UF or DF separation performances, in terms of yield and enrichment of a targeted peptide in a complex hydrolysate, is a major issue in order to decide rationally whether tangential filtration would be useful for enriching a mixture of interest in a targeted peptide and establish appropriate molecular weight cut-off membrane and implementation (DF or UF). Chabeaud *et al.* (2009b) proposed to base the choice of membrane

molecular weight cut-off on overall peptide retentions. They demonstrated that overall peptide retention between 0.4 and 0.7 ensures a well-balanced repartition of peptides between retentate and permeate. These authors also proposed a calibration method of membrane based on size-exclusion chromatography (SEC) of permeate and retentate to relate the retention rate of peptides to their molar masses (Chabeaud *et al.*, 2009a, 2009b). We recently proposed an original methodology to predict yield and enrichment of targeted peptides (Kapel *et al.*, 2011). The methodology combines the peptide molecular mass distribution of a hydrolysate assessed by size exclusion chromatography, UF or DF mass balance equation and membrane calibration as proposed by chabeaud *et al.* (2009a, 2009b). This methodology was validated with experimental enrichment and yield of a bioactive peptide (antihypertensive peptide Val-Trp) in the permeate compartment during batch concentration of an alfalfa white protein hydrolysate using a 1 kDa NMWCO membrane.

The aim of the present work was to further validate this methodology with another mixture, another MWCO membrane, in both compartments (permeate and retentate) and for the two implementations (UF and DF). The mixture used is a commercial bovine α_{s1} -casein tryptic hydrolysate (Lactium®). First, predicted and experimental enrichment factor and yield of six peptides having molar mass ranging from 780 to 1760 g.mol⁻¹ were monitored in the different compartments and implementation modes. Then, some examples of use of the methodology are presented. The yield and the enrichment in permeate of a bioactive peptide in Lactium®, the α -casozepine (sequence 91-100 of the α_{s1} -casein (Cakir-Kiefer *et al.*, 2011; Miclo *et al.*, 2001)), are compared in UF and DF. The enrichments of two bioactive peptides present in bovine hemoglobin hydrolysates with two different degree of hydrolysis are also predicted.

IV.2.2. Methodology of UF prediction performances

(Se reporter au chapitre II § de ce manuscrit).

IV.2.3. Material and methods

IV.2.3.1. Material

HPLC grade eluents (water and acetonitrile) were both purchased from Fisher Scientific (Geel, Belgium). Trifluoroacetic acid was obtained from Arcos Organics (Geel, Belgium). Sodium hydroxide pellets were supplied by Carlo Erba Reactifs (Val de Reuil, France). Peptides from chemical synthesis used for the column calibration were obtained from GeneCust (Dudelange, Luxembourg).

Lactium® was provided in spray-dried powder by Ingredia SA (Arras, France). Lactium® was microfiltrated with 0.22 μ m membrane and lyophilized before ultrafiltration experiments to

eliminate insolubilities. From the aminogram provided by the supplier, a mean molar mass by amino acid \overline{MM}_{aa} and a mean molar extinction coefficient by amino acid $\overline{\varepsilon}_{aa}$ were calculated as required for the prediction methodology. Values of \overline{MM}_{aa} and $\overline{\varepsilon}_{aa}$ were 115 g.mol⁻¹ and 987 L.mol⁻¹.cm⁻¹, respectively. Lactium® contains a bioactive peptide (α -casozepine, MM = 1267 g.mol⁻¹).

Bovine hemoglobin hydrolysates were supplied by ProBioGem laboratory (Lille) and produced as previously reported (Przybylski *et al.*, 2016). Values of \overline{MM}_{aa} and $\overline{\varepsilon}_{aa}$ were 126 g.mol⁻¹ and 780 L.mol⁻¹.cm⁻¹, respectively. These hydrolysates contained three bioactive peptides. VVh-7 (VVYPWTQRF, MM = 1195 g.mol⁻¹) and LVVh-7 (L VVYPWTQRF, MM = 1308 g.mol⁻¹) have opioid activity (Kapel *et al.*, 2011). The neokytrophenin (TSKYR, MM = 654 d.mol⁻¹) is an antimicrobial peptide (Przybylski *et al.*, 2016).

IV.2.3.2. Ultrafiltration experiments

Ultrafiltration experiments in batch concentration and continuous diafiltration modes were performed with a regenerated cellulose UF membrane (MWCO of 3 kDa, surface of 88 cm², Millipore, Billerica, USA). Experiments were conducted on a Cogent μ Scale TFF system (Millipore) at a transmembrane pressure of 3 bar, at room temperature (22 °C +/- 2 °C). The initial volume and concentration of Lactium® were 0.2 L and 10 g.L⁻¹, respectively. The recirculation velocity was 100 mL.min⁻¹. The permeate was collected after 20 minutes of total recirculation to stabilize the polarization layer and the permeate flux. UF experiments were stopped at volume factor reduction (VRF) of 5. Samples of retentate and permeate were taken at VRF 1.19, 1.47, 1.92, 2.78, 5. In continuous diafiltration mode, milli-Q water was added to keep constant the retentate volume throughout the experiments. DF experiments were stopped when 10 diavolumes (DV) passed through the membrane. Samples in permeate and retentate compartments were taken every diavolume. Experiments were performed in triplicate for both operating modes. Total peptide concentrations in samples were determined based on size-exclusion analysis using a methodology of integration previously reported (Bodin *et al.*, 2015). Reversed-phase chromatography coupled with mass spectroscopy (RP-HPLC-MS) was also used for the semi-quantification of the six targeted peptides. Water flushing is enough to recover the initial membrane resistance of $1.7 \pm 0.1 \times 10^{13} \text{ m}^{-1}$ suggesting that no membrane fouling occurred during experiments. The membrane is stored in 0.1 M NaOH at 4 °C.

Bovine hemoglobin hydrolysates with a hydrolysis degree of 3 and 5 % were treated on the 3 kDa regenerated cellulose membrane (TMP = 3 bar, recirculation velocity = 100 mL.min⁻¹, initial concentration = 5 g.L⁻¹). UF experiments were stopped at VRF of 3 and DF experiments were stopped at 10 DV. The yield and enrichment in VVh-7 and LVVh-7 were monitored.

IV.2.3.3. Experimental determination of yield and enrichment factor of targeted peptides

To calculate experimental yields and enrichment factors during UF or DF, two values are required: the ratio $C_x/C_{0,x}$ of targeted peptides and the total peptide concentration (ΣC) in fractions.

- Determination of the ratio $C_x/C_{0,x}$ of targeted peptides by reversed-phase HPLC coupled with mass spectroscopy

(Se reporter au § II.6.3 de ce manuscrit).

- Quantification of total peptide concentration (ΣC) in UF compartments by SE-HPLC analysis

The total peptide concentration was quantified based on SE-HPLC analysis as explained in a previous study (Bodin *et al.*, 2015).

(Se reporter au § II.6.4 de ce manuscrit).

IV.2.4. Results and discussion

IV.2.4.1. Membrane calibration

Lactium® was fractionated with a 3 kDa regenerated cellulose membrane. The sieving curve of the membrane is the key point of the methodology of ultrafiltration performances prediction. This calibration consists in (i) analyzing initial permeate and retentate fractions by SEC, (ii) considering each chromatogram point *i* as a peptide of MM determined from SEC column calibration, (iii) calculating retention values corresponding to these MM, and eventually (iv) plotting R versus Log MM. The membrane calibration line is shown in Figure 42. As previously explained (Bodin *et al.*, submitted), the calibration equation indicates that the membrane has an effective MWCO of 2 kDa instead of 3 kDa. It is considered that the sieving curve has a linear trend for molar mass below 3000 g.mol⁻¹ and a retention of 1 is estimated for peptide above 3000 g.mol⁻¹. We also observed a good match between the retention of the targeted peptides (measured by C18-HPLC-MS of permeate and retentate) and the sieving curve of the membrane (Table 9). Moreover, previous results show that the retention of peptides during UF and DF might be considered constant (Bodin *et al.*, submitted). In the present paper, this hypothesis is

made to apply the methodology of prediction. This hypothesis and the impact of slight discrepancy between sieving curve and the experimental retention of targeted peptides on the performances of the prediction methodology are studied in next parts.

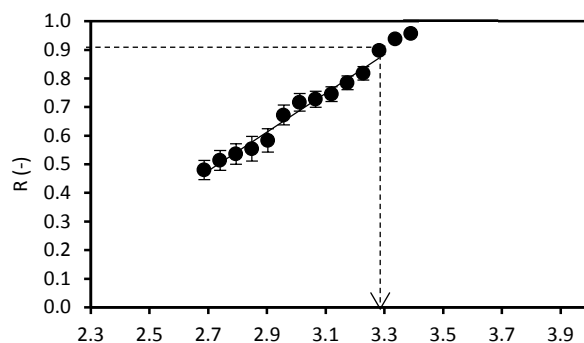


Figure 42. Calibration of the 3 kDa regenerated cellulose membrane (red square), drawn with SEC of initial permeate and retentate UF fractions of Lactium® in total recirculating mode (C0 = 10 g.L⁻¹, TMP = 3 bar, feed flowrate = 100 mL.min⁻¹). Linear regression: $R = 0.72 \times \log(\text{MM}) - 1.51$.

Table 9. Comparison of targeted peptides retentions measured by HPLC-MS in total recirculation and estimated from membrane calibration

| Targeted peptide molar mass (g.mol ⁻¹) | R measured by HPLC-MS | R from membrane calibration | Relative error (%) |
|--|-----------------------|-----------------------------|--------------------|
| a - 780 | 0.53 | 0.60 | 13 |
| b - 873 | 0.57 | 0.63 | 11 |
| c - 1267 | 0.67 | 0.75 | 12 |
| d - 1336 | 0.80 | 0.77 | -4 |
| e - 1383 | 0.73 | 0.78 | 7 |
| f - 1761 | 0.85 | 0.85 | 1 |

IV.2.4.2. Prediction of targeted peptide yields

Based on the mass balance equation, the simulation of targeted peptide yield in UF or DF compartments only requires their retention values. The prediction methodology consists in assessing R peptide value from its molar mass using the membrane calibration. The comparison between calculated yield and experimental yield (using mass spectrometry) of the six targeted peptides in the course of UF or DF in both compartments is presented in Figure 43 and Figure 44, respectively.

In the batch concentration mode (Figure 43), the largest majority of targeted peptides yields are predicted with a good accuracy for both compartments (relative errors between 2 and 20 %). Very few discrepancies with experimental results around 30 % were observed at VRF of 5 for some peptides in retentate. These results are very satisfying when considering the complexity of the mixture with respect to the relative simplicity of the methodology applied. Into further detail, highest errors are observed for the largest peptide (1383 and 1761 g.mol⁻¹) in retentate, whereas a good prediction of their yields in permeate is obtained. Prediction methodology assumes that mass amounts are conserved and balanced between both compartment tanks during fractionation. But, experimental values for larger peptides suggests

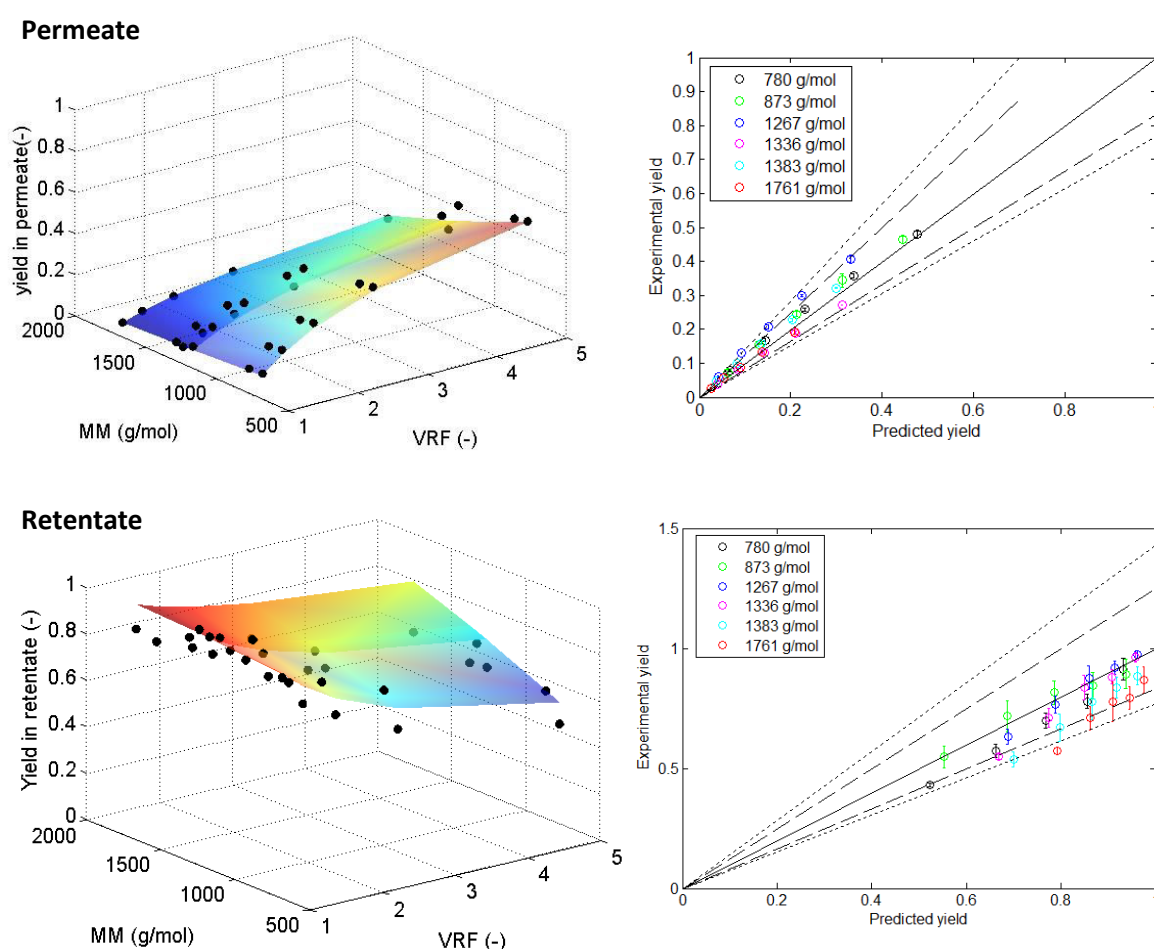


Figure 43. Yields of targeted peptides in permeate and retentate during UF ($C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $\text{TMP} = 3 \text{ bar}$, feed flowrate = 100 mL.min^{-1}). Left: evolution of yield for each targeted peptides (black points) and predicted yield (surface) as a function of VRF. Right: experimental values are represented as a function of predicted values. For each peptide, five points are represented, corresponding to five different VRF. Solid line, dashed lines and dotted lines represent a relative error of 0 %, 20 % and 30 %, respectively.

that small amount of these peptides are adsorbed on the membrane during UF, explaining the slight deviation of yield prediction in retentate. Moreover, it is interesting to notice that the highest errors on the yield prediction are observed for largest peptides whereas their retention is accurately estimated by the membrane calibration (Table 9). On the contrary, errors made on retention prediction for small peptides do not lead to an important yield prediction deviation. This outcome suggests that the prediction methodology is more sensitive to an error of retention estimation for peptides having a molar mass close to the MWCO of the membrane.

In diafiltration mode (Figure 44), yields are accurately predicted by the methodology in permeate in a range of relative error between 2 % and 30 %. This suggests that the retention

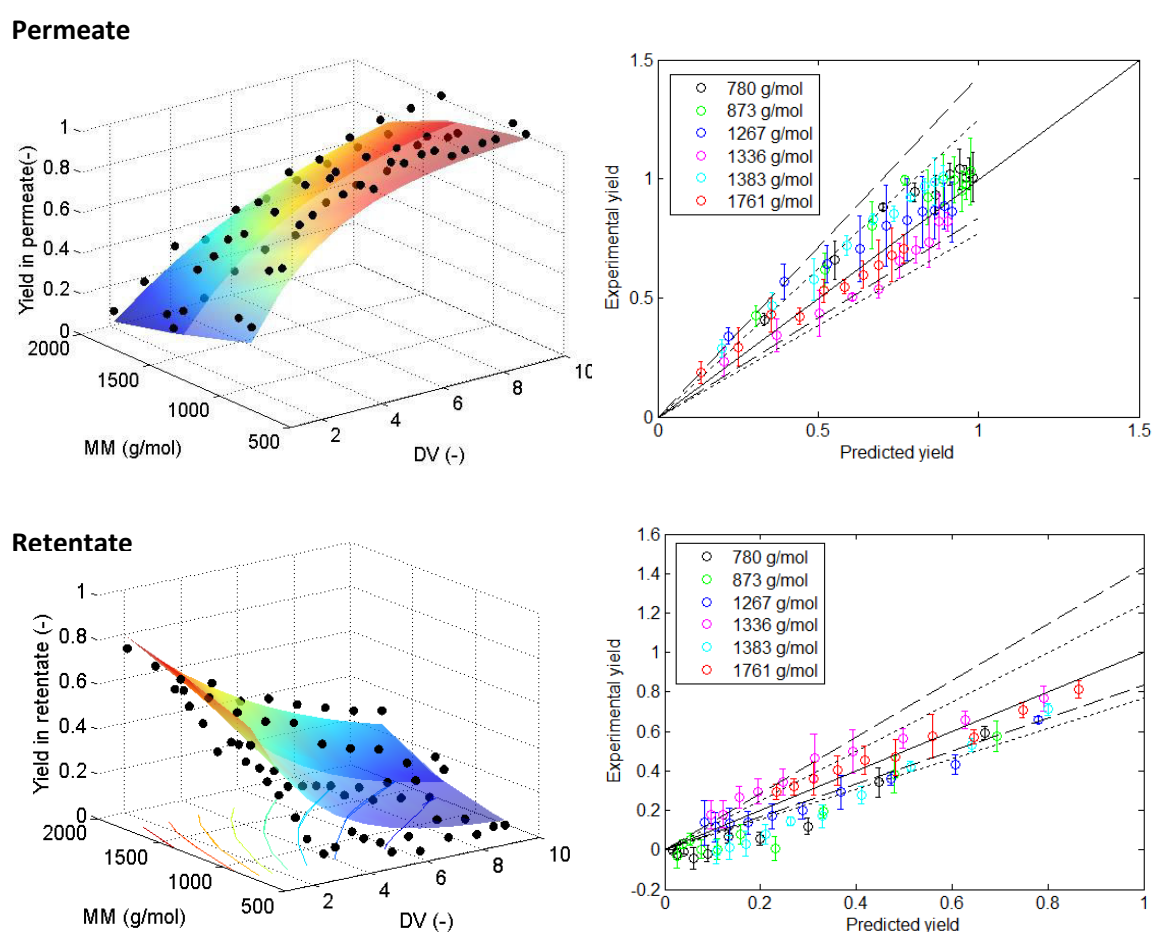


Figure 44. Yields of targeted peptides in permeate and retentate during DF ($C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $TMP = 3 \text{ bar}$, feed flowrate = 100 mL.min^{-1}). Left: evolution of experimental yield for each targeted peptides (black points) and predicted yield (surface) as a function of DV. Right: experimental values are represented as a function of predicted value. For each peptide, ten points are represented, corresponding to ten different DV. Solid line, dashed lines and dotted lines represent a relative error of 0 %, 20 % and 30 %, respectively.

value estimated from calibration is also valid for yield prediction throughout diafiltration. In retentate, good predictions are generally observed except for low yield values (less than 0.3). As small peptides are totally washed from retentate at the end of diafiltration, the relatively high errors of yield prediction observed in this area are most probably due to the limit of mass spectrometry sensitivity.

Overall, it can be stated that the proposed methodology is efficient to predict the yields of targeted peptides during batch concentration and continuous diafiltration in both compartments of the system.

IV.2.4.3. Prediction of total peptide concentration

The simulation of the enrichment factors of a targeted peptide in compartments requires both its R value (estimated by membrane calibration) and the overall peptide concentrations in the compartment. To assess this total peptide concentration, a prediction of SEC chromatogram by applying mass balance equation to every point of the starting hydrolysate chromatogram is achieved. Then, overall concentration is calculated by converting absorbance values into concentrations and by integration of the profile (Bodin *et al.*, 2015).

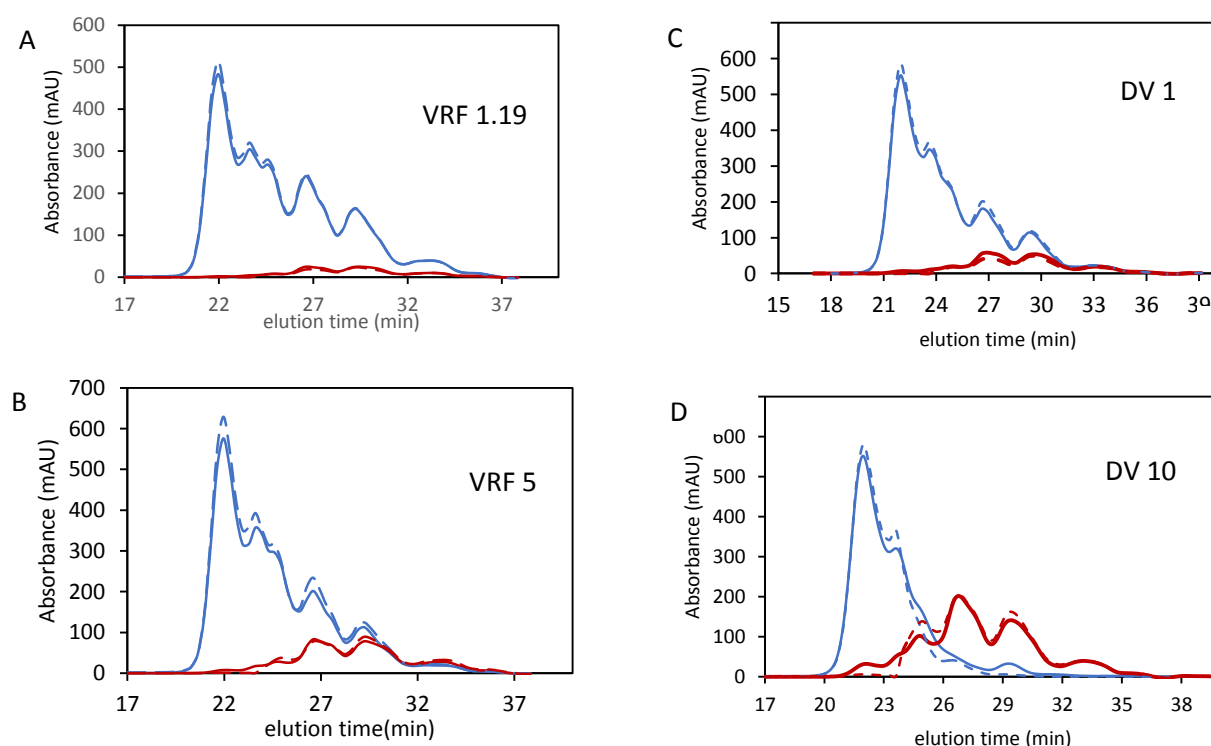


Figure 45. SEC chromatograms of retentate (blue line) and permeate (red line) fractions in batch concentration at 1.19 VRF (A) and 5 VRF (B) and in continuous diafiltration at 1 DV (C) and 10 DV (D). For diafiltration, permeate profiles were multiplied by the number of diavolume to undo the dilution and have comparable profiles with UF. Solid lines represent experimental profiles and dashed lines represent predicted profiles.

Figure 45 displayed a comparison between predicted and experimental chromatograms of both compartments at the beginning and the end of batch concentration (VRF 1.19 and 5) and diafiltration (1 and 10 diavolumes). In batch concentration mode, very good prediction of permeate profiles is observed throughout experiments. The prediction of the retentate profile is very satisfactory at the beginning of UF but is slightly overestimated for high VRF (Figure 45 B). It appears that the discrepancy increases with the molar mass. Moreover, the global mass balances (data not shown) decreases during from 100 % to 90 %. At the end of the experiment, the substantial increase of the retentate concentration due to the volume reduction might induce a change of the polarization layer state at the surface of the membrane with an accumulation more important of larger peptides. This outcome is consistent with the overestimation of the yield observed in retentate at VRF 5 for targeted peptides with molar mass between 1300 and 1760 g.mol⁻¹.

In diafiltration mode (C and D), the global good prediction of profiles in both compartments until the end of experiment confirms that the retention of peptides may be considered constant throughout DF. Nevertheless, some discrepancies are observed in permeate for peptides eluted in SEC before 26 minutes, corresponding to molar masses above the 2000 g.mol⁻¹ (the apparent MWCO of the membrane). This result suggests that the linear trend of the calibration curve is not quite accurate to simulate the transfer in DF of molar masses between 2000 and 3000 g.mol⁻¹.

Figure 46 displays the comparison between experimental and predicted global peptide concentration in the course of batch concentration and continuous diafiltration experiments in both compartments. These concentrations are calculated using a method previously validated (Bodin *et al.*, 2015). It may be noticed that the prediction in the retentate slightly deviates at VRF

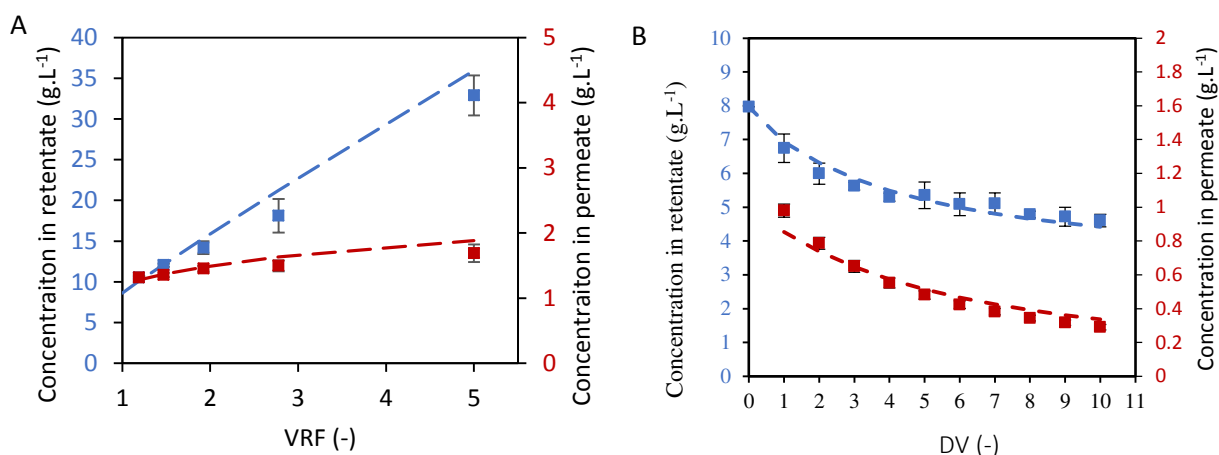


Figure 46. Total peptide concentration in retentate (blue) and permeate (red) during batch concentration (A) and continuous diafiltration (B) of Lactium® with 3 kDa membrane (real 2 kDa). Comparison of prediction (dashed line) and experimental values determined by experimental SEC profile integration (square).

5 in batch concentration mode, directly correlated to the overestimation of the SEC profile at high VRF. In permeate during diafiltration, a good prediction of the total concentration is observed despite of the discrepancies observed on the SEC chromatogram.

Overall, there is a good match between predicted and experimental concentrations (less than 15 % of relative error) suggesting that the methodology is efficient to predict the total peptide concentration during UF and DF.

IV.2.4.4. Prediction of targeted peptide enrichment factor

Eventually, predicted and experimental enrichments of targeted peptides in permeate and retentate during UF and DF were compared (Figure 47 and Figure 48, respectively). All targeted peptides have a molar mass below the MWCO of the membrane. Consequently, an enrichment is expected in the permeate. In retentate, the term of exhaustion is used to express the diminution of the targeted peptide purity.

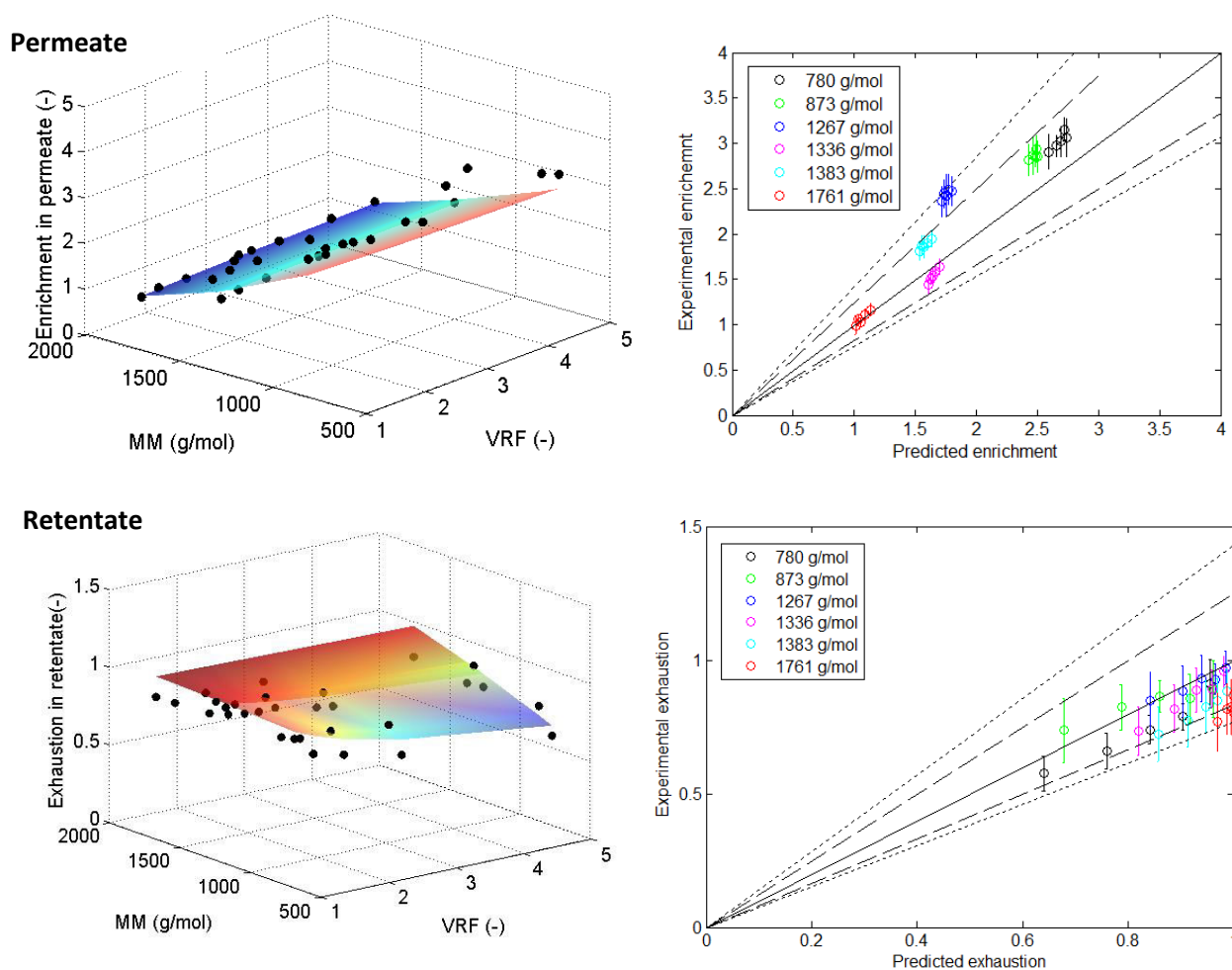


Figure 47. Enrichment of targeted peptides in permeate and exhaustion in retentate during UF ($C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $TMP = 3 \text{ bar}$, feed flowrate = 100 mL.min^{-1}). Left: evolution of enrichment factors for each targeted peptides (black points) and predicted enrichment factor (surface) as a function of UF. Right: experimental values are represented as a function of predicted values. Solid line, dashed lines and dotted lines represent a relative error of 0 %, 20 % and 30 %, respectively.

In batch concentration (Figure 47), enrichment factors of all targeted peptides in permeate are predicted with less than 30 % of relative error. In retentate, it can be noticed that the slight error made on the global peptide concentration for high VRF does not impact the quality of the prediction of targeted peptide exhaustion, inferior to 20 % of relative error.

In diafiltration (Figure 48), enrichment factors of targeted peptides in permeate are also accurately predicted by the methodology, considering that a maximal relative error of 30 % is acceptable due to the complexity of the initial mixture. In retentate, as explained for yields, concentrations of targeted peptides with low molar mass considerably decreased during diafiltration and the high relative errors are most probably due to inaccuracy of mass spectroscopy detection in this concentration range.

Taking as a whole, the methodology developed revealed a powerful tool to predict enrichment factors in targeted peptides during batch concentration and continuous diafiltration.

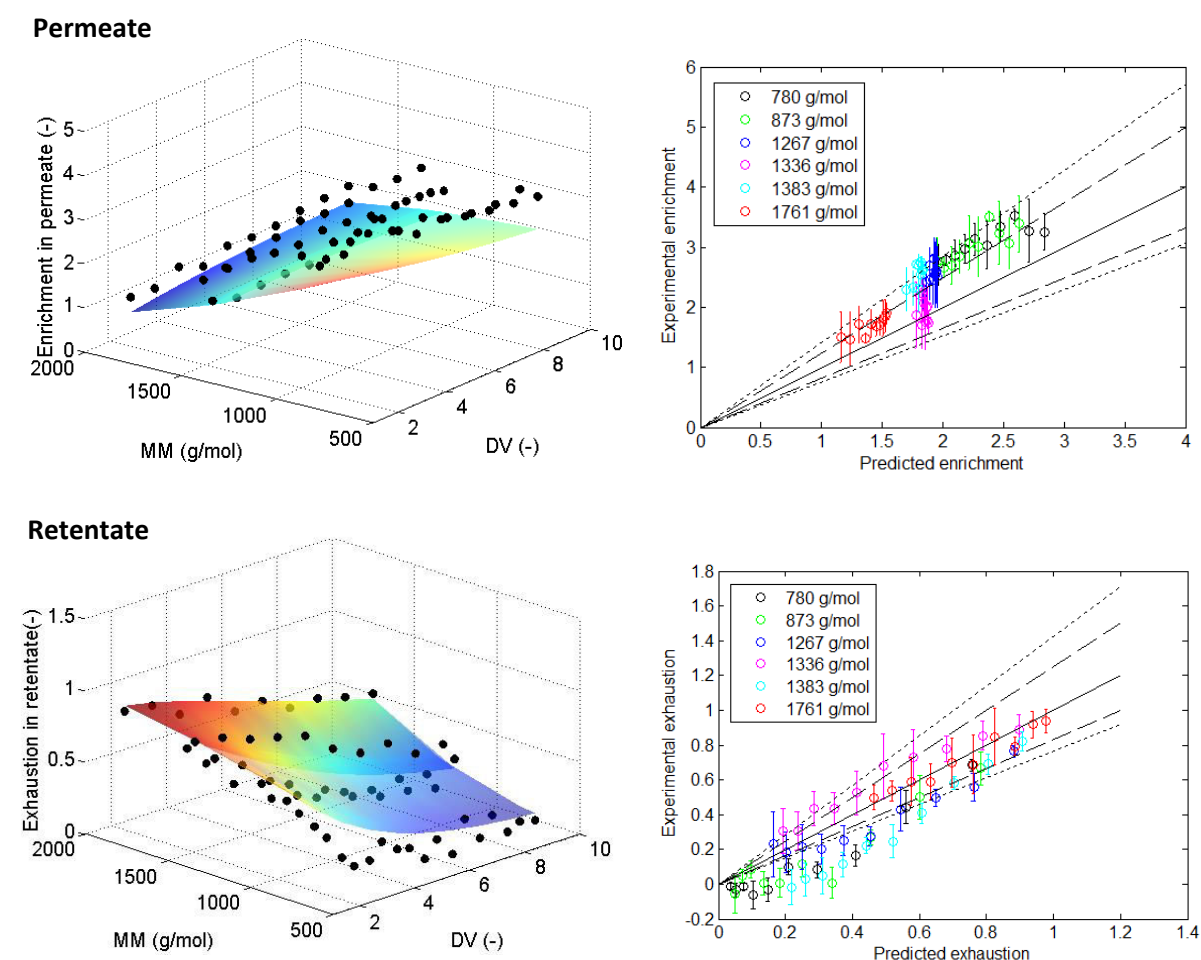


Figure 48. Enrichment of targeted peptides in permeate and exhaustion in retentate during DF ($C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $TMP = 3 \text{ bar}$, feed flowrate = 100 mL.min^{-1}). Left: evolution of enrichment factors for each targeted peptides (black points) and predicted enrichment factor (surface) as a function of DV. Right: experimental values are represented as a function of predicted values. Solid line, dashed lines and dotted lines represent a relative error of 0 %, 20 % and 30 %, respectively.

IV.2.4.5. Application of the methodology - Comparison of bioactive peptide yield and enrichment in UF or DF

Such a prediction is valuable when bioactive peptide enrichment is required from starting hydrolysate since it establishes whether ultrafiltration will be performant enough and what the best implementation mode is (batch concentration or continuous diafiltration). Examples of application are presented in this section to illustrate the interest of the methodology.

- Enrichment in α -casozepine in Lactium®

Lactium® is commercialized for its soothing properties due to the presence of the bioactive α -casozepine (Cakir-Kiefer *et al.*, 2011; Miclo *et al.*, 2001). The molar mass of this peptide is 1267 g.mol⁻¹ (targeted peptide c). Calculations applied to bioactive α -casozepine showed an interesting enrichment factor in the permeate compartment, 2.15 at VRF 5 in batch concentration and 2.3 after 10 DV in continuous diafiltration, respectively. As both operating modes present similar performances in terms of enrichment of α -casozepine, continuous diafiltration could be preferred since a targeted peptide yield of 90 % is estimated after 10 DV (against 39 % in concentration mode).

- Enrichment in opioid peptides in bovine hemoglobin hydrolysates

Bovine hemoglobin hydrolysates with a hydrolysis degree of 3 % and 5 % contains two opioid peptides (VVh-7, MM = 1195 g.mol⁻¹, and LVVh-7, MM= 1304 g.mol⁻¹) (Piot *et al.*, 1992). The 3 kDa membrane was calibrated with both hydrolysates and UF and DF performances were simulated to enrich targeted peptides in permeate. Table 10 displayed experimental and predicted values of yields and enrichment factors. Maximal relative errors of 28 % and 14 % are observed in UF and DF, respectively, demonstrating the accuracy of the methodology with another type of hydrolysate. As observed for targeted peptides in Lactium®, the use of diafiltration enables to reach higher yield than UF for similar enrichment factor.

Table 10. Experimental and predicted performances (yield and enrichment in permeate) during UF (VRF = 3) and DF (DV = 10) of opioid targeted peptides contained in bovine hemoglobin hydrolysates at different hydrolysis degree obtained with a 3 kDa regenerated cellulose membrane (C0 = 10 g.L⁻¹, TMP = 3 bar, feed flowrate = 100 mL.min⁻¹).

| | DH | Peptide | Experimental yield | Predicted yield | Relative error (%) | Experimental enrichment | Predicted enrichment | Relative error (%) |
|----|-----|---------|--------------------|-----------------|--------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|
| UF | 5 % | VVh-7 | 0.58 | 0.42 | -28 | 2.67 | 1.90 | -29 |
| | | LVVh-7 | 0.50 | 0.39 | -22 | 2.28 | 1.78 | -22 |
| | 3 % | VVh-7 | 0.53 | 0.42 | -21 | 3.78 | 3.55 | -6 |
| | | LVVh-7 | 0.49 | 0.39 | -17 | 3.52 | 3.32 | -6 |
| DF | 5 % | VVh-7 | 1.02 | 1 | -2 | 1.93 | 1.79 | -8 |
| | | LVVh-7 | 0.94 | 0.95 | 1 | 1.91 | 1.74 | -9 |
| | 3 % | VVh-7 | 0.99 | 0.97 | -2 | 3.01 | 3.31 | 10 |
| | | LVVh-7 | 0.94 | 0.95 | 1 | 3.78 | 3.25 | -14 |

These two examples show that the methodology can be used to compare ultrafiltration implementations based on the yield and the enrichment of targeted peptides. Other UF criterion like process duration and water consumption could be taken into consideration. A combination of both implementations and cascades of membrane might also been considered. Thus, this methodology could be used for multicriteria optimization to find better compromise between productivity, enrichment factor, yield and water consumption.

IV.2.5. Conclusion - Contribution de la pré-publication

Cet article montre les performances de la méthodologie présentée pour prédire le rendement et l'enrichissement en peptides cibles au cours de l'UF et de la DF. Six peptides du Lactium® ont été suivis par HPLC-MS au cours du fractionnement sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée. Au cours de ces travaux, des hydrolysats d'hémoglobine bovine contenant des peptides bioactifs ont également été fractionnés pour obtenir des fractions enrichies en vue de valider la méthodologie de prédiction. Le rendement et l'enrichissement de trois peptides bioactifs ont été suivis. Des erreurs relatives entre 2 % et 30 % ont été obtenues pour l'ensemble des résultats de rendement et d'enrichissement. Etant donné la complexité des mélanges et la simplicité de la méthodologie ne nécessitant qu'un étalonnage de la membrane (déterminé en CES) pour prédire les rétentions, ce niveau de précision est très acceptable. Cette stratégie peut alors être utilisée pour comparer les performances atteignables en UF et en DF. Deux exemples sont présentés dans cet article sur l' α -cazosepine présent dans le Lactium® et sur VVh-7 et LVVh-7 présents dans les hydrolysats d'hémoglobine. Les résultats montrent l'apport de la diafiltration pour augmenter les rendements en peptides cibles dans le perméat.

IV.2.6. Complément 1 à l'article : autre exemple d'application de la méthodologie

L'hydrolysat d'hémoglobine bovine étudié dans la publication contient également un puissant peptide antimicrobien, la néokytorphine (TSKYR, MM = 653 g.mol⁻¹) (Nedjar-Arroume *et al.* 2006). Le fractionnement d'hydrolysats avec quatre degré d'hydrolyse différents (3 %, 5 %, 10 % et 18 %) sur une membrane de 1 kDa en cellulose régénérée est étudié pour enrichir le perméat en néokytorphine. La membrane a été étalonnée avec chaque hydrolysat. La comparaison entre les enrichissements expérimentaux et prédits est présentée dans le Tableau 11. Les écarts relatifs obtenus (inférieurs à 30 %) confirment le niveau de précision de la stratégie proposée dans ces travaux. Par ailleurs, le point intéressant de ces résultats est la comparaison de l'enrichissement en néokytorphine obtenu pour chaque hydrolysat. Il apparaît que l'enrichissement atteint diminue lorsque le degré d'hydrolyse du mélange augmente. Cette évolution s'explique par une plus grande proportion de peptides avec une masse molaire en-

dessous du seuil de coupure de la membrane dans les hydrolysats avec des degrés d'hydrolyse élevés. Une grande quantité de peptides est donc transférée à travers la membrane avec le peptide bioactif. Au cours de l'UF de l'hydrolysat « 3 % », la néokyotorphine est transférée sélectivement dans le perméat alors que la majorité des peptides sont retenue par la membrane. Cependant, comme la néokyotorphine est un peptide terminal pendant l'hydrolyse, la quantité libérée augmente avec le degré d'hydrolyse. Par conséquent, la méthodologie de prédiction des performances de l'ultrafiltration est un outil intéressant pour estimer l'enrichissement en peptide bioactif atteignable pour chaque mélange et pour sélectionner le degré d'hydrolyse permettant d'obtenir le meilleur compromis entre la quantité et la pureté du peptide d'intérêt.

Tableau 11. Comparaison de l'enrichissement expérimental et prédit en néokyotorphine dans le perméat au cours de l'UF sur une membrane de 1 kDa en cellulose régénérée (FRV = 5, C0 = 10 g.L⁻¹, PTM = 3 bar, débit de recirculation = 100 mL.min⁻¹) de quatre hydrolysats d'hémoglobine bovine à différents degrés d'hydrolyse.

| Degré d'hydrolyse | Enrichissement expérimental | Enrichissement prédit | Erreur relative (%) |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------|
| 18 % | 1.75 | 1.38 | -21 |
| 10 % | 3.20 | 2.72 | -15 |
| 5 % | 4.57 | 5.12 | 12 |
| 3 % | 9.68 | 10.35 | 7 |

IV.2.7. Complément 2 à l'article : influence des conditions opératoires sur la stratégie de prédiction des performances

Dans le chapitre précédent, l'étude des conditions opératoires sur l'étalonnage de la membrane a montré que seule la pression transmembranaire à une influence, mais avec un impact limité sur la sélectivité. Ce résultat suggère que la méthodologie proposée pour prédire les rendements et enrichissements en peptides cibles peut être utilisée dans n'importe quelle condition opératoire, en utilisant un étalonnage unique de la membrane. Pour valider cette hypothèse, les performances prédites avec l'étalonnage présentée équation 74 (p 97) sont comparées aux résultats expérimentaux obtenus en concentration discontinue du Lactium® dans des conditions opératoires différentes (PTM = 2 bar, C0 = 25 g.L⁻¹, débit de recirculation = 75 mL.min⁻¹).

Les Figure 49 et Figure 50 comparent l'évolution expérimentale et simulée du rendement et de l'enrichissement de 3 peptides cibles dans le perméat et le rétentat, respectivement. Les performances expérimentales obtenues sont très proches de ceux présentés dans la publication à 3 bar, 10 g.L⁻¹ et 100 mL.min⁻¹ de débit de recirculation, ce qui confirme que les conditions opératoires ont une faible influence sur la sélectivité de l'UF. Par conséquent, la précision de la

méthodologie de prédiction est similaire (erreur relative maximale de 28 %). Il peut alors être conclu qu'un étalonnage unique peut être utilisé pour un mélange donné pour prédire les performances du procédé dans différentes conditions opératoires.

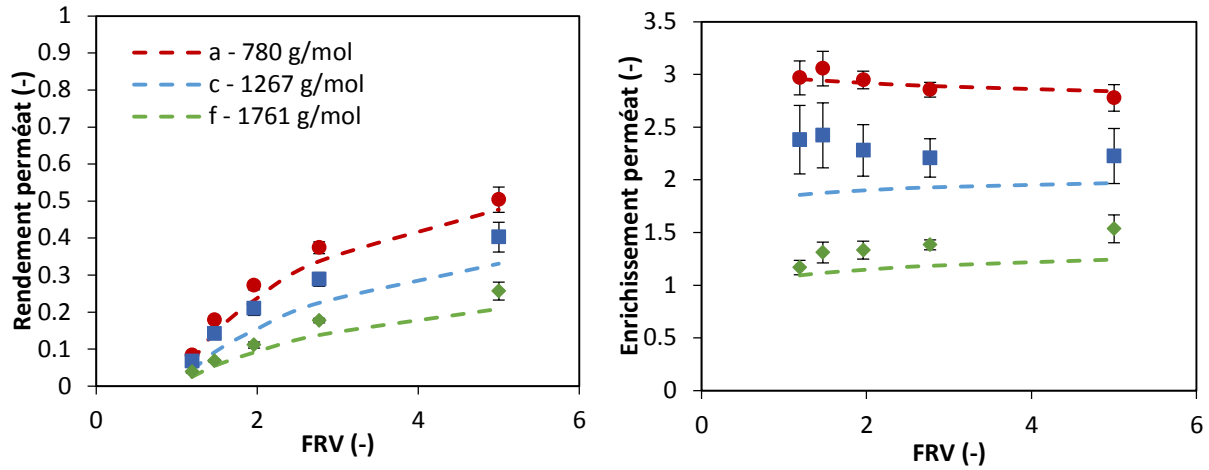


Figure 49. Rendement (gauche) et enrichissement (droite) en peptides cibles du Lactium® dans le perméat au cours de l'UF sur la membrane en cellulose régénérée de 3 kDa (PTM = 2 bar, C0 = 25 g.L⁻¹, débit de recirculation = 75 mL.min⁻¹). Les lignes pointillées représentent les résultats de simulation obtenus avec l'étalonnage de la membrane déterminé dans les conditions suivantes : PTM = 3 bar, C0 = 10 g.L⁻¹, débit de recirculation = 100 mL.min⁻¹

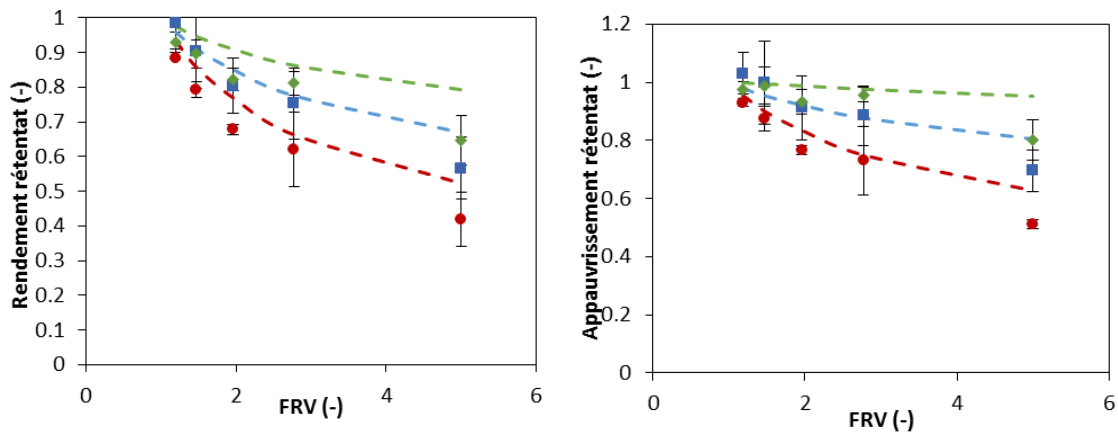


Figure 50. Rendement (gauche) et enrichissement (droite) en peptides cibles du Lactium® dans le rétentat au cours de l'UF sur la membrane en cellulose régénérée de 3 kDa (PTM = 2 bar, C0 = 25 g.L⁻¹, débit de recirculation = 75 mL.min⁻¹). Les lignes pointillées représentent les résultats de simulation obtenus avec l'étalonnage de la membrane déterminé dans les conditions suivantes : PTM = 3 bar, C0 = 10 g.L⁻¹, débit de recirculation = 100 mL.min⁻¹

Conclusion du chapitre IV

En résumé

Dans ce chapitre, la stratégie de modélisation des performances de l'ultrafiltration, en termes de rendement et d'enrichissement, pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques a été validée. Cette méthodologie est basée sur des données de l'hydrolysat : la distribution de masses molaires évaluée par CES de l'hydrolysat, ainsi que le peptide ou la fraction cible à enrichir. Des données sur le procédé sont également nécessaires : les équations de bilans de matière et l'étalonnage de la membrane reliant une rétention à une masse molaire.

La démarche a d'abord été validée pour prédire les performances de classes de masses molaires, suivis expérimentalement à partir de points des chromatogrammes CES des fractions, puis de peptides cibles, suivis en CLHP-SM. Trois conclusions peuvent être établies :

- les **distributions de masses molaires** dans le perméat et le rétentat peuvent être prédites au cours de l'UF et de la DF.
- les **concentrations globales** en peptides dans les compartiments sont prédites avec une erreur relative maximale de 15 % ;
- les **rendements et enrichissements** en classes de masses molaire ou peptides cibles sont prédits avec moins de 35 % d'erreur relative au cours de l'UF et de la DF.

Enfin, des exemples d'applications ont montré l'intérêt de cette méthodologie pour comparer le fractionnement d'hydrolysats sur différentes membranes ou pour comparer les enrichissements atteignables en fonction du degré d'hydrolyse d'un mélange. De plus, un étalonnage unique peut être utilisé pour prédire les performances dans différentes conditions opératoires. Cette stratégie apparaît comme un outil performant pour aider le choix de la mise en œuvre de l'ultrafiltration.

CHAPITRE V

Optimisation dynamique multicritère de l'ultrafiltration

Introduction

L'optimisation dynamique de l'ultrafiltration pour le fractionnement d'un hydrolysats protéique consiste à déterminer la meilleure mise en œuvre (UF / DF) ou la meilleure combinaison de mise en œuvre pour maximiser les performances en termes de séparation mais également sur un plan économique et / ou environnemental. En ultrafiltration des hydrolysats, l'enrichissement et le rendement d'un peptide ou d'une fraction cible constituent les critères de qualité de la séparation. Les résultats présentés dans le chapitre III de ces travaux ont montré l'apport de la diafiltration pour améliorer les rendements dans le perméat de petits peptides et d'obtenir un rétentat enrichi en peptides de masses molaires plus importantes. Cependant, l'utilisation de la diafiltration induit une consommation d'eau ainsi qu'une durée de traitement plus longue et non négligeable en comparaison au processus de concentration. La durée du procédé ainsi que la consommation d'eau en diafiltration ont donc été choisies pour représenter les performances économiques du procédé. Le résultat de l'optimisation dynamique est un profil optimal de α , le rapport entre le débit d'eau de diafiltration et le débit de perméat.

L'objectif de ce chapitre est de proposer une méthodologie d'optimisation dynamique multicritère de l'ultrafiltration en utilisant la stratégie de prédiction des performances de séparation présentée dans le chapitre précédent.

Dans un premier temps, la mise en œuvre de l'optimisation dynamique nécessite de prédire l'évolution du flux de perméat au cours du temps. Un modèle de résistances en série sera utilisé. Cette modélisation permettra d'exprimer l'avancement du système et les performances en fonction du temps.

Dans un deuxième temps, le problème d'optimisation sera implémenté dans le logiciel gPROMS®. Les résultats d'optimisation de l'ultrafiltration appliquée au Lactium® seront présentés. La démarche et les conclusions probantes seront illustrées en détaillant deux exemples :

- l'enrichissement du peptide bioactif (α -casozépine, 1268 g.mol^{-1}) dans le perméat ;
- la purification de la famille de peptides retenues dans le rétentat (somme des classes de masse molaire $>3000 \text{ g.mol}^{-1}$).

Ces deux exemples représentent les deux applications principales de l'ultrafiltration appliquée aux hydrolysats protéiques, à savoir l'obtention de fractions enrichies en peptide(s) bioactif(s) (pour améliorer la bioactivité du mélange) ou enrichies en une famille de peptides (pour améliorer les propriétés nutritives ou fonctionnelles).

La démarche d'optimisation se décomposera en trois parties. Les critères d'optimisation choisis seront d'abord étudiés pour analyser leur interdépendance et le profil de α obtenu dans chaque cas d'optimisation monocritère sera analysé. Puis, à partir de ces premiers résultats, une optimisation

multicritère sera mise en œuvre afin d’obtenir l’ensemble des solutions non dominées et le choix de la meilleure solution sera déterminé à l’aide de la théorie des fonctions d’utilité multi-attribut. Dans une troisième partie, la mise en œuvre du profil optimal de α permettra de valider expérimentalement les résultats d’optimisation.

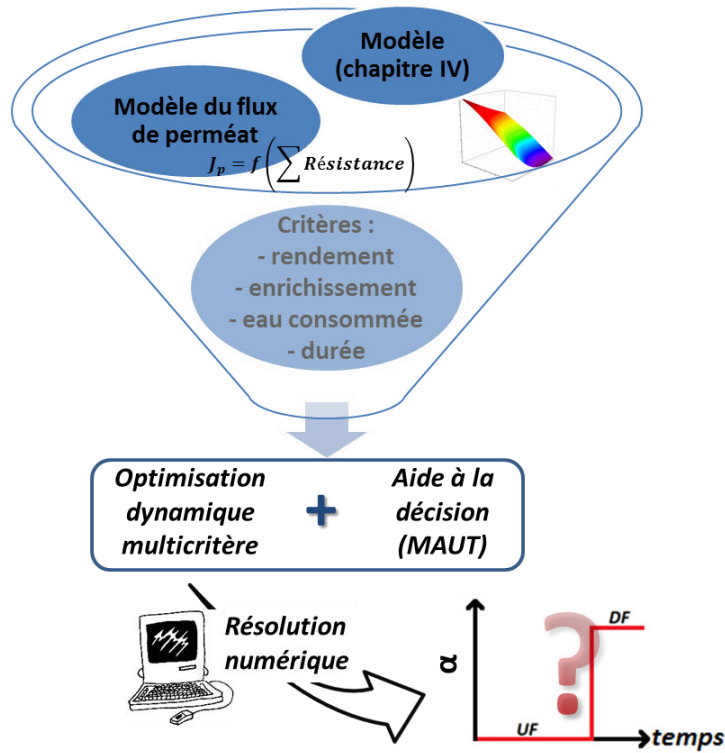


Figure 51. Démarche et objectif du chapitre V

V.1. Modélisation du flux de perméat au cours de l’ultrafiltration

Avant de présenter les résultats de modélisation du flux de perméat, les conclusions de l’étude expérimentale du débit de perméat réalisée dans le chapitre III sont résumées, afin de mettre en évidence les paramètres impliqués dans les phénomènes de transfert du liquide à travers la membrane.

V.1.1. Evolution expérimentale du débit de perméat

V.1.1.1. Influence des conditions opératoires en recirculation totale

Dans le chapitre III de ces travaux (§ III.3.1III.3), l’influence des conditions opératoires de l’UF sur la résistance de la couche de polarisation, calculée à partir du débit de perméat en recirculation totale, a été discutée. Il a été observé que la pression transmembranaire (PTM), la concentration initiale de l’hydrolysate (C_0) ainsi que la vitesse de recirculation du rétentat (d_{feed}) influent sur l’état de la polarisation en recirculation totale et modifie le transfert du perméat à travers la membrane. Un résumé est présenté dans le Tableau 12.

Tableau 12. Description de l’influence des conditions opératoires sur la résistance de la couche de polarisation en recirculation totale.

| Variation | Observation sur la résistance de la couche de polarisation (Res_{pl}) | Hypothèse |
|---------------------|---|--|
| \nearrow PTM | $\nearrow Res_{pl}$ | \nearrow densité de la couche de polarisation (compression) |
| $\nearrow C_0$ | $\nearrow Res_{pl}$ | \nearrow viscosité de la couche de polarisation (accumulation) |
| $\nearrow d_{feed}$ | $\searrow Res_{pl}$ | \searrow épaisseur de la couche de polarisation (érosion) |

V.1.1.2. Evolution au cours de l’ultrafiltration

L’évolution du débit de perméat en fonction du FRV en concentration discontinue a également été suivie dans une condition opératoire (PTM = 3 bar, $C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $d_{feed} = 100 \text{ mL.min}^{-1}$) (Figure 32, p 89). Le débit de perméat reste constant jusqu’à un FRV de 2 puis tend à diminuer. Cette tendance a été confirmée par le suivi du débit de perméat au cours de la concentration dans différentes conditions opératoires. Cette diminution s’explique par l’augmentation de la concentration dans le rétentat. Le changement de concentration et de composition en amont de la

membrane modifie la couche de polarisation, induisant une augmentation de la résistance hydraulique au transfert du liquide à travers la membrane.

En diafiltration, le débit de perméat dans différentes conditions opératoires, reste stable, bien que la concentration du rétentat diminue au cours de la diafiltration. On peut supposer que le changement important de composition du rétentat dû à l'élimination totale des plus petits peptides peut modifier les interactions entre les peptides accumulés à la surface de la membrane et altérer la structure de la couche de polarisation. La résistance hydraulique au transfert du solvant pourrait alors rester stable, malgré la diminution de concentration.

En résumé

Le flux de perméat en recirculation totale est régi (i) par la PTM qui induit le transfert convectif à travers la membrane et (ii) la résistance hydraulique de la couche de polarisation de concentration qui dépend de la PTM, C_0 et d_{feed} .

L'évolution du flux de perméat en concentration discontinue est liée à l'augmentation de la concentration en peptides dans le rétentat. En diafiltration, le débit de perméat reste stable.

V.1.2. Modélisation par un modèle de résistances en série

V.1.2.1. En concentration discontinue

Pour modéliser l'évolution du débit de perméat en concentration discontinue, un modèle de résistances en série est utilisé. D'après les observations expérimentales, les conditions opératoires de l'ultrafiltration sont prises en compte dans l'expression de la résistance liée à la couche de polarisation (Eq 52).

$$q = \frac{PTM}{Res_m + aPTM^b d_{feed}^c \sum C_r^d} \quad (\text{Eq. 52})$$

avec q , le débit de perméat ($L.h^{-1}$), Res_m , le résistance membranaire intrinsèque en ($bar.h.L^{-1}$), PTM , le pression transmembranaire (bar), d_{feed} , le débit de recirculation ($L.h^{-1}$), $\sum C_r$, la concentration globale en peptide dans le rétentat ($g.L^{-1}$).

Douze concentrations discontinues ont été réalisées avec le Lactium® sur la membrane 3 kDa (Figure 11, p 43). Le débit initial de perméat après 20 minutes de recirculation totale ainsi que plusieurs points de débit au cours de la concentration sont relevés. A chaque point de mesure est associé une valeur de PTM , d_{feed} (maintenus constants au cours d'une expérience) et $\sum C_r$, qui évolue et est déterminée par une analyse en chromatographie d'exclusion stérique. Les paramètres

a, b, c et d sont alors identifiés pour minimiser l'écart entre le modèle et les observations expérimentales. D'après ces observations, des contraintes sur les valeurs des paramètres sont imposées. Ces contraintes ainsi que les valeurs optimisées sont listées dans le Tableau 13.

Tableau 13. Contraintes et valeurs des paramètres a, b, c et d du modèle des résistances en série

| paramètres | contraintes | Valeurs |
|------------|-------------|---------|
| a | > 0 | 0,15 |
| b | ≥ 0 | 0,39 |
| c | ≤ 0 | -0,82 |
| d | ≥ 0 | 1,02 |

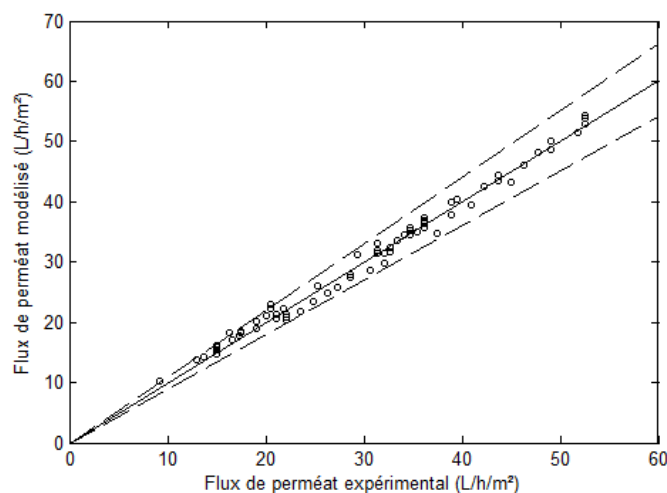


Figure 52. Flux de perméat calculés par optimisation des paramètres du modèle de résistances en série, comparés aux flux de perméat expérimentaux. Ligne continue : bissectrice représentant l'égalité des flux. Lignes tiret : représentant un écart relatif de 10 %.

La Figure 52 montre la comparaison entre les flux de perméat expérimentaux et les flux de perméat résultant de l'optimisation des paramètres du modèle de résistances en série. L'obtention de faibles erreurs (moins de 10 %) montre qu'il est raisonnable de modéliser l'évolution de la résistance hydraulique et du débit de perméat au cours de la concentration par le modèle phénoménologique utilisé, basé sur les conditions opératoires de l'ultrafiltration.

Par ailleurs, une validation croisée a été réalisée. Elle consiste à déterminer les paramètres a, b, c et d en utilisant n-1 expériences et à valider la fiabilité du modèle obtenu sur la n^{ème} condition opératoire. La densité de flux modélisée de la n^{ème} observation résulte du modèle de résistances en série avec $\sum C_r$ prédit par la méthodologie présentée dans le chapitre précédent. Cette validation a été réalisée sur chacune des douze conditions opératoires. Les résultats sont présentés sur la Figure 53. Les points de flux expérimentaux sont comparés à l'évolution des flux modélisés. On

remarque une bonne prédiction du perméat initial et tout au long de la concentration dans les différentes conditions opératoires. L'erreur relative maximale observée est de 12 % (Figure 53, A, PTM = 3 bar, $C_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$, $d_{\text{feed}} = 75 \text{ mL.min}^{-1}$, $\text{FRV} = 10$). Le modèle établi a donc été validé pour prédire l'évolution du flux de perméat en concentration discontinue.

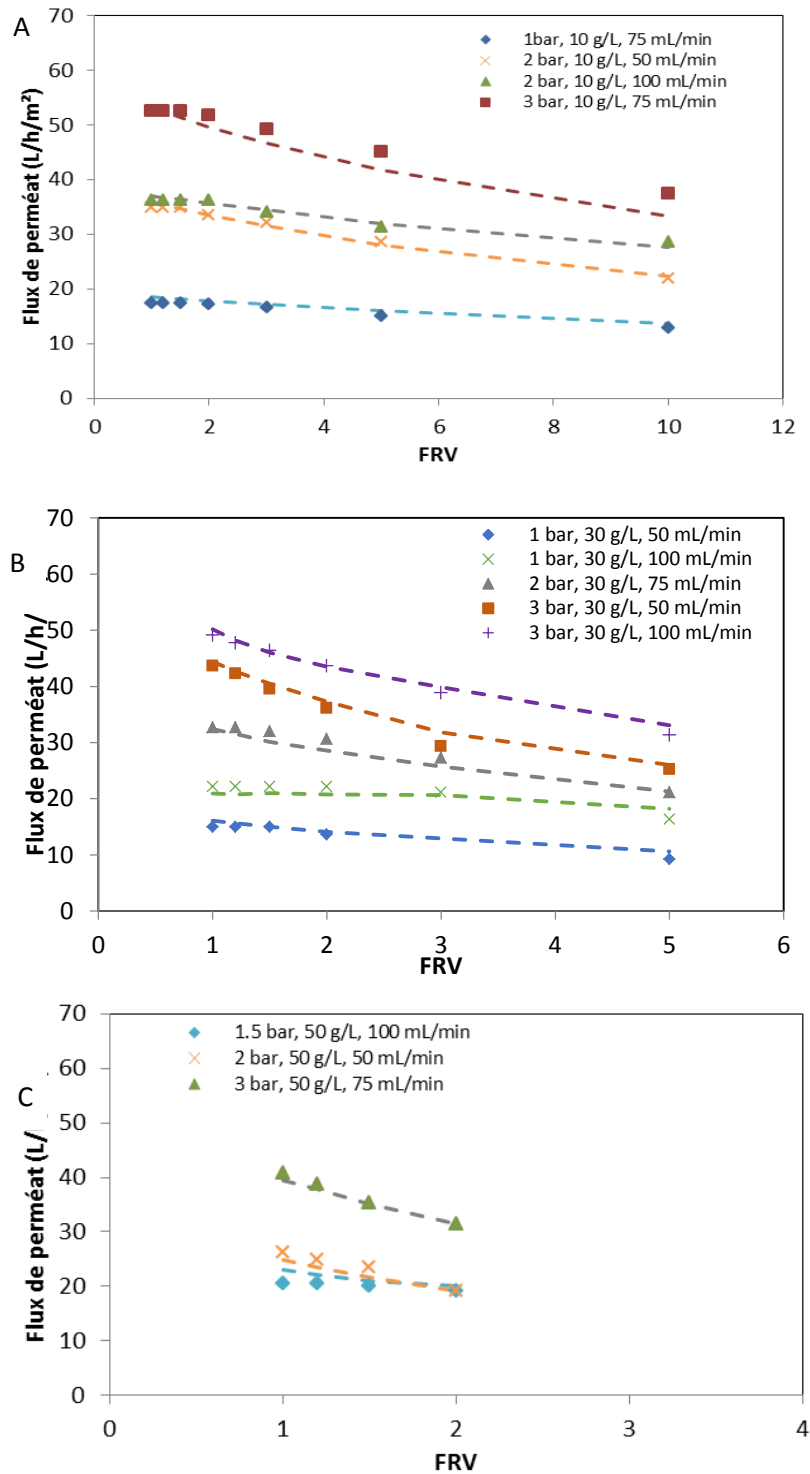


Figure 53. Validation croisée de la modélisation du flux de perméat. Symboles : évolution de la densité de flux de perméat au cours de la concentration dans différentes conditions opératoires (PTM, C_0 , d_{feed}). Lignes pointillées : modélisation.

V.1.2.2. En diafiltration à volume constant

En diafiltration, le débit de perméat expérimental observé n'évolue pas, alors que la concentration totale dans le rétentat diminue. Un nouveau modèle similaire au précédent peut être déterminé en ne prenant pas en compte l'évolution de la concentration dans le rétentat. Cependant, la finalité de la modélisation du flux de perméat est de réaliser ensuite l'optimisation dynamique de l'ultrafiltration. Un modèle unique doit donc être utilisé.

Le modèle établi en concentration discontinue a donc été utilisé pour prédire la densité de flux en diafiltration dans quatre conditions opératoires (Figure 54). On peut remarquer que la densité de flux de perméat initial est prédite avec précision par le modèle dans chaque cas. Pour les expériences à 10 g.L⁻¹ de concentration initiale, le modèle est satisfaisant tout au long de la diafiltration. Cependant, pour les diafiltrations à 50 g.L⁻¹ et 70 g.L⁻¹ de concentration initiale, une surestimation du modèle est observée au fil des diavolumes, atteignant respectivement 20 % et 22 % au bout de 10 DV. Pour des concentrations initiales élevées, cette variable a une influence importante sur le modèle établi, alors que pour des concentrations plus faibles, l'impact d'une variation de la concentration est négligeable devant les autres variables du modèle (PTM et d_{feed}). De plus, on peut noter que la déviation du modèle est rapide en début de diafiltration, puis tend à se stabiliser après 8 DV. Cette tendance s'explique par la décroissance exponentielle de la concentration dans le rétentat (Eq 50, p 95). On peut donc raisonnablement conclure que, dans la gamme de conditions opératoires étudiées, l'erreur d'estimation de la densité du flux de perméat, par le modèle de résistances en série, ne dépassera pas 25 % quel que soit le nombre de diavolumes.

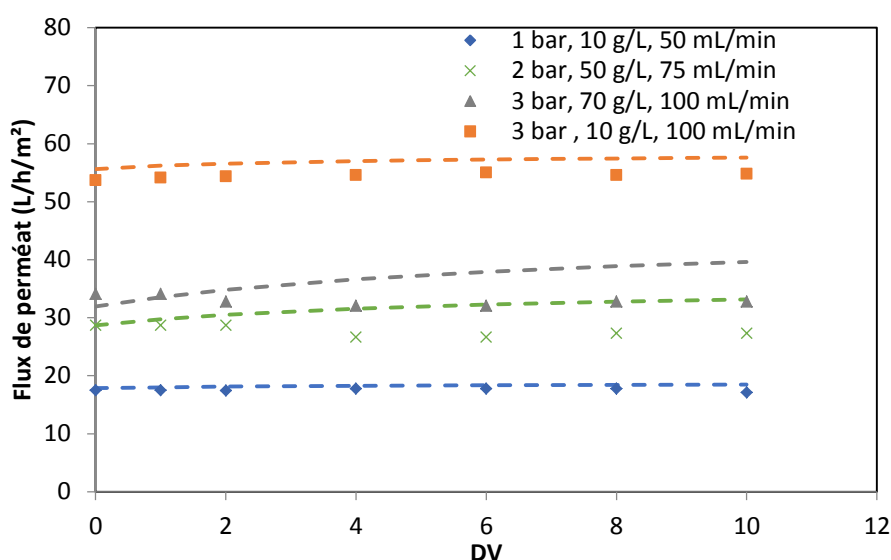


Figure 54. Comparaison des densités de flux expérimentales de perméat en diafiltration (symboles) aux densités de flux modélisées (tirets) dans quatre conditions opératoires différentes (PTM, C₀, d_{feed}).

V.1.3. Conclusion

En résumé, un modèle de résistances en série, dépendant de la pression transmembranaire, de la concentration du rétentat et du débit de recirculation a été choisi pour prédire le débit de perméat au cours de l'ultrafiltration. Les paramètres du modèle ont été déterminés à partir de données expérimentales. Les débits initiaux en recirculation totale sont prédits avec une bonne précision. La chute du débit de perméat au cours de la concentration est prédite avec moins de 12 % d'erreur relative. En diafiltration, le débit est stable alors que la modélisation prédit une légère augmentation. Une erreur relative maximale de 25 % peut être obtenue sur la prédiction.

V.2. Mise en œuvre de l'optimisation dynamique

V.2.1. Analyse des critères et optimisation dynamique monocritère

Quatre critères ont été choisis pour représenter les performances de l'ultrafiltration :

- le rendement en peptides ou fractions d'intérêt.
- leur pureté ou enrichissement.
- la durée totale du procédé (t_f).
- le volume d'eau de diafiltration utilisé (V_{eau}).

La première étape des travaux d'optimisation consiste à étudier chaque critère individuellement, un autre critère étant alors fixé comme une contrainte terminale. Le profil optimal de la variable de décision α obtenu dans chaque cas est analysé. Cette étape permet de mieux comprendre le système étudié, le problème d'optimisation et d'identifier les critères indépendants et antagonistes.

V.2.1.1. Interdépendance du rendement et de l'enrichissement

Le rendement et l'enrichissement en peptides ou fractions cibles sont les deux critères représentant la qualité du fractionnement. Ils sont calculés à partir des concentrations en peptides cibles et de la concentration globale en peptide dans le compartiment concerné (Eq. 7-12, p 19).

Dans le cas des peptides totalement retenus dans le rétentat ($R = 1$), leur rendement sera toujours de 1. Seul l'enrichissement de cette fraction peut être optimisé.

Dans le cas d'un peptide dont la rétention est différente de 1, fixer son rendement dans un compartiment revient à fixer sa répartition de masse entre le rétentat et le perméat et donc fixer

l'avancement du système. Par conséquent, les masses de tous les autres peptides dans les deux compartiments sont aussi définies. D'après la définition de l'enrichissement, il est également fixé pour chaque peptide. Le rendement et l'enrichissement ne sont donc pas indépendants et ne peuvent pas être définis tous les deux simultanément comme critères d'optimisation. Par exemple, la dépendance entre le rendement et l'enrichissement de l' α -casozépine dans le perméat est représenté Figure 55.

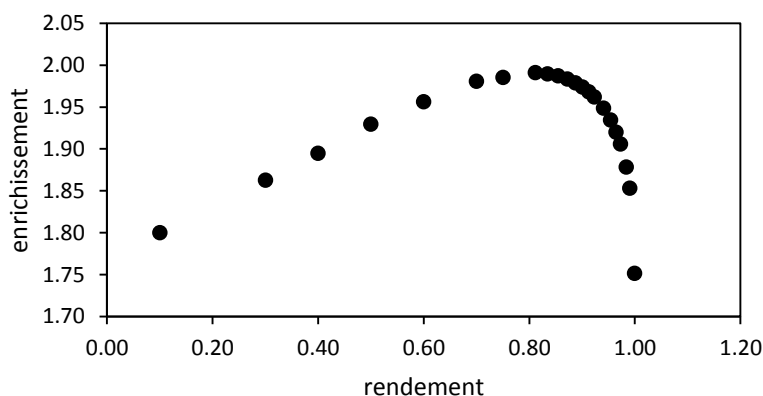


Figure 55. Relation entre l'enrichissement et le rendement de l' α -casozépine pouvant être obtenu dans le perméat au cours de l'ultrafiltration du Lactium® sur une membrane en cellulose régénérée de 3 kDa.

L'enrichissement, la durée finale et le volume d'eau sont donc les trois critères indépendants et antagonistes. Avant de mettre en œuvre l'optimisation multicritère, le profil de α optimal obtenu lors de l'optimisation monocritère est étudié. La minimisation du temps final et du volume d'eau consommée est réalisée, pour un enrichissement fixé comme contrainte terminale.

V.2.1.2. Optimisation monocritère du volume d'eau consommée (V_{eau})

- Cas 1 : purification de la fraction retenue dans le rétentat

La fraction de masse molaire supérieure à 3000 g.mol^{-1} a une pureté de 0,38 dans le lactium® initial. Cette fraction est totalement retenue dans le rétentat (rendement = 1) et est purifiée au fur et à mesure de l'élimination des petits peptides dans le perméat. Pour l'optimisation monocritère de V_{eau} , la pureté de la fraction retenue à atteindre a été fixée à 0,9, correspondant à un enrichissement de 2,4. Le problème d'optimisation est défini comme suit :

$$\min_{\alpha} V_{eau} = \int_0^{t_f} u(t)q(t)dt$$

soumis à $\dot{x} = f(x(t), u(t))$ (modèle)

$x = [C_{r,i}, \overline{C_{p,i}}, V_r, V_p, R_i, q]$ (variables d'état)

$u = [\Delta t_1, \dots, \Delta t_{10}, \alpha_1, \dots, \alpha_{10}]$ (variable de décision) (Eq. 75)

$0 \leq u(t) \leq 1$

$0,25 \leq V_r(t) \leq 1$ (limite du pilote d'UF)

$\sum C_{r,i}(t) \leq 70$ (limite de solubilité du Lactium®)

$p_{MM>3000}(t_f) = 0,9$ (contrainte terminale)

La Figure 56 montre le profil optimal de la variable de décision α . Une première étape de concentration ($\alpha = 0$) est suivie de trois paliers où la valeur de α est proche de 1. Pour comprendre ce profil, l'évolution de la concentration dans le rétentat simulée au cours du temps est présentée Figure 57. Le temps de basculement entre les 2 phases du procédé correspond au moment où la contrainte de concentration maximale dans le rétentat de 70 g.L⁻¹ est atteinte. Cette concentration est atteinte pour un volume de rétentat d'environ 50 mL, correspondant à un facteur de réduction volumique de 10 (Figure 58). La valeur de α est alors fixée pour que la concentration reste autour de cette valeur maximale, comme le montre la Figure 57. Le volume de rétentat est alors maintenu constant au cours de la deuxième phase. Cette valeur de α est appliquée jusqu'à ce qu'une pureté de 0,9 ciblée soit atteinte (Figure 59). Le volume d'eau consommée (Figure 60) est donc nul tant que α est fixé à 0, puis il augmente de façon quasi constante, la valeur de α étant proche de 1.

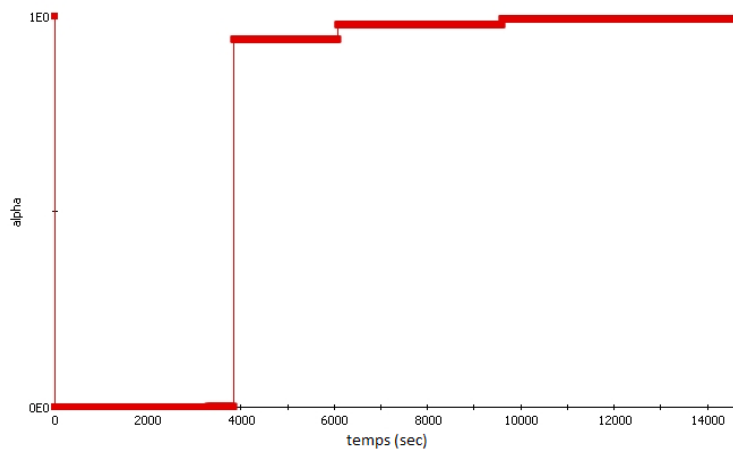


Figure 56. Profil optimisé de α en fonction du temps pour minimiser le volume d'eau consommée et atteindre une pureté de 0,9 de la fraction retenue dans le rétentat.

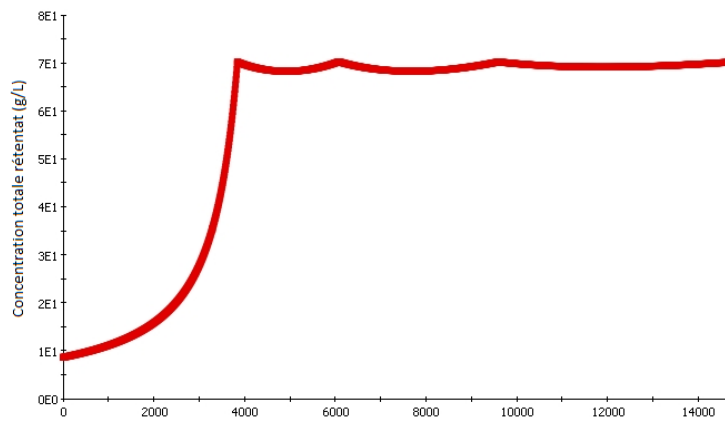


Figure 57. Concentration totale en peptide dans le rétentat simulée pour le profil α présenté Figure 56.

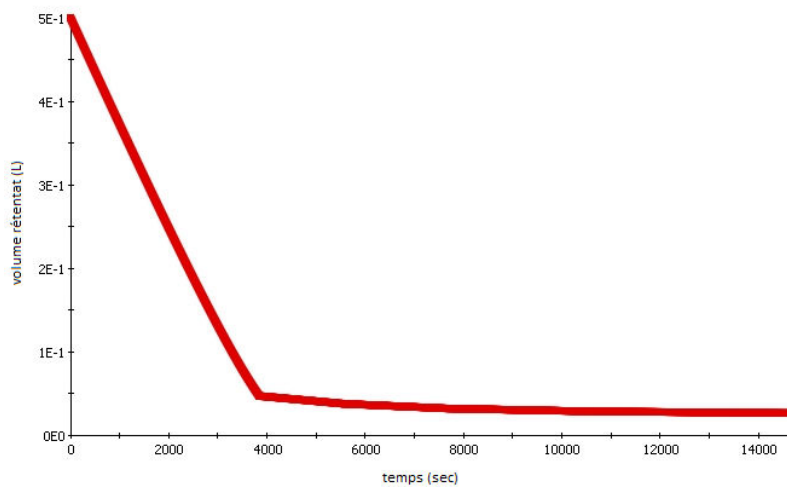


Figure 58. Volume du rétentat simulé pour le profil α présenté Figure 56.



Figure 59. Evolution de la pureté en fraction totalement retenue dans le rétentat pour le profil α présenté Figure 56.

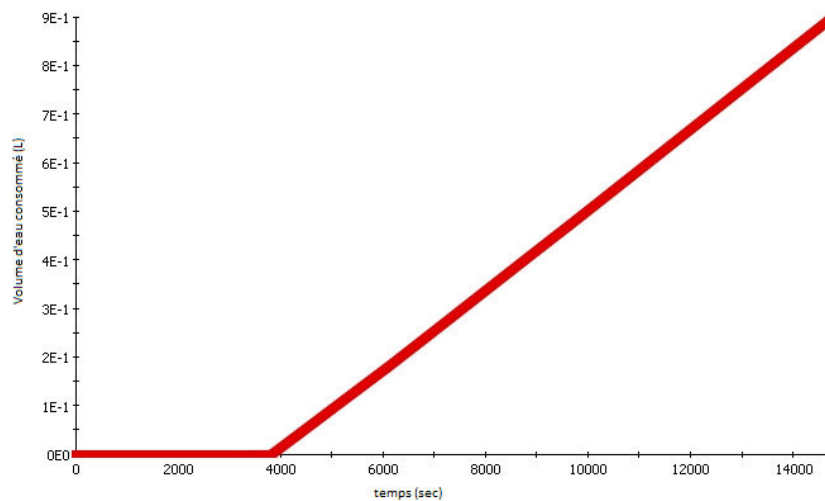


Figure 60. Volume d'eau consommée simulé pour le profil α présenté Figure 56.

- Cas 2 : enrichissement de l' α -casozépine dans le perméat

Un enrichissement de 2 en α -casozépine dans le perméat peut être atteint (Figure 55). Cette valeur de 2 est choisie comme contrainte terminale pour l'optimisation monocritère de V_{eau} . Le problème d'optimisation s'écrit comme précédemment, seule la contrainte terminale change. Comme dans le cas précédent, le profil de α optimal est divisé en deux parties (Figure 61). La première représente une étape de concentration ($\alpha = 0$), puis une phase où la valeur de α est proche de 1 jusqu'à ce que l'enrichissement fixé soit atteint. Le temps de basculement est le même que dans le cas précédent (3900 sec) et est défini par la contrainte de concentration maximale dans le rétentat (graphique non présenté).

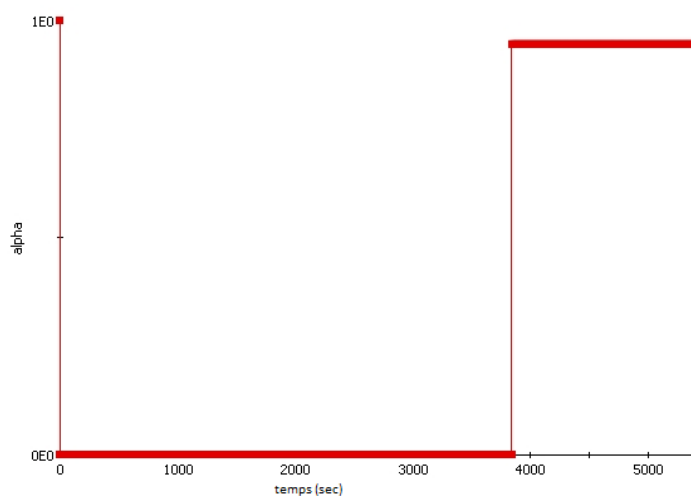


Figure 61. Profil optimisé de α en fonction du temps pour minimiser le volume d'eau consommée et atteindre un enrichissement de 2 en α -casozépine dans le perméat.

V.2.1.3. Optimisation monocritère de la durée finale (t_f)

La même démarche a été appliquée pour l'optimisation monocritère de la durée finale. Deux cas ont été étudiés : la minimisation de t_f pour une pureté finale de la fraction retenue dans le rétentat fixée à 0,9, et la minimisation de t_f pour un enrichissement de 2 de l' α -casozépine dans le perméat.

Dans les deux cas, les profils optimaux de α sont identiques à ceux obtenus pour la minimisation du volume d'eau consommé. α est nul, puis prend une valeur proche de 1. Le temps de basculement entre les deux phases est contrôlé par la concentration maximale dans le rétentat.

V.2.1.4. Discussion sur les profils optimaux de α

L'optimisation monocritère du volume d'eau consommée ou du temps final pour une performance de séparation donnée conduit à un même type de profil de la variable α . La mise en œuvre optimale de l'ultrafiltration est constituée d'une phase en concentration discontinue, jusqu'à la concentration maximale dans le rétentat, puis une phase de diafiltration consistant à maintenir cette concentration constante jusqu'à atteindre le critère de performance souhaité. Ce profil optimal est de type bang-bang (Paulen *et al.*, 2012) et signifie que les valeurs prises par la variable de décision ne sont régies que par les contraintes du problème d'optimisation. Il n'y a pas d'arc singulier, correspondant à une trajectoire optimale de la variable de décision régie par les conditions nécessaires d'optimalité. La présence ou non d'arc singulier pourrait être démontrée par une résolution analytique du problème d'optimisation. La complexité du modèle, notamment liée au nombre de coupe de masses molaires, n'a pas permis de réaliser une résolution analytique rapide. Cependant, il a été démontré que ce contrôle de type bang-bang est obtenu lorsque le modèle est affine en la variable de décision (Srinivasan *et al.*, 2003).

Paulen *et al.* (2012) ont étudié, analytiquement et numériquement, le problème de minimisation du diluant ou de la durée du procédé pour le fractionnement membranaire d'un mélange binaire, composé d'un macrosoluté et de microsolutés. Ils expliquent que le problème de minimisation du diluant, dans le cas de rétentions membranaires constantes, est un problème de contrôle de type bang-bang. Dans les présents travaux, la rétention de chaque fraction du mélange complexe est également considérée constante. Les résultats obtenus par résolution numérique pour la minimisation du volume d'eau consommée sont donc cohérents avec les conclusions de Paulen *et al.* (2012).

Dans le cas de la minimisation de la durée finale, des auteurs ont montré qu'une modification importante de la résistance au transfert du perméat au cours du procédé (liée à l'augmentation de la concentration du rétentat) engendre la présence d'un arc singulier dans la trajectoire optimale de la variable de décision (Fikar *et al.*, 2010; Jelemenský *et al.*, 2016). Ainsi, une diminution

importante du débit de perméat au cours de la première étape de concentration peut nécessiter un temps de basculement avant d'atteindre la concentration maximale dans le rétentat pour minimiser la durée finale. Dans ces travaux, l'étude du fractionnement du Lactium® sur la membrane considérée révèle une évolution du débit de perméat au cours de la concentration et de la diafiltration relativement faible, ce qui explique l'obtention d'un profil optimal de α similaire à celui obtenu pour la minimisation du volume d'eau consommée.

Pour montrer l'influence de l'évolution du débit de perméat sur la minimisation de la durée du procédé, le paramètre du modèle de résistances en série 'd', lié à la concentration totale dans le rétentat (Eq 52), a été modifié pour simuler une diminution du débit plus importante au cours de l'implémentation en concentration discontinue. Ce nouveau modèle fictif a été intégré au modèle. Les Figure 63 et Figure 62 montrent les résultats d'optimisation du volume d'eau ou d'optimisation de la durée finale pour une pureté de la fraction retenue dans le rétentat de 0,9. Dans le cas de la minimisation du volume d'eau (Figure 62), on remarque que le contrôle est bien de type bang-bang comme précédemment, le temps de basculement étant uniquement régi par la contrainte de concentration maximale du rétentat. Il est à noter que le temps nécessaire pour atteindre une pureté de 0,9 est plus important comparé à la Figure 56, à cause de la chute très importante du débit de perméat. Dans le cas de la minimisation de la durée finale (Figure 63), il apparaît que le temps de basculement est inférieur à celui observé Figure 62 A et la concentration maximale dans le rétentat n'est pas atteinte. Ici, l'utilisation anticipée de la diafiltration permet de limiter la diminution du débit de perméat et la performance de pureté souhaitée est atteinte plus rapidement. Ces résultats illustrent l'influence de l'évolution du débit de perméat pour la minimisation de la durée du procédé et confirment que les conditions réelles de résistance observées expérimentalement ne sont pas suffisamment contraignantes pour jouer un rôle dans l'optimisation.

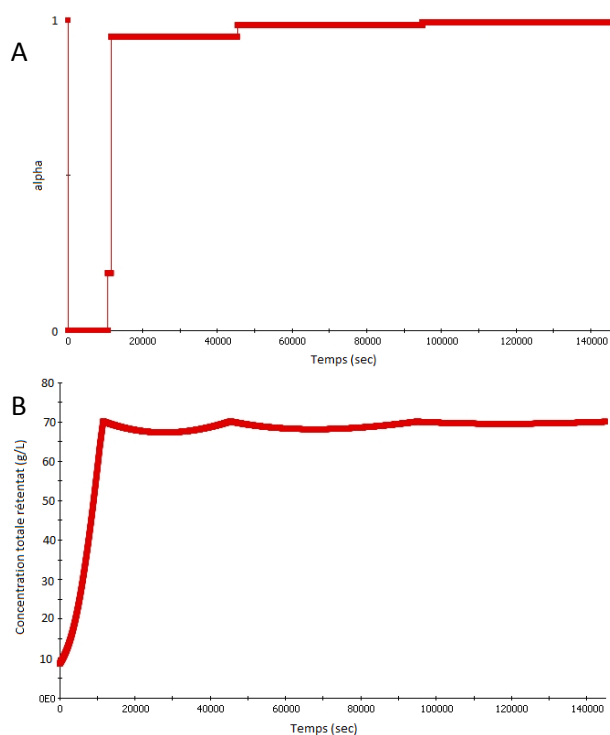


Figure 62. Profil alpha (A) et concentration globale dans le rétentat (B) en fonction du temps obtenu pour la minimisation du volume d'eau en utilisant le modèle modifié du flux de perméat.

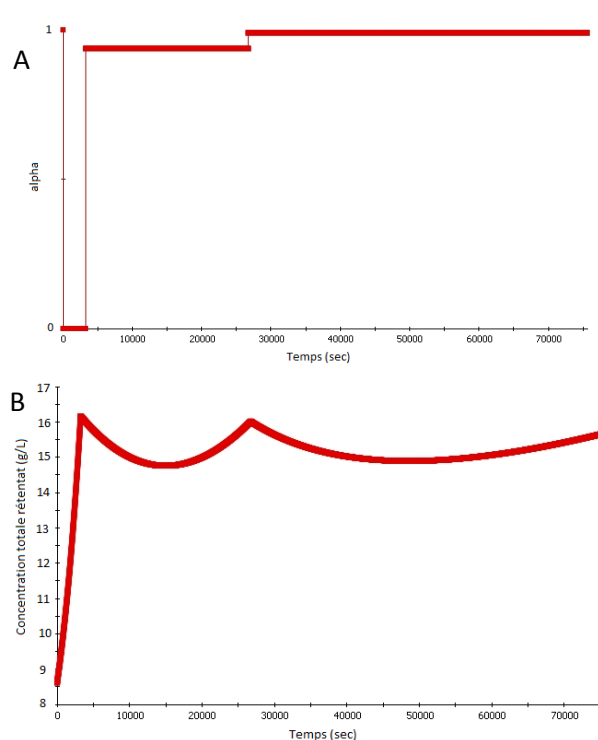


Figure 63. Profil alpha (A) et concentration totale dans le rétentat (B) en fonction du temps obtenu pour la minimisation de la durée finale en utilisant le modèle modifié du flux de perméat.

V.2.1.5. Cartographies des performances

Les résultats précédents ont montré que le rendement et l'enrichissement étaient deux critères liés représentant les performances de séparation. Pour chaque coupe du mélange, caractérisée par une masse molaire, un graphique tel que celui obtenu pour l' α -casozépine (Figure 55) peut alors être déterminé par simulation, reliant le rendement à l'enrichissement dans un compartiment donné. De plus, l'optimisation monocritère a permis de montrer que le problème de minimisation du volume d'eau est équivalent au problème de minimisation de la durée du procédé. Pour chaque point de performance rendement / enrichissement, la durée et le volume d'eau minimal requis peuvent être optimisés. Cette démarche permet d'obtenir une cartographie des performances atteignables dans chaque compartiment pour un mélange et une membrane donnés. Les Figure 64 et Figure 65 présentent les cartographies des performances de fractionnement de la membrane 3 kDa en cellulose régénérée utilisée dans ces travaux pour fractionner le Lactium®.

Pour un mélange donné, ce type de cartographie peut être obtenu pour différentes membranes et peut être un outil de comparaison des performances et une aide dans le choix de la membrane la plus appropriée pour un objectif ciblé.

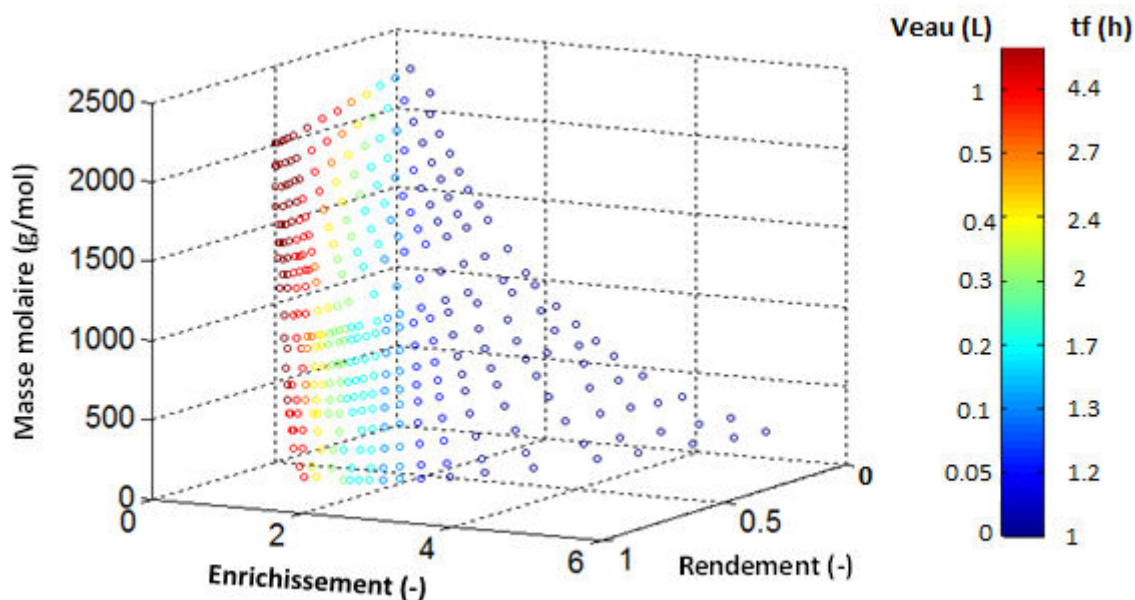


Figure 64. Cartographie des performances atteignables dans le perméat pour le fractionnement du Lactium® sur membrane de 3 kDa.

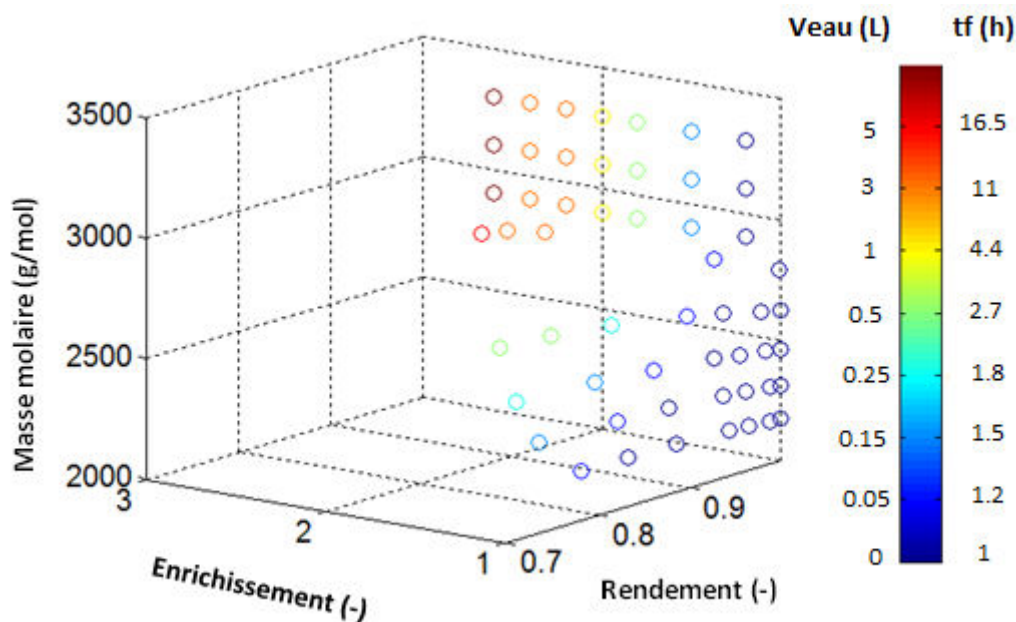


Figure 65. Cartographie des performances atteignables dans le rétentat pour le fractionnement du Lactium® sur membrane de 3 kDa.

V.2.2. Optimisation dynamique multicritère

L'optimisation multicritère permet de prendre en compte plusieurs critères et d'obtenir un front de Pareto représentant les meilleurs compromis. A partir des conclusions de l'optimisation monocritère, l'étude multiobjective a consisté à maximiser la pureté ou l'enrichissement d'une fraction ou d'un peptide cible et à minimiser la durée du procédé. L'optimisation a été réalisée sur la fraction de peptides totalement retenue dans le rétentat ($> 3000 \text{ g.mol}^{-1}$) et sur l' α -cazosépine bioactive enrichie dans le perméat.

V.2.2.1. Cas 1 : fraction retenue dans le rétentat (R=1)

La fraction de masses molaires supérieures à 3000 g.mol^{-1} est totalement retenue dans le rétentat et présente donc un rendement de 1 quelle que soit l'évolution du système. Elle est purifiée en éliminant les petits peptides dans le perméat. L'augmentation de sa pureté est donc antagoniste à la diminution de la durée totale du procédé.

- Obtention du front de Pareto

Le problème d'optimisation multicritère a été résolu en utilisant la méthode epsilon-contrainte (définie § I.4.4.2). La pureté finale de la fraction est définie comme une contrainte supérieure à une valeur epsilon et le temps final est minimisé. Pour chaque valeur d'epsilon choisie, la résolution numérique du système d'optimisation est réalisée en utilisant le logiciel gPROMS. Le problème d'optimisation est le suivant :

$$\begin{aligned} \min_{\alpha} t_f &= \int_0^{t_f} dt \\ \text{soumis à } \dot{x} &= f(x(t), u(t)) \\ x &= [C_{r,i}, \overline{C_{p,i}}, V_r, V_p, R_i, q] \\ u &= [\Delta t_1, \dots, \Delta t_{10}, \alpha_1, \dots, \alpha_{10}] \\ 0 &\leq u(t) \leq 1 \\ 0,25 &\leq V_r(t) \leq 1 \\ \sum C_{r,i}(t) &\leq 70 \\ p_{MM>3000}(t_f) &\geq \varepsilon \end{aligned} \tag{Eq. 76}$$

Une approximation du front de Pareto du problème d'optimisation est alors obtenue (Figure 66). On peut remarquer que cette représentation des meilleurs compromis entre les deux critères considérés présente une partie concave, qui a pu être mise en évidence grâce à la méthode epsilon-contrainte.

L'obtention de ce front de Pareto est le résultat de l'optimisation multiobjective. A chaque point de la figure, un profil de la variable de décision α est associé. Ce profil est similaire au profil Figure 56. Seul le temps final varie. Pour sélectionner une solution unique à mettre en œuvre, une approche d'aide à la décision est utilisée.

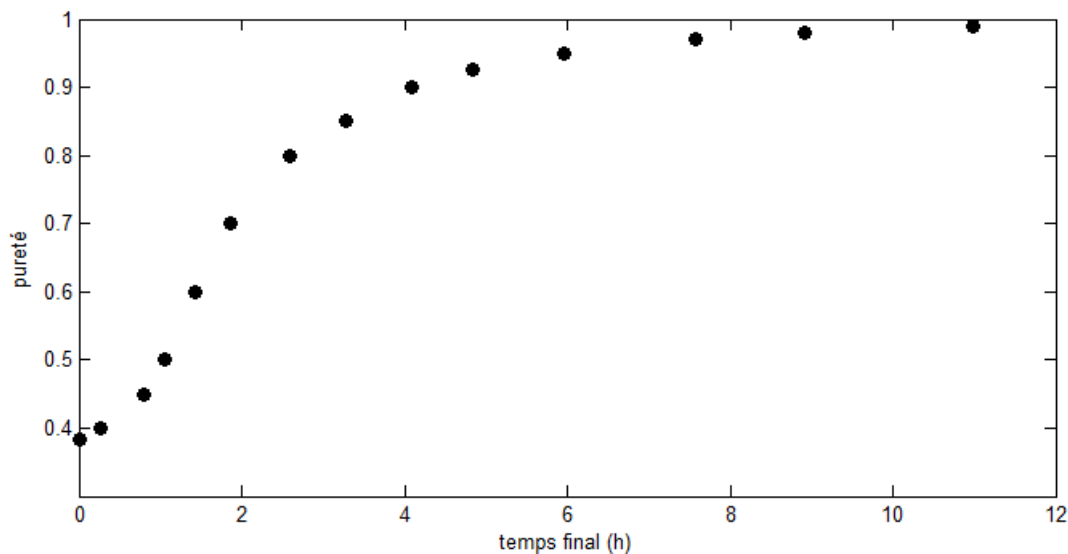


Figure 66. Approximation du front de Pareto du problème d'optimisation de la pureté de la fraction retenue dans le rétentat et du temps final du procédé (cas 1).

- Aide à la décision – fonctions de MAUT

L'approche choisie pour décider de la meilleure solution parmi les meilleurs compromis est la théorie d'utilité multi-attribut. Les fonctions d'utilités individuelles ainsi que la fonction d'utilité multi-attribut sont présentées dans le chapitre II (§ II.5.3). Le Tableau 14 présente les paramètres choisis pour le calcul des fonctions. Ce choix peut être aidé par une modélisation plus poussée des préférences du décideur basée sur des principes du génie décisionnel (réponse à un questionnaire, classement de solutions définies...). Dans le cas présent, seul deux critères sont considérés. La tolérance γ et le poids w de chaque critère ont été définis directement par le décideur. Les valeurs γ ont été fixées à 1, signifiant une tolérance moyenne de chaque critère par rapport à sa valeur optimale. Le front de Pareto indique que l'augmentation de la pureté est rapide en début de procédé puis tend lentement vers 1. Par conséquent, le poids lié au temps final a été légèrement favorisé pour tenir compte de cette tendance.

Tableau 14. Paramètres et poids associés aux fonctions d'utilité individuelles (cas 1).

| | critère | γ | Poids (w) |
|-------|-------------|----------|-----------|
| g_1 | temps final | 1 | 0,6 |
| g_2 | pureté | 1 | 0,4 |

Les points du front de Pareto sont alors classés selon l’approche MAUT utilisée (Figure 67). On peut noter que la meilleure classe de solutions se trouve au milieu du front de Pareto, résultant des poids choisis proche de 0,5 pour chaque critère. Les classes suivantes sont partagées en deux zones de part et d’autre. La modification des poids de chaque critère déplace la zone des meilleurs individus le long du front de Pareto.

Le profil de la variable de décision alpha associé à la meilleure solution est présenté Figure 68. Une pureté de 0,8 de la fraction retenue est obtenue en 2,6 heures. Le volume d’eau consommé correspondant est de 0,49 L.

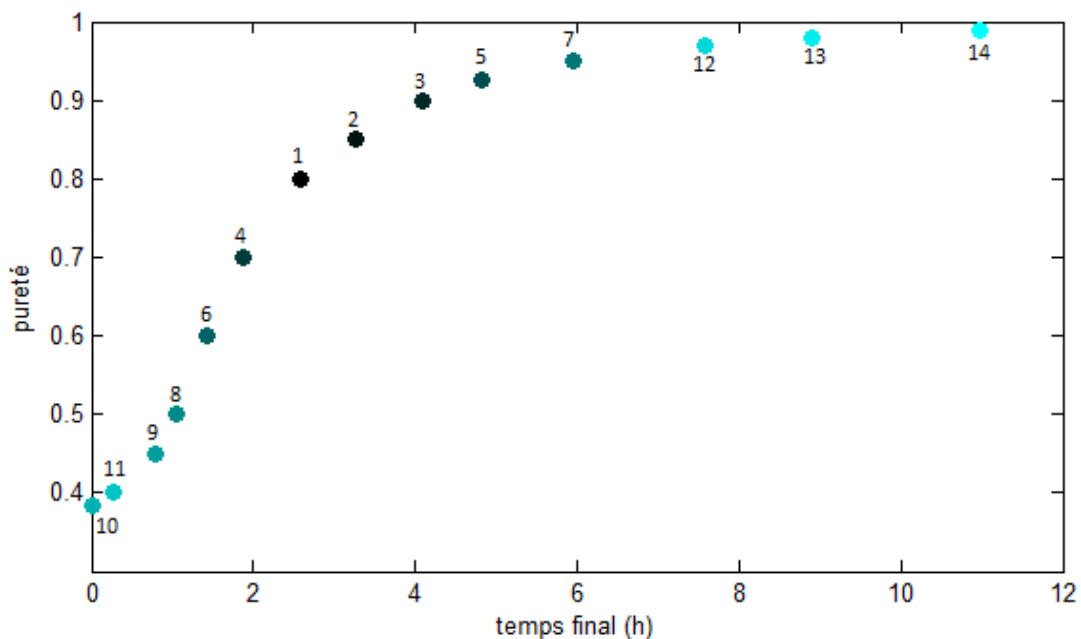


Figure 67. Classement des meilleures solutions pureté de la fraction retenue/ durée finale selon la méthode MAUT (cas 1).

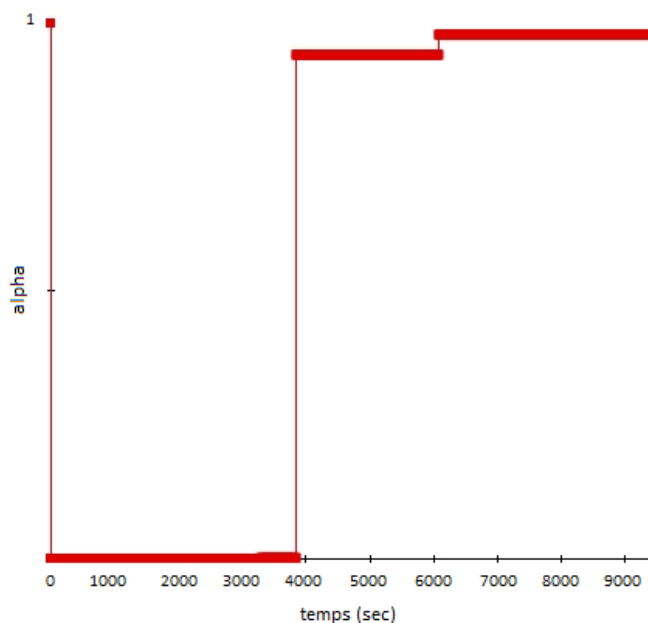


Figure 68. Profil de la variable alpha en fonction du temps pour la meilleure solution déterminée par la méthode de MAUT (cas 1).

- Mise en œuvre expérimentale

Le profil α de la meilleure solution a été implémenté. Le pilote d'ultrafiltration utilisé ne permet pas de contrôler automatiquement le débit de diafiltration par rapport au débit de perméat. Pour simplifier la mise en œuvre expérimentale de la solution optimale (Figure 68), seul deux paliers ont été appliqués. Le premier correspond à l'étape de concentration discontinue ($\alpha = 0$), puis une étape de diafiltration à volume constant ($\alpha = 1$) avec un basculement à un volume de rétentat de 50 mL (correspondant à un facteur de réduction volumique de 10) pour atteindre la concentration maximale dans le rétentat de 70 g/L. Puis 0,49 litre (≈ 10 diavolumes) sont ajoutés au rétentat pour atteindre la pureté de 0,8. La simulation du procédé avec ce profil simplifié de α a été réalisée en prenant en compte l'étalonnage de la membrane ($R = f(\log MM)$) et la résistance membranaire intrinsèque (R_m) déterminés le jour même de l'expérience.

Les Figure 70 et Figure 69 présentent respectivement l'évolution du volume de rétentat et du flux de perméat au cours du temps. La simulation sous-estime légèrement le flux de perméat en début de concentration discontinue. Par conséquent le volume critique de 50 mL est atteint plus rapidement expérimentalement. Le basculement vers la phase de diafiltration a donc été anticipé pendant l'expérience. Pour rester cohérent avec le profil optimal, 10 diavolumes en continu ont été ajoutés ensuite au rétentat. Le temps final expérimental est donc de 142 min au lieu de 160 min simulé, soit 12 % d'écart. La Figure 71 présente l'évolution de la concentration globale en peptides dans le rétentat. Le décalage des temps de basculement expérimentaux et simulés est reporté sur

les profils de concentration. On remarque tout de même que la concentration maximale est bien atteinte en fin de concentration discontinue et la prédiction de la diminution de la concentration en diafiltration est satisfaisante. Enfin, une bonne prédiction de l'évolution de la pureté de la fraction totalement retenue dans le rétentat est observée (Figure 72). Une pureté finale expérimentale de 0,75 est obtenue pour une pureté simulée de 0,8.

Ces résultats expérimentaux obtenus sont globalement en bon accord avec les prédictions du modèle. Les écarts observés sont principalement liés à la sous-estimation du flux de perméat.

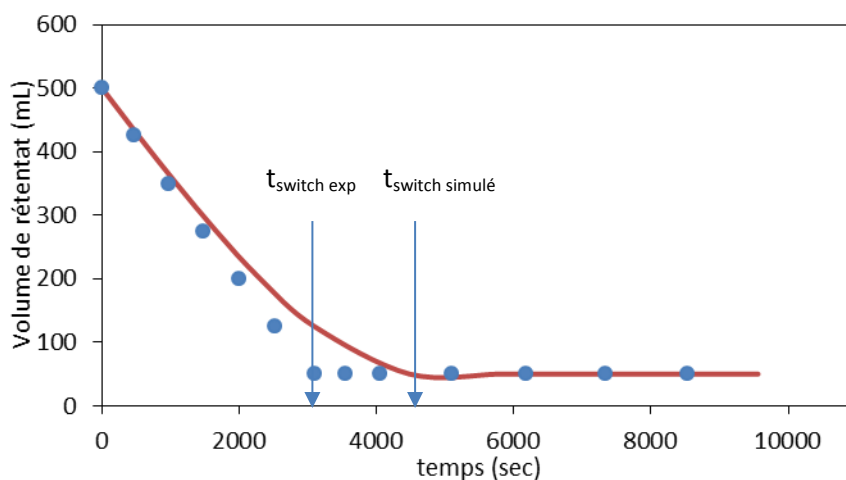


Figure 70. Evolution du volume de rétentat simulé (ligne) et expérimental (rond) au cours de l'ultrafiltration (FRV = 10 puis DV = 10) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée.

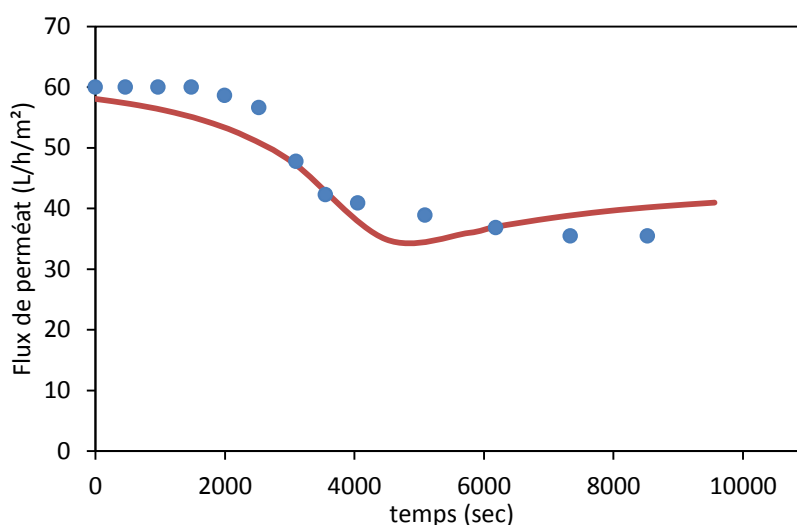


Figure 69. Evolution du flux de perméat simulé (ligne) et expérimental (rond) au cours de l'ultrafiltration (FRV = 10 puis DV = 10) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée.

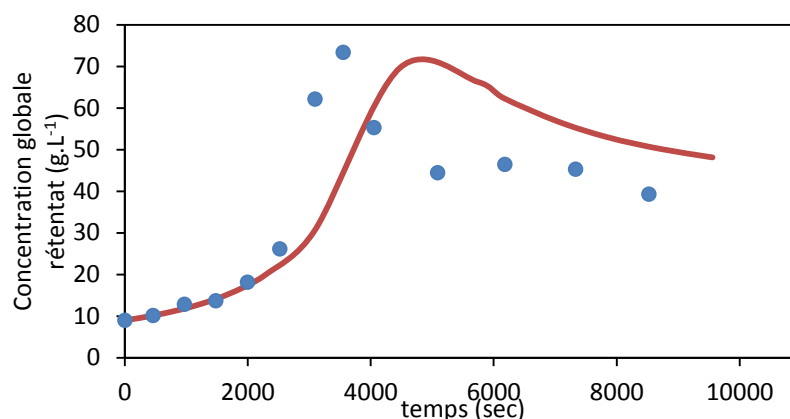


Figure 71. Evolution de la concentration globale en peptides dans le rétentat simulé (ligne) et expérimental (rond) au cours de l'ultrafiltration (FRV = 10 puis DV = 10) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée.

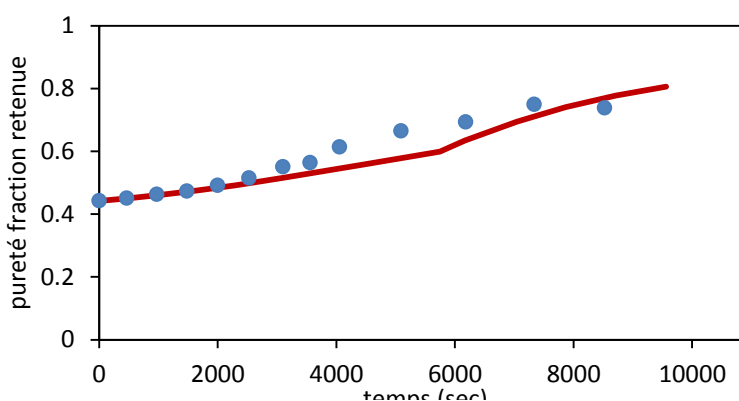


Figure 72. Evolution de la pureté de la fraction retenue simulé (ligne) et expérimental (rond) au cours de l'ultrafiltration (FRV = 10 puis DV = 10) du Lactium® sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée.

V.2.2.2. Cas 2 : enrichissement de l'α-cazosépine dans le perméat

- Obtention du front de Pareto

L'α-cazosépine peut être enrichie dans le perméat au cours de l'ultrafiltration sur la membrane 3 kDa considérée dans ces travaux. La Figure 55 (§ V.2.1.1, p 128) présente la relation entre l'enrichissement du peptide en fonction de son rendement. On peut remarquer que l'enrichissement augmente jusqu'à un rendement de 0,8, puis l'enrichissement diminue lorsque l'on se rapproche d'un rendement de 1. Cette tendance s'explique par le fait que la quantité du peptide cible dans le perméat n'évolue presque plus lorsque son rendement est proche de 1 ; la quantité totale en peptide, elle, continue à augmenter à cause de la présence de peptides de masses molaires supérieures dont le transfert total nécessite un temps plus long.

Pour l'optimisation multicritère, le rendement est défini comme une contrainte d'inégalité terminale dont la valeur limite inférieure est de 0,5. L'enrichissement est optimisé et le temps final est défini inférieur à une valeur ε . Le problème d'optimisation est le suivant :

$$\min_{\alpha} \tau_{\text{casozépine}} = \frac{\overline{C_{p,\text{casozépine}}}(t) / \sum \overline{C_{p,i}}(t)}{C_{0,\text{casozépine}} / \sum C_0}$$

soumis à $\dot{x} = f(x(t), u(t))$

$$x = [C_{r,i}, \overline{C_{p,i}}, V_r, V_p, R_i, q]$$

$$u = [\Delta t_1, \dots, \Delta t_{10}, \alpha_1, \dots, \alpha_{10}] \tag{Eq. 77}$$

$$0 \leq u(t) \leq 1$$

$$0,25 \leq V_r(t) \leq 1$$

$$\sum C_{r,i}(t) \leq 70$$

$$t_f \leq \varepsilon$$

Epsilon est incrémenté progressivement jusqu'à 3 h. L'approximation du front de Pareto obtenue est représentée dans la Figure 73. Les solutions non dominées s'étendent de 1,14 h à 1,8 h. Pour des durées inférieures, le rendement minimum n'est pas atteint. Pour des durées supérieures, l'enrichissement diminue, les solutions sont donc dominées et ne sont plus sur le front de Pareto.

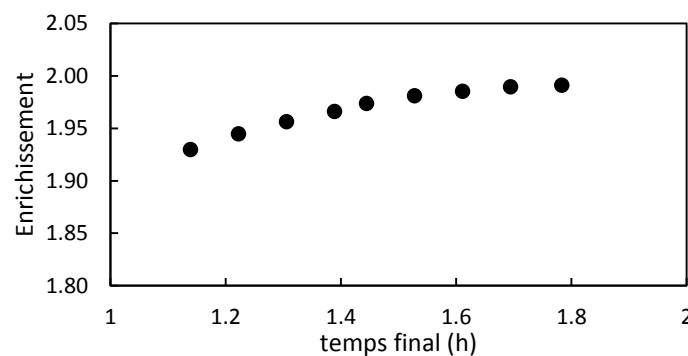


Figure 73. Approximation du front de Pareto du problème d'optimisation de l'enrichissement de l' α -casozépine dans le perméat et du temps final du procédé (cas 2).

- *Aide à la décision*

Comme dans le cas précédent, une approche d'aide à la décision a été appliquée pour déterminer les meilleurs individus parmi les solutions optimales du front de Pareto. Les

paramètres choisis associés pour construire les fonctions d'utilité individuelles et multi-attribut sont présentés dans le Tableau 15. Le classement des résultats par l'approche MAUT est présenté (Figure 74). Le meilleur compromis est un enrichissement de 1,98 pour un temps final de 1,7 h. Le profil optimal de la variable alpha est similaire au profil obtenu dans le cas étudié précédent (Figure 68), seul le temps final est modifié. Le volume d'eau consommée correspondant est de 0,2 L.

Tableau 15. Paramètres et poids associés aux fonctions d'utilité individuelles (cas 2).

| | critère | γ | Poids (w) |
|-------|----------------|----------|-----------|
| g_1 | temps final | 1 | 0,2 |
| g_2 | enrichissement | 1 | 0,8 |

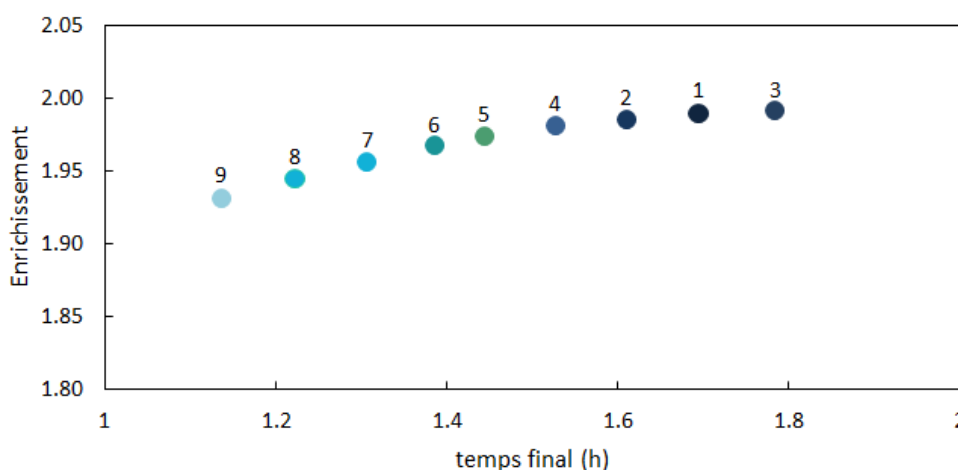


Figure 74. Classement des meilleures solutions enrichissement en α -casozépine dans le perméat / temps final selon la méthode MAUT (cas 2).

- Validation expérimentale

La validation expérimentale de l'enrichissement de l' α -casozépine dans le perméat a été réalisée simultanément à la validation de la purification de la fraction retenue présentée précédemment. Un profil simplifié de la variable α a été appliqué : une première étape de concentration discontinue jusqu'à la concentration maximale dans le rétentat, correspondant à un facteur de réduction volumique de 10, puis une étape de diafiltration. Le perméat final est cependant récolté après 0,2 L d'eau ajoutée (≈ 4 diavolumes). L'évolution de la concentration totale dans le perméat est présentée Figure 75. La sous-estimation du flux de perméat au cours de la

phase de concentration (Figure 69) engendre un décalage entre les temps finaux expérimentaux et simulés. En effet, expérimentalement, la phase finale de concentration et les 4 diavolumes de diafiltration sont atteints après 85 minutes, alors que la simulation du procédé prédit une durée finale de 117,5 minutes (soit 38 % de plus). Les performances finales peuvent néanmoins être comparées. Une concentration finale de 2 g.L⁻¹ est obtenue soit 17 % de moins que la concentration prédite. La comparaison entre l'enrichissement simulé et expérimental en α -casozépine est présentée Figure 76. Un enrichissement final expérimental de 2,25 est obtenu, soit un écart de 14 % avec l'enrichissement simulé. Ces performances de prédiction de la concentration et de l'enrichissement sont cohérentes avec les résultats obtenus dans le chapitre IV et sont satisfaisantes. La stratégie d'optimisation multicritère est performante pour maximiser l'enrichissement d'un peptide cible pour un enchaînement d'étapes d'UF et de DF définis.

Cependant, une meilleure prédiction du flux de perméat doit permettre une meilleure estimation de la durée du procédé.

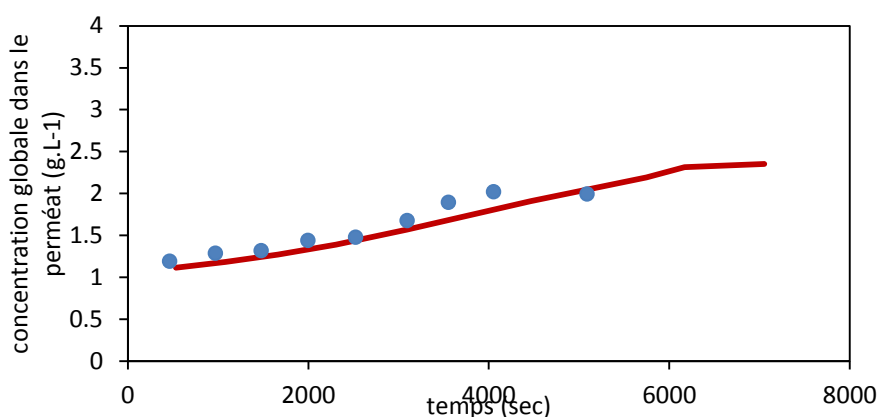


Figure 76. Evolution de la concentration globale en peptides dans le perméat simulé (ligne) et expérimental (rond).

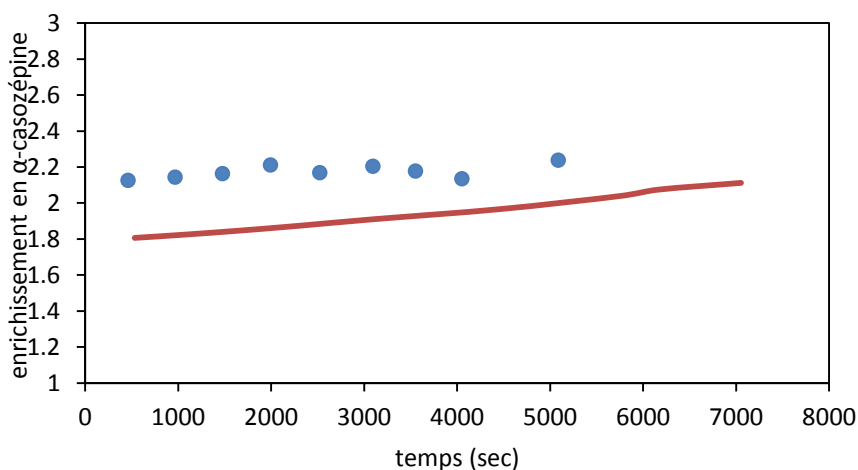


Figure 75. Evolution de l'enrichissement en α -casozépine dans le perméat simulé (ligne) et expérimental (rond).

Conclusion du chapitre V

En résumé

Le modèle de prédiction des performances de l'ultrafiltration (rendement, enrichissement et débit de perméat) a été implémenté pour réaliser l'optimisation dynamique du procédé.

Dans un premier temps, l'optimisation monocritère a été réalisée. Pour le fractionnement du lactium® et la membrane utilisée dans ces travaux, il apparaît que le profil optimal de la variable de décision α , rapport entre le débit d'eau ajouté au rétentat et le débit de perméat, est un contrôle de type bang-bang : α est nul, puis prend une valeur proche de 1 afin de maintenir la concentration en peptide dans le rétentat à sa valeur maximale. Ce profil est obtenu quel que soit le critère d'optimisation choisi. Par conséquent, la résolution des problèmes de minimisation du temps opératoire et de minimisation du volume d'eau consommée donnent le même profil optimal de la variable de décision α .

L'optimisation dynamique multicritère, couplée à l'approche MAUT d'aide à la décision, a ensuite permis de définir le meilleur compromis entre l'enrichissement d'une fraction donnée et le temps final du procédé. Deux cas ont été étudiés : la purification de la fraction de masse molaire supérieure à 3000 g.mol^{-1} du Lactium® dans le rétentat et l'enrichissement de l' α -casozépine bioactif dans le perméat. La validation expérimentale des résultats d'optimisation a montré que les performances finales du procédé sont en bon accord avec le modèle. Cependant, une meilleure estimation du flux de perméat serait nécessaire pour améliorer les performances globales de la simulation du procédé.

**CONCLUSION
GENERALE
&
PERSEPECTIVES**

Conclusion générale

La démarche de ces travaux de thèse a été construite autour de la problématique suivante : comment mettre en œuvre de façon rationnelle l'ultrafiltration pour le fractionnement d'un hydrolysate protéique et l'obtention de fractions enrichies en familles de peptides d'intérêt ou en peptides cibles. Une stratégie de modélisation et d'optimisation, basée sur les équations bilans de l'ultrafiltration, a été développée. Les points clés de cette stratégie sont (i) la prédiction de la rétention par la membrane d'ultrafiltration de chaque peptide et (ii) la prédiction de l'évolution du flux de perméat au cours du procédé. Trois étapes ont alors permis de répondre à la problématique de la thèse :

- l'étude expérimentale de la concentration discontinue et de la diafiltration pour mettre en évidence l'influence des conditions opératoires et l'avancement du procédé sur les rétentions des peptides. Cette étude a permis de présenter les hypothèses faites pour élaborer la stratégie de modélisation ;
- la validation d'une stratégie de prédiction du rendement et de l'enrichissement en fractions ou peptides cibles au cours de l'ultrafiltration ;
- la mise en œuvre d'une démarche d'optimisation pour déterminer la meilleure implémentation de l'ultrafiltration.

Les principaux résultats de ces travaux sont résumés ci-après.

Etude expérimentale de l'ultrafiltration

L'étude expérimentale de l'ultrafiltration, réalisée avec le Lactium® sur une membrane en cellulose de 3 kDa, a permis dans un premier temps de montrer que la rétention d'un peptide peut être approximée efficacement par un étalonnage de la membrane reliant la rétention d'un soluté à sa masse molaire. Cet étalonnage est construit à partir des chromatogrammes d'exclusion stérique du perméat et du rétentat. Ce résultat montre que la rétention d'un peptide en ultrafiltration dépend principalement de sa masse molaire.

L'influence des conditions opératoires sur la sélectivité de la membrane et le flux de perméat en recirculation totale a ensuite été abordée. Il a été conclu que la concentration de l'hydrolysate et la vitesse tangentielle n'influent pas sur la rétention des peptides, mais modifient la résistance au transfert du solvant à travers la couche de polarisation. Quant à l'augmentation de la pression transmembranaire, elle engendre une compression de la couche de polarisation, augmentant la rétention des plus petits peptides et la résistance au transfert du solvant. Cependant, les modifications de rétention avec les conditions opératoires ont une influence minime sur la sélectivité globale de la membrane. La concentration en hydrolysate, la vitesse tangentielle et la

pression transmembranaire jouent un rôle prédominant sur le transfert du solvant à travers la membrane mais leur influence sur la sélectivité de la membrane est négligeable.

Dans un troisième temps, l'évolution de la rétention des peptides au cours de l'ultrafiltration en concentration discontinue et en diafiltration à volume constant a été analysée à partir du suivi de plusieurs points des chromatogrammes d'exclusion stérique du perméat. Cette étude montre que le transport des peptides à travers la membrane est globalement constant au cours de l'UF et de la DF.

Validation de la stratégie de prédiction des performances de l'ultrafiltration

L'étude expérimentale de l'ultrafiltration a permis de formuler trois hypothèses : la rétention d'un peptide ne dépend que de sa masse molaire, elle n'évolue pas au cours de l'UF ou de la DF et elle peut être évaluée à partir de l'étalonnage de la membrane déterminé par CES. A partir des bilans matière de l'UF ou de la DF et de cet étalonnage, la distribution de masses molaires, la concentration globale en peptides, puis le rendement et l'enrichissement en peptides cibles dans le perméat et le rétentat peuvent être prédits en fonction du FRV ou du DV. En amont de la validation de cette stratégie, une méthode de quantification des hydrolysats par CES a été validée et publiée dans le Journal of Chromatography B. Cette méthode permet de simuler l'évolution des concentrations globales en peptides au cours de l'ultrafiltration à partir des profils de masses molaires prédits.

La stratégie globale de prédiction des performances a été validée expérimentalement. Les distributions de masses molaires de fractions du Lactium® et d'hydrolysats d'hémoglobine bovine ont été suivies par CES et le transfert de peptides cibles au cours de l'UF et de la DF a été suivi par CLHP-SM. Les critères de performances (concentrations totales, rendement et enrichissement) sont prédits en UF et en DF avec une erreur relative inférieure à 35 %, ce qui est très satisfaisant compte tenu de la complexité des mélanges. L'application de la stratégie sur des peptides bioactifs a montré l'intérêt de prédire les performances de l'ultrafiltration pour comparer les modes d'implémentation ou aider au choix du degré d'hydrolyse.

Mise en œuvre d'une démarche d'optimisation pour déterminer la meilleure implémentation de l'ultrafiltration

La dernière partie de ces travaux avait pour objectif de mettre en œuvre une démarche d'optimisation dynamique multicritère afin de déterminer le meilleur enchaînement des étapes d'UF et de DF.

Tout d'abord, La modélisation du flux de perméat au cours de l'ultrafiltration a été abordée. Il a été choisi d'utiliser un modèle de résistances en série pour prédire le flux de perméat. Deux résistances sont considérées : la résistance intrinsèque de la membrane et la résistance de la couche de polarisation. Cette dernière dépend de la pression transmembranaire, de la vitesse

tangentielle de recirculation et de la concentration en amont de la membrane. L'identification paramétrique, par la méthode des moindres carrées a permis d'établir un modèle, estimant l'évolution du flux avec moins de 25 % d'erreur relative.

Les modèles de prédiction des performances et du flux de perméat ont alors été implémentés dans le logiciel gPROMS pour résoudre numériquement le problème d'optimisation. L'optimisation prend en compte les critères de séparation mais également deux critères économiques, le volume d'eau consommé et la durée du procédé. Pour illustrer la démarche, deux cas ont été étudiés : la purification de la fraction retenue du Lactium® dans le rétentat de la membrane 3 kDa, et l'enrichissement dans le perméat de l' α -casozépine bioactif. La démarche d'optimisation multicritère a consisté à minimiser le volume d'eau utilisé et / ou la durée du procédé en maximisant l'enrichissement de la fraction ou du peptide cible, sous la contrainte d'un rendement minimal à atteindre dans le compartiment considéré. La seule variable de décision du problème est le débit d'eau de diafiltration. Pour chacun des cas, la résolution numérique du problème a permis d'obtenir un front de Pareto représentant les meilleurs compromis entre les critères. A chaque point du front de Pareto, un profil optimal du débit d'eau de diafiltration est généré. Ce travail a permis de montrer que, pour chaque fraction du Lactium® étudiée, une étape de concentration suivie d'une diafiltration est la configuration optimale pour atteindre les performances souhaitées. La mise en œuvre expérimentale de cet enchaînement d'UF et de DF a permis de montrer qu'une meilleure prédiction du flux de perméat serait nécessaire, les résultats permettent tout de même de valider la démarche globale de modélisation et d'optimisation.

Perspectives

La stratégie de prédiction des performances présentée dans ces travaux permet une mise en œuvre rationnelle d'un étage d'ultrafiltration pour le fractionnement d'hydrolysats contenant une, ou plusieurs, fraction(s) ou peptide(s) ciblé(s). La méthodologie développée peut être étendue à plusieurs étages en série. Une cascade de membranes peut être envisagée pour raffiner le perméat et obtenir plusieurs coupes à partir d'un hydrolysat. Plusieurs membranes étalonnées et dont la résistance au transfert du solvant a été caractérisée, peuvent être considérées pour réaliser une optimisation structurelle du procédé. Aussi, des critères supplémentaires peuvent être pris en compte dans l'optimisation comme la productivité des peptides ou fractions d'intérêt. Les conditions opératoires qui influencent le flux de perméat, comme la vitesse de recirculation et la pression transmembranaie, pourraient alors être des Ces deux paramètres sont également importants en termes de consommation énergétique. Plus généralement, l'optimisation peut être

réalisée en optimisant les critères de séparation et le coût global du procédé, réunissant le volume d'eau consommé, la durée du procédé et la consommation énergétique.

Le développement de modèle pour prédire et optimiser les performances d'autres procédés de fractionnement applicables aux hydrolysats (exclusion de taille, échange d'ions, électrodialyse avec des membranes d'UF, chromatographie de partage centrifuge) permettrait également de comparer les différentes options pour l'obtention d'une fraction ciblée. La qualité de la séparation mais également les aspects économiques et environnementaux pourront être pris en compte pour justifier le choix du procédé le plus adapté.

En amont du procédé de fractionnement, l'identification et la caractérisation des molécules d'intérêt dans les hydrolysats complexes sont primordiales. La compréhension des relations entre les caractéristiques physico-chimiques et structurelles des peptides et leurs propriétés nutritives, fonctionnelles ou bioactives est un enjeu scientifique majeur. De surcroît, la mise en évidence d'une relation entre l'enrichissement en molécules d'intérêt et l'amélioration des propriétés des fractions est essentielle pour le choix et l'implémentation du bon procédé de fractionnement.

Une meilleure connaissance des biomarqueurs reliés aux propriétés des peptides permettra alors d'améliorer le procédé d'hydrolyse et notamment de modéliser la libération des peptides d'intérêt d'une protéine donnée. Le couplage des modèles de la protéolyse et des procédés de fractionnement serait un outil clé pour la production de fractions peptidiques d'intérêt à partir d'une matière protéique caractérisée.

REFERENCES

- A**ider, M., Barbana, C., (2011), Canola proteins: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity – A practical and critical review. *Trend Food Sci. Technol.* 22, 21-39
- Aimar, P., Bacchin, P., Maurel, A., (2010), Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Aspects théoriques : mécanismes de transfert. *Techniques de l'ingénieur*
- Akin, O., Temelli, F., Köseoğlu, S., (2012), Membrane Applications in Functional Foods and Nutraceuticals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 347–371.
- Alashi, A.M., Blanchard, C.L., Mailer, R.J., Agboola, S.O., John Mawson, A., He, R., Girgih, A., Aluko, R.E., (2013), Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chem.* 146, 500-506.
- Amado, I.R., Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M.A., (2013), Production of antihypertensive and antioxidant activities by enzymatic hydrolysis of protein concentrates recovered by ultrafiltration from cuttlefish processing wastewaters. *Biochem. Eng. J.* 76, 43–54.
- Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L., Zhou, H.M., (2013), Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. *Int. Food Res. J.* 20, 2081–2090.
- Arora, A., Dien, B.S., Belyea, R.L., Wang, P., Singh, V., Tumbleson, M.E., Rausch, K.D., (2009), Thin stillage fractionation using ultrafiltration: resistance in series model. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32, 225–233.
- Arroume, N., Froidevaux, R., Kapel, R., Cudennec, B., Ravallec, R., Flahaut, C., Bazinet, L., Jacques, P., Dhulster, P., (2016), Food peptides: purification, identification and role in the metabolism. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 101–107.
- B**azinet, L., Firdaous, L., (2009), Membrane processes and devices for separation of bioactive peptides. *Recent Pat. Biotechnol.* 3, 61–72.

- Beata, C., Beaumont-Graff, E., Coll, V., Cordel, J., Marion, M., Massal, N., Marlois, N., Tauzin, J., (2007), Effect of alpha-casozepine (Zylkene) on anxiety in cats. *J. Vet. Behav. Clin. Appl. Res.* 2, 40–46.
- Bénézech, M., Mullens, E., Lalonde, R., Desor, D., Messaoudi, M., (2009), Un anxiolytique naturel : l'hydrolysate tryptique de caséine alpha-s1 de lait bovin. Son intérêt en médecine humaine et vétérinaire. *Ann. Méd.-Psychol. Rev. Psychiatr.* 167, 605–610.
- Benkerroum, N., (2010), Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. *A review. Int. J. Dairy Technol.* 63, 320–338.
- Benyahia, B., (2009), Modélisation, expérimentation et optimisation multicritère d'un procédé de copolymérisation en émulsion en présence d'un agent de transfert de chaîne. *Thèse, INPL, Nancy.*
- Berg, van den G., Smolders, C.A., (1990), Flux decline in ultrafiltration processes. *Desalination* 77, 101–133.
- Bérot, S., Chaufer, B., Basso, Y., Legay, C., Popineau, Y., (1999), Fractionation of gliadin hydrolysates in water-ethanol by ultrafiltration with modified or unmodified membranes. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 649–658.
- Biegler, L.T., (2007), An overview of simultaneous strategies for dynamic optimization. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 46, 1043–1053.
- Bodin, A., Framboisier, X., Alonso, D., Marc, I., Kapel, R., (2015), Size-exclusion HPLC as a sensitive and calibrationless method for complex peptide mixtures quantification. *J. Chromatogr. B.*, 1006, 71-79
- Bodin, A., Framboisier, X., Marc, I., Kapel, R., submitted. Fractionation of a casein hydrolysate by tangential filtration using a 3 kDa regenerated cellulose membrane. Part I: membrane selectivity, UF and DF mode performances. *En cours de soumission*
- Bodin, A., Framboisier, X., Fournier, F., Marc, I., Kapel, R., submitted. Fractionation of a casein hydrolysate by tangential filtration using a 3 kDa regenerated cellulose membrane. Part II: Yield and enrichment prediction of targeted peptides in UF and DF. *En cours de soumission*

- Boudesocque, L., Kapel, R., Paris, C., Dhulster, P., Marc, I., Renault, J.-H., (2012), Concentration and selective fractionation of an antihypertensive peptide from an alfalfa white proteins hydrolysate by mixed ion-exchange centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. B* 905, 23–30.
- Bourseau, P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Massé, A., Guérard, F., Chabeaud, A., Fouchereau-Péron, M., Le Gal, Y., Ravallec-Plé, R., Bergé, J.-P., Picot, L., Piot, J.-M., Batista, I., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I., (2009), Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *Desalination* 244, 303–320.
- Brun, J.-P., (1989), Procédés de séparation par membranes : transport, techniques membranaires, applications. *Masson*, Paris.
- Bryson, A.E., Ho, Y.-C., (1975), Applied optimal control. *Hemisphere publishing corporation*, Washington.
- C**ausserand, C., Rouaix, S., Akbari, A., Aimar, P., (2004), Improvement of a method for the characterization of ultrafiltration membranes by measurements of tracers retention. *J. Membr. Sci.* 238, 177–190.
- Cakir-Kiefer, C., Le Roux, Y., Balandras, F., Trabalon, M., Dary, A., Laurent, F., Gaillard, J.-L., Miclo, L., (2011), Digestibility of α -Casozepeine, a Benzodiazepine-like Peptide from Bovine Casein, and Biological Activity of Its Main Proteolytic Fragment. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4464–4472.
- Cavazos, A., Gonzalez de Mejia, E., (2013), Identification of Bioactive Peptides from Cereal Storage Proteins and Their Potential Role in Prevention of Chronic Diseases. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12, 364–380.
- Centenaro, G.S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M.L., Prentice, C., (2014), Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: Investigation of antioxidant activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 2877–2893.
- Chabanon, G., Alves da Costa, L., Farges, B., Harscoat, C., Chenu, S., Goergen, J.-L., Marc, A., Marc, I., Chevalot, I., (2008), Influence of the rapeseed protein hydrolysis process on CHO cell growth. *Bioresour. Technol.* 99, 7143–7151.

- Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guerard, F., (2009a), Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Sep. Purif. Technol.* 66, 463–471.
- Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P., Guérard, F., (2009b), Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolysate (*Pollachius virens*): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances. *J. Food Eng.* 91, 408–414.
- Chachuat, B., (2001), Méthodologie d'optimisation dynamique et de commande optimale des petites stations d'épuration à boues activées. *Thèse*, INPL, Nancy.
- Chay Pak Ting, B.P., Mine, Y., Juneja, L.R., Okubo, T., Gauthier, S.F., Pouliot, Y., (2011), Comparative Composition and Antioxidant Activity of Peptide Fractions Obtained by Ultrafiltration of Egg Yolk Protein Enzymatic Hydrolysates. *Membranes* 1, 149–161.
- Chobert, J.M., Briand, L., Gueguen, J., Popineau, Y., Larre, C., Haertle, T., (1996), Recent advances in enzymatic modifications of food proteins for improving their functional properties. *Nahr. Food* 40, 177–182.
- Clemente, A., (2000), Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 254–262.
- Contreras, M. del M., Sevilla, M.A., Monroy-Ruiz, J., Amigo, L., Gómez-Sala, B., Molina, E., Ramos, M., Recio, I., (2011), Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. *Int. Dairy J.* 21, 470–476.
- D**as, I., Dennis, J., (1997), A closer look at drawbacks of minimizing weighted sums of objectives for Pareto set generation in multicriteria optimization problems. *Struct. Optim.* 14, 63–69.
- De Castro, R.J.S., Sato, H.H., (2014), Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 317–328.
- Deesli, W.D., Cheryan, C., (1992), Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Food Sci.* 57, 411–413.

Doyen, A., Udenigwe, C.C., Mitchell, P.L., Marette, A., Aluko, R.E., Bazinet, L., (2014), Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chem.* 145, 66–76.

Espinasse, B., 2003. Approche théorique et expérimentale de la filtration tangentielle de colloïdes: flux critique et colmatage. *Thèse*, Université Paul Sabatier-Toulouse III.

Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., Zhang, X., (2014), Marine Algae-Derived Bioactive Peptides for Human Nutrition and Health. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9211–9222.

Fane, A.G., Fell, C.J.D., (1987), A review of fouling and fouling control in ultrafiltration. Desalination, *Int. Symp. Synthetic Memb. Sci. and Techno.* 62, 117–136.

Fernández, A., Riera, F.A., (2012), Membrane Fractionation of a β -Lactoglobulin Tryptic Digest: Effect of the Hydrolysate Concentration. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 15738–15744.

Fernández, A., Suárez, A., Zhu, Y., FitzGerald, R.J., Riera, F.A., (2013), Membrane fractionation of a β -lactoglobulin tryptic digest: Effect of the pH. *J. Food Eng.* 114, 83–89.

Fikar, M., Kovács, Z., Czermak, P., (2010), Dynamic optimization of batch diafiltration processes. *J. Membr. Sci.* 355, 168–174.

Firdaous, L., Dhulster, P., Amiot, J., Gaudreau, A., Lecouturier, D., Kapel, R., Lutin, F., Vézina, L.-P., Bazinet, L., (2009), Concentration and selective separation of bioactive peptides from an alfalfa white protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 329, 60–67.

Froidevaux, R., Krier, F., Nedjar-Arroume, N., Vercaigne-Marko, D., Kosciarz, E., Ruckebusch, C., Dhulster, P., Guillochon, D., (2001), Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *Febs Lett.* 491, 159–163.

Girgih, A.T., He, R., Hasan, F.M., Udenigwe, C.C., Gill, T.A., Aluko, R.E., (2015), Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chem.* 173, 652–659.

- H**ashmi, S.I., Satwadhar, P.N., Khotpal, R.R., Deshpande, H.W., Syed, K.A., Vibhute, B.P., (2010), Rapeseed meal nutraceuticals. *J. Oilseed Brassica* 1, 43–54.
- He, R., Alashi, A., Malomo, S.A., Girgih, A.T., Chao, D., Ju, X., Aluko, R.E., (2013a), Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chem.* 141, 153–159.
- He, R., Girgih, A.T., Malomo, S.A., Ju, X., Aluko, R.E., (2013b), Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *J. Funct. Foods* 5, 219–227.
- Hedhili, K., Dimitrov, K., Vauchel, P., Sila, A., Chataigné, G., Dhulster, P., Nedjar, N., (2015), Valorization of cruor slaughterhouse by-product by enzymatic hydrolysis for the production of antibacterial peptides: focus on α 1–32 family peptides mechanism and kinetics modeling. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38, 1867–1877.
- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M.J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., Recio, I., (2014), Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *Int. Dairy J.*, 38, 82–100.
- Ho, C.-C., Zydney, A.L., (2000), A Combined Pore Blockage and Cake Filtration Model for Protein Fouling during Microfiltration. *J. Colloid Interface Sci.* 232, 389–399.
- Holder, A., Birke, A., Eisele, T., Klaiber, I., Fischer, L., Hinrichs, J., (2013), Selective isolation of angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides from micellar casein and β -casein hydrolysates via ultrafiltration. *Int. Dairy J.* 31, 34–40.
- Hua, X., Zhao, H., Yang, R., Zhang, W., Zhao, W., (2010), Coupled model of extended Nernst–Planck equation and film theory in nanofiltration for xylo-oligosaccharide syrup. *J. Food Eng.* 100, 302–309.
- I**rvine, G.B., (1997), Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. *Anal. Chim. Acta* 352, 387–397.
- J**iménez-Ruiz, E.I., Calderón de la Barca, A.M., Sotelo-Mundo, R.R., Arteaga-Mackinney, G.E., Valenzuela-Melendez, M., Peña-Ramos, E.A., (2013), Partial Characterization of Ultrafiltered

Soy Protein Hydrolysates with Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities. *J. Food Sci.* 78, C1152–C1158.

Jelemenský, M., Sharma, A., Paulen, R., Fikar, M., (2016), Time-optimal control of diafiltration processes in the presence of membrane fouling. *Comput. Chem. Eng.* 91, 343–351.

Johns, P.W., Jacobs, W.A., Phillips, R.R., McKenna, R.J., O’Kane, K.A., McEwen, J.W., (2011), Characterisation of peptide molecular mass distribution in commercial hydrolysates and hydrolysate-based nutritional products. *Food Chem.* 125, 1041–1050.

Joye, I.J., McClements, D.J., (2014), Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Gluten Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2623–2630.

Kanani, D.M., Ghosh, R., (2007), A constant flux based mathematical model for predicting permeate flux decline in constant pressure protein ultrafiltration. *J. Membr. Sci.* 290, 207–215.

Kapel, R., Chabeau, A., Lesage, J., Riviere, G., Ravallec-Ple, R., Lecouturier, D., Wartelle, M., Guillochon, D., Dhulster, P., (2006a), 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.

Kapel, R., Froidevaux, R., Nedjar-Arroume, N., Fertin-Bazus, A., Dhulster, P., Guillochon, D., (2003), Continuous production of a peptidic fraction containing the intermediate opioid peptide LVV-haemorphin-7 (LVVh-7) by peptic hydrolysis of bovine haemoglobin in a continuous membrane reactor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 317–324.

Kapel, R., Klingenberg, F., Framboisier, X., Dhulster, P., Marc, I., (2011a), An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide. *J. Membr. Sci.* 383, 26–34.

Kapel, R., Klingenberg, F., Framboisier, X., Dhulster, P., Marc, I., (2011b), An original use of size exclusion-HPLC for predicting the performances of batch ultrafiltration implemented to enrich a complex protein hydrolysate in a targeted bioactive peptide. *J. Membr. Sci.* 383, 26–34.

- Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., Dhulster, P., (2006), Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochem.* 41, 1961–1966.
- Kašička, V., (2012), Recent developments in CE and CEC of peptides (2009–2011). *Electrophoresis* 33, 48–73.
- Kim, J.M., Whang, J.H., Suh, H.J., (2004), Enhancement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity and improvement of the emulsifying and foaming properties of corn gluten hydrolysate using ultrafiltration membranes. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 133–138.
- Kim, S.-K., Song, O., (2009), A MAUT approach for selecting a dismantling scenario for the thermal column in KRR-1. *Ann. Nucl. Energy* 36, 145–150.
- Kitts, D.D., Weiler, K., (2003), Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* 9, 1309–1323.
- Kong, X., Zhou, H., Hua, Y., Qian, H., (2008), Preparation of wheat gluten hydrolysates with high opioid activity. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 511–517.
- Korhonen, H., (2009), Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods* 1, 177–187.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., (2006), Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, 945–960.
- Kovacs, Z., Discacciati, M., Samhabre, W., (2009), Modelling of batch and semi-batch membrane filtration processes. *J. Membr. Sci.* 327, 164–173.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., (2000), Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 43–81.
- Kuipers, B.J.H., Gruppen, H., (2007), Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5445–5451.

- L**acou, L., Léonil, J., Gagnaire, V., (2016), Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products. *Food Hydrocoll.* 57, 187–199.
- Lapointe, J.-F., Gauthier, S.F., Pouliot, Y., Bouchard, C., (2005), Fouling of a nanofiltration membrane by a β -lactoglobulin tryptic hydrolysate: impact on the membrane sieving and electrostatic properties. *J. Membr. Sci.* 253, 89–102.
- Li, P., Jia, J., Fang, M., Zhang, L., Guo, M., Xie, J., Xia, Y., Zhou, L., Wei, D., (2014), In vitro and in vivo ACE inhibitory of pistachio hydrolysates and in silico mechanism of identified peptide binding with ACE. *Process Biochem.* 49, 898–904.
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldívar, S.O., (2014), Bioactive Peptides and Hydrolysates from Pulses and Their Potential Use as Functional Ingredients. *J. Food Sci.* 79, R273–R283.
- M**anninen, A.H., (2009), Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutr. Metab.* 6, 38–43.
- Marczak, E.D., Usui, H., Fujita, H., Yang, Y., Yokoo, M., Lipkowski, A.W., Yoshikawa, M., (2003), New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 24, 791–798.
- Marshall, A.D., Munro, P.A., Trägårdh, G., (1993), The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review. *Desalination* 91, 65–108.
- Mavrotas, G., (2009), Effective implementation of the epsilon-constraint method in multi-objective mathematical programming problems. *Appl. Math. Comput.* 455–465.
- McCarthy, A., O'Collaghan, Y., O'Brien, N., (2013), Protein hydrolysates from agricultural crops - Bioactivity and potential for functional food development. *Agriculture* 112–130.
- Mekonnen, T.H., Mussone, P.G., Choi, P., Bressler, D.C., (2014), Adhesives from Waste Protein Biomass for Oriented Strand Board Composites: Development and Performance: Adhesives from Waste Protein Biomass for Oriented Strand Board Composites. *Macromol. Mater. Eng.* 299, 1003–1012.

Metsämuuronen, S., Nyström, M., (2009), Enrichment of α -lactalbumin from diluted whey with polymeric ultrafiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 337, 248–256.

Metsämuuronen, S., Nyström, M., (2005), Critical flux in cross-flow ultrafiltration of protein solutions. *Desalination* 175, 37–47.

Miclo, L., Perrin, E., Driou, A., (2001), Characterization of a-casozepine, a tryptic peptide from bovine aS1-casein with benzodiazepine-like activity. *FASEB J.*

Mondal, S., Mukherjee, R., Chatterjee, S., De, S., (2014), Adsorption-concentration polarization model for ultrafiltration in mixed matrix membrane. *AIChE J.* 60, 2354–2364.

Muller, A., Daufin, G., Chaufer, B., (1999), Ultrafiltration modes of operation for the separation of α -lactalbumin from acid casein whey. *J. Membr. Sci.* 153, 9–21.

Nakamura, T., Sado, H., Syukunobe, Y., (1992), Antigenicity of whey protein hydrolysates fractionated with ultrafiltration membrane. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 38, 113–116.

Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Miloudi, K., Daoud, R., Krier, F., Kouach, M., Briand, G., Guillochon, D., (2006), Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides* 27, 2082–2089.

Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., Berdutina, A.V., (2000), Properties and uses of protein hydrolysates (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 36, 452–459.

Ngo, D.-H., Vo, T.-S., Ngo, D.-N., Wijesekara, I., Kim, S.-K., (2012), Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 378–383.

Nioi, C., (2013), Extraction et protéolyse de napines de tourteau de colza : influence de l'état structural de la protéine sur la cinétique de protéolyse, la composition et les fonctionnalités des hydrolysats. *Thèse*, Université de Lorraine, Nancy.

Oueslati, N., Leblanc, P., Bodin, A., Harscoat-Schiavo, C., Rondags, E., Meunier, S., Marc, I., Kapel, R., (2015), A simple methodology for predicting the performances of hyaluronic acid purification by diafiltration. *J. Membr. Sci.* 490, 152–159.

Onuh, J.O., Girgih, A.T., Aluko, R.E., Aliani, M., (2014), In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chem.* 150, 366–373.

Paulen, R., Fikar, M., Foley, G., Kovács, Z., Czermak, P., (2012), Optimal feeding strategy of diafiltration buffer in batch membrane processes. *J. Membr. Sci.* 411–412, 160–172.

Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P., (2001), Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1526, 131–140.

Perea, A., Ulgalde, U., (1996), Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 29–34.

Persson, J., Wennerholm, M., O'Halloran, S., (2008), Handbook for Kjeldhal digestion, *FOSS. ed.* Danmark.

Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guérard, F., Chabeaud, A., LeGal, Y., Alvarez, O.M., Bergé, J.-P., Piot, J.-M., Batista, I., Pires, C., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I., Bourseau, P., (2010), Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *J. Sci. Food Agric.* 90, 1819–1826.

Piot, J.-M., Zhao, Q., Guillochon, D., Ricart, G., Thomas, D., (1992), Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 101–110.

Popineau, Y., Huchet, B., Larré, C., Bérot, S., (2002), Foaming and Emulsifying Properties of Fractions of Gluten Peptides Obtained by Limited Enzymatic Hydrolysis and Ultrafiltration. *J. Cereal Sci.* 35, 327–335.

Pouliot, Y., Wijers, M.C., Gauthier, S.F., Nadeau, L., (1999), Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *J. Membr. Sci.* 158, 105–114.

- Power, O., Fernández, A., Norris, R., Riera, F.A., FitzGerald, R.J., (2014), Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *J. Funct. Foods* 9, 38–47.
- 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.
- Prevot-D'Alvise, N., Lesueur-Lambert, C., Fertin-Bazus, A., Fertin, B., Dhulster, P., Guillochon, D., (2004), Continuous enzymatic solubilization of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 34, 380–391.
- Przybylski, R., Firdaous, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., Nedjar, N., (2016), Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chem.* 211, 306–313.

Rai, P., Rai, C., Majumdar, G.C., DasGupta, S., De, S., (2006), Resistance in series model for ultrafiltration of mosambi (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice in a stirred continuous mode. *J. Membr. Sci.* 283, 116–122.

Ranamukhaarachchi, S., Meissner, L., Moresoli, C., (2013), Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration. *J. Membr. Sci.* 429, 81–87.

Ruíz-Henestrosa, V.P., Sánchez, C.C., Pedroche, J.J., Millán, F., Rodríguez Patino, J.M., (2009), Improving the functional properties of soy glycinin by enzymatic treatment. Adsorption and foaming characteristics. *Food Hydrocoll.* 23, 377–386.

Sáez-Plaza, P., Michałowski, T., Navas, M.J., Asuero, A.G., Wybraniec, S., (2013), An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 43, 178–223.

Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M.-P., Amar, R.B., (2014), Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Res. Int.*, 65, Part C, 453–461.

- Saidi, S., Deratani, A., Ben Amar, R., Belleville, M.-P., (2013), Fractionation of a tuna dark muscle hydrolysate by a two-step membrane process. *Sep. Purif. Technol.* 108, 28–36.
- Sampath Kumar, N.S., Nazeer, R.A., Jaiganesh, R., (2012), Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids* 42, 1641–1649.
- Sarmadi, B.H., Ismail, A., (2010) Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31, 1949–1956.
- Saxena, A., Tripathi, B.P., Kumar, M., Shahi, V.K., (2009), Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Adv. Colloid Interface Sci.* 145, 1–22.
- Schmitz Jr, J.F., (2006), Comparison of soy-flour hydrolysates for wood adhesive systems. *Master Thesis*, Iowa State University.
- Schweizer, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Fournier, F., Harscoat-Schiavo, C., Vanderesse, R., Marc, I., (2007), Prediction of short peptides composition by RP-HPLC coupled to ESI mass spectrometry. *Food Chem.* 105, 1606–1613.
- Silva, S.V., Malcata, F.X., (2005), Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* 15, 1–15.
- Silvestre, M.P.C., (1997), Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.* 60, 263–271.
- Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., Kaul, P., (2007), Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem.* 101, 1484–1491.
- Srinivasan, B., Palanki, S., Bonvin, D., (2003), Dynamic optimization of batch processes I. Characterization of the nominal solution. *Comput. Chem. Eng.* 27, 1–26.
- Susanto, H., Ulbricht, M., (2005), Influence of ultrafiltration membrane characteristics on adsorptive fouling with dextrans. *J. Membr. Sci.* 266, 132–142.
- Suwal, S., Doyen, A., Bazinet, L., (2015), Characterization of protein, peptide and amino acid fouling on ion-exchange and filtration membranes: Review of current and recently developed methods. *J. Membr. Sci.* 496, 267–283.

Tomatsu, M., Shimakage, A., Shinbo, M., Yamada, S., Takahashi, S., (2013), Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from soya milk. *Food Chem.* 136, 612–616.

Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Li, H., Cui, W., Xue, H., Zhao, L., Sun, Y., Lu, J., Lv, J., (2014), Pilot-scale membrane fractionation of ACE inhibitory and antioxidative peptides from ultrasound pretreated milk protein concentrate hydrolysates. *J. Funct. Foods* 7, 350–361.

Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D.B.A., Voragen, A.G.J., (2002), Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and -stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2938–2946.

Vandanjon, L., Grignon, M., Courois, E., Bourseau, P., Jaouen, P., (2009), Fractionating white fish fillet hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration. *J. Food Eng.* 95, 36–44.

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., Millan, F., (1999), Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 819–823.

Wang, J., Su, Y., Jia, F., Jin, H., (2013), Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chem. Cent. J.* 7, 62–70.

Wang, J., Zhao, M., Yang, X., Jiang, Y., (2006), Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *J. Cereal Sci.* 44, 93–100.

Wang, X.-L., Zhang, C., Ouyang, P., (2002), The possibility of separating saccharides from a NaCl solution by using nanofiltration in diafiltration mode. *J. Membr. Sci.* 204, 271–281.

White, B.L., Sanders, T.H., Davis, J.P., (2014), Potential ACE-inhibitory activity and nanoLC-MS/MS sequencing of peptides derived from aflatoxin contaminated peanut meal. *Food Sci. Technol.* 56, 537–542.

Wu, S., Qi, W., Li, T., Lu, D., Su, R., He, Z., (2013), Simultaneous production of multi-functional peptides by pancreatic hydrolysis of bovine casein in an enzymatic membrane reactor via combinational chromatography. *Food Chem.* 141, 2944–2951.

- Y**ang, I., Kuo, M., Myers, D., Pu, A., (2006), Comparison of protein-based adhesive resins for wood composites. *J. Wood Sci.* 52, 503–508.
- Yeh, H.M., Chen, H.Y., Chen, K.T., (2000), Membrane ultrafiltration in a tubular module with a steel rod inserted concentrically for improved performance. *J. Membr. Sci.* 168, 121–133.
- Yoshida, T., (1998), Calculation of peptide retention coefficients in normal-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 808, 105–112.
- Yoshie-Stark, Y., Wada, Y., Schott, M., Wäsche, A., (2006), Functional and bioactive properties of rapeseed protein concentrates and sensory analysis of food application with rapeseed protein concentrates. *Food Sci. Technol.* 39, 503–512.
- Yu, G.-C., Li, J.-T., He, H., Huang, W.-H., Zhang, W.-J., (2013), Ultrafiltration preparation of potent bioactive corn peptide as alcohol metabolism stimulator in vivo and study on its mechanism of action. *J. Food Biochem.* 37, 161–167
- Z**hao, J., Huang, G., Jiang, J., (2013), Purification and Characterization of a New DPPH Radical Scavenging Peptide from Shrimp Processing By-products Hydrolysate. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 22, 281–289.
- Zhao, W., Xu, G., Yang, R., Katiyo, W., (2013), Preparation of casein phosphopeptides using a novel continuous process of combining an enzymatic membrane reactor with anion-exchange chromatography. *J. Food Eng.* 117, 105–112.
- Zhao, Y.-J., Wu, K., Wang, Z., Zhao, L., Li, S., (2000), Fouling and cleaning of membrane - a literature review. *J. Environ. Sci.* 12, 241–251.
- Zhu, Z., Qiu, N., Yi, J., (2010), Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel protein hydrolysate. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 13–19.

Stratégie de modélisation et d'optimisation des performances de l'ultrafiltration pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques

Les hydrolysats protéiques, obtenus par protéolyse enzymatique, sont des mélanges complexes pouvant être composés de plusieurs centaines de peptides. Les hydrolysats sont attractifs pour des secteurs industriels variés. Leurs propriétés nutritives et texturantes sont intéressantes pour l'industrie alimentaire. La présence potentielle de peptides bioactifs ouvre aussi des possibilités d'application en sécurité alimentaire ou dans le domaine des nutraceutiques. Les propriétés des hydrolysats sont souvent liées à des fractions ou des peptides particuliers et la mise en œuvre de procédés de fractionnement comme l'ultrafiltration est souvent envisagée pour obtenir des mélanges aux propriétés améliorées. L'ultrafiltration peut être implémentée dans différents modes : la concentration discontinue (« batch », UF) ou la diafiltration à volume constant (DF). Cependant, le manque d'outils de prédiction, lié à la complexité des hydrolysats, constitue un verrou majeur dans la mesure où cela ne permet pas un choix de mise en œuvre rationnel.

L'objectif de ces travaux de thèse a été de proposer et de valider une stratégie de prédiction et d'optimisation des performances de l'ultrafiltration pour le fractionnement d'hydrolysats protéiques. Pour cela, un hydrolysat de caséines industriel, le Lactium[®], a été utilisé comme mélange de référence et fractionné sur une membrane de 3 kDa en cellulose régénérée.

Dans une première partie, une méthode de quantification des hydrolysats par chromatographie d'exclusion stérique (CES) a été validée. La détermination de la concentration totale de fractions d'ultrafiltration est en effet essentielle pour la caractérisation du fractionnement et la CES est déjà largement utilisée pour caractériser la distribution de masses molaires des mélanges peptidiques.

Dans un deuxième temps, la sélectivité et les performances de l'ultrafiltration en termes de rendement et d'enrichissement dans les deux modes opératoires ont été comparées. Il a été mis en évidence que la DF permet d'atteindre des rendements supérieurs en petits peptides dans le perméat, pour des enrichissements similaires. Il a également été montré que la rétention des peptides est constante en UF et DF. Par ailleurs, la modification des conditions opératoires (concentration initiale, pression transmembranaire ou vitesse tangentielle) influe de façon marginale sur la sélectivité du procédé.

Dans une troisième partie, ces travaux décrivent une stratégie pour prédire (i) les performances de séparation (concentration globale, distribution de masses molaires, rendement et enrichissement) dans le perméat et le rétentat et (ii) l'évolution du flux de perméat au cours du procédé. Le premier point de cette méthodologie consiste à appliquer les bilans matière sur la distribution de masses molaires de l'hydrolysat (évaluée par CES), ne nécessitant que l'aminogramme du mélange et un étalonnage de la membrane pour évaluer la rétention des peptides selon leur masse molaire. Les rendements et enrichissements dans les compartiments de l'ultrafiltration du Lactium[®] sont prédits avec une erreur relative inférieure à 30 %, en UF ou en DF. La méthodologie a également été validée sur des hydrolysats d'hémoglobine bovine contenant trois peptides bioactifs sur une membrane de 3 kDa et 1 kDa avec le même niveau de précision. Ensuite, l'évolution du flux de perméat a été modélisée à partir d'un modèle de résistances en série. La résistance totale a été représentée comme étant la somme de la résistance membranaire intrinsèque et de la résistance liée à la couche de polarisation établie à la surface de la membrane. Cette dernière est calculée en fonction des paramètres opératoires influençant le flux de perméat c'est-à-dire la pression transmembranaire, la vitesse de recirculation du mélange et la concentration globale en peptide dans le rétentat.

Enfin, ce modèle global de prédiction de l'ultrafiltration a été utilisé afin de déterminer le meilleur enchaînement des étapes d'UF et de DF. La démarche d'optimisation multicritère a consisté à minimiser le volume d'eau utilisé et la durée du procédé en maximisant l'enrichissement de la fraction ou du peptide cible, sous la contrainte d'un rendement minimal à atteindre dans le compartiment considéré. Pour chaque fraction du Lactium[®] étudiée, une étape de concentration suivie d'une diafiltration est la configuration optimale.

Mots clés : hydrolysats protéiques, ultrafiltration, diafiltration, sélectivité, prédiction de performances, optimisation dynamique

Modelling and optimization strategy of ultrafiltration performances for the fractionation of protein hydrolysates

Protein hydrolysates are complex mixtures commonly composed of more than a hundred peptides, obtained by enzymatic proteolysis of food proteins. These products are attracting interest in many industrial areas. Their good nutritive and texturing properties are attractive for food industry. The potential presence of bioactive peptides opens up new fields of application, such as nutraceuticals, health, cosmetology, food safety and culture media. Properties of hydrolysates are related to particular fraction(s) or peptide(s) and the implementation of fractionation process like ultrafiltration are often used for refining hydrolysates and improving their properties. Two implementation modes of ultrafiltration can be used: batch concentration (UF) or diafiltration (constant volume, DF). One of the major scientific lock of this process is the lack of tools for predicting and optimizing separation performance for such complex mixtures. The aim of this work was to develop a strategy to predict and to optimize ultrafiltration performances for protein hydrolysates fractionation. An industrial casein hydrolysates, the Lactium[®], has been used as reference mixture and has been fractionated on a regenerated cellulose 3 kDa membrane.

First, a method for quantifying hydrolysates using size-exclusion chromatography (SEC) was validated. The determination of total concentration in ultrafiltration fractions is required for the characterization of fractionation and SEC is already used to characterize molar mass distribution of peptide mixtures.

Secondly, the selectivity and ultrafiltration performances in terms of yield and enrichment in both implementation modes were compared. It has been highlighted that diafiltration leads to higher yields of small peptides in permeate, for similar enrichment. It has also been shown the peptide retention is constant during concentration or diafiltration. Moreover, the change of UF operating conditions (initial concentration, transmembrane pressure or feed velocity) insignificantly impacts the process selectivity.

In a third part, this work describes an original strategy for predicting (i) the separation performances (total peptide concentration, molar mass distribution, targeted peptides yield and enrichment) in permeate and retentate and (ii) the evolution of the permeate flow rate throughout ultrafiltration. The first part of the methodology consists in applying mass balance equations to the molar mass distribution of peptides (assessed by SEC) and only requires the hydrolysate aminogram as starting data and a proper calibration of UF membrane in order to evaluate peptide retentions from their molar mass. Separation performances were accurately predicted with relative errors ranging from 2 % to 30 % in both implementation modes. The methodology was also validated with bovine hemoglobin hydrolysate containing three bioactive peptides on a 3 kDa and 1 kDa membrane with the same precision. Then, the prediction of the permeate flow rate is based on the resistance-in-series model. The global hydraulic resistance is the sum of the intrinsic membrane resistance and the polarization layer resistance. The latter depends on operating conditions: transmembrane pressure, initial hydrolysate concentration and feed velocity.

In the last part, this methodology was used to define the best succession of batch concentration and diafiltration steps. The multi-objective optimization approach consists in minimizing the water consumption and the process duration by maximizing the enrichment in targeted fractions or peptides. For each Lactium[®] fraction that has been studied, the optimal implementation was a step of concentration following by a step of diafiltration at constant volume.

Key words: protein hydrolysates, ultrafiltration, diafiltration, selectivity, performances prediction, dynamic optimization