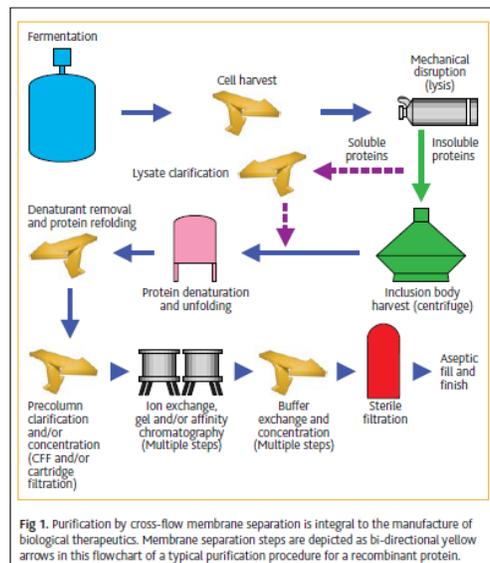


GCH-2100: Éléments de bioprocédés

Séparation et purification des produits d'origine biologique

B. Gaillet, A. Garnier, Génie chimique

Diagramme général



Life Science News, 15, 2003,
Amersham Biosciences

Plan

- Introduction
- Séparation des produits insolubles
- Rupture cellulaire
- Séparation des produits solubles
- Étapes finales de la purification
- Conclusion

Introduction

- L'efficacité de la récupération et de la purification des produits de fermentation est essentielle pour la viabilité d'un procédé commercial
- La difficulté de cette étape du procédé dépend de la nature du produit
- Ce produit peut-être:
 - La biomasse
 - Un composé extracellulaire
 - Un composé intracellulaire



- En raison de la nature chimique du milieu de fermentation qui peut être complexe, les faibles concentrations en produit d'intérêt et l'extrême degré de pureté exigé pour certains produits (biopharmaceutiques), les étapes de récupération et la purification du produit d'intérêt ont un coût supérieur à l'étape de production

Introduction

- Les coûts associés à la récupération et la purification peuvent représenter 50 % des coûts de production, particulièrement pour les produits intracellulaires
- Il existe une excellente corrélation entre le prix d'un produit et l'inverse de sa concentration à la sortie de la fermentation

- Exemple: l'acide citrique est à 100 g/L lorsqu'il entre dans le procédé de traitement en aval → prix de vente: 1 à 2 \$ US / kg
- Protéine thérapeutique: 0,00001 g/l → 100 000 000 \$ / kg



Introduction

- Opérations unitaires majeures utilisées dans la séparation et la purification des produits biologiques

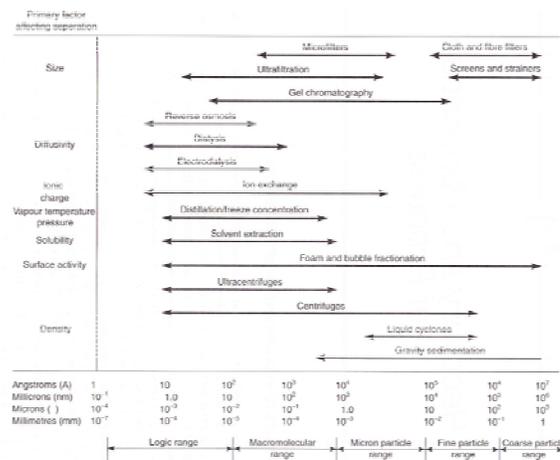
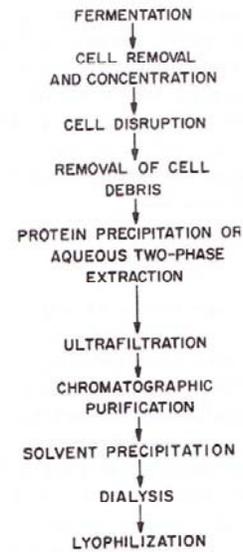


Figure 11.1. Ranges of applications of some standard unit operations. (With permission, from B. Atkinson and F. Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan, Inc., New York, 1983.)

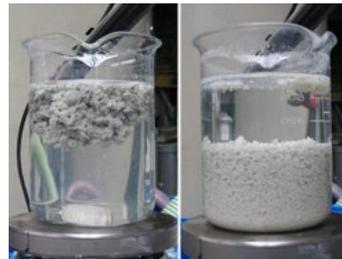
Introduction

- Principales étapes impliquées dans la séparation et la purification d'enzymes intracellulaires
- Généralisation
 - Séparation des produits insolubles des autres solides
 - Isolation primaire ou concentration du produit et extraction de la plupart de l'eau
 - Purification ou enlèvement des contaminants chimiques
 - Préparation du produit
- Il est important d'enlever l'eau au début du procédé
 - Pourquoi ?



Séparation des produits insolubles

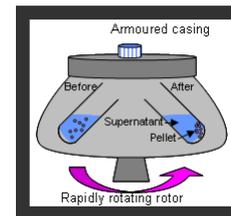
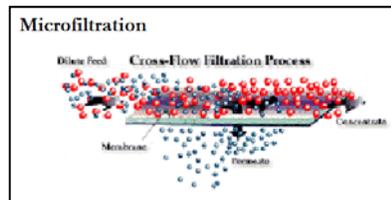
- **Introduction**
- La séparation des solides (biomasse, particules insolubles, macromolécules) du milieu de culture est la première étape dans la récupération du produit.
- Le milieu peut-être prétraité afin de faciliter cette étape:
 - Traitement à la chaleur
 - Ajustement du pH et de la force ionique
 - Addition de coagulants et de flocculants
- Si le produit est la biomasse, alors cette étape est la principale du procédé de récupération
- Si le produit est intracellulaire → Il faut d'abord récupérer les cellules



D'après <http://traitement-eau.ventsys.net>

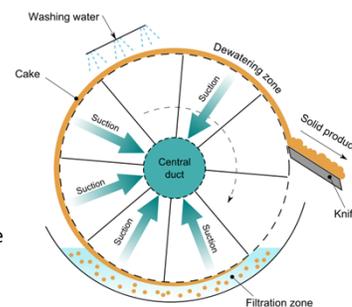
Séparation des produits insolubles

- **Introduction**
- Les principales méthodes utilisées pour séparer le matériel cellulaire (biomasse ou virus) sont:
 - La filtration : filtration rotative sous vide, micro-ultrafiltration
 - La centrifugation ou l'ultracentrifugation
 - La flottation, la coagulation et la floculation



Séparation des produits insolubles

- **La filtration**
 - Il s'agit de la méthode la moins coûteuse pour la séparation de grosses particules et de cellules du milieu de culture
 - Le milieu de culture passe au travers d'un filtre et le gâteau formé résulte du dépôt des solides à la surface du filtre



Système de filtration pour levures

- Le filtre rotatif à tambour sous vide est le filtre le plus répandu pour des problématiques de filtration continu
- Principe de fonctionnement:
 - «precoat» du tambour → ajout d'un agent coagulant → action du vide → formation du gâteau → lavage → récupération du gâteau

Séparation des produits insolubles

- La filtration: Un peu de théorie ...

- Le taux de filtration à une pression (vide) donnée est donnée par:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p A}{(r_m + r_c)\mu} \quad (1)$$

- Avec:

- V = volume du filtrat
- A = surface du filtre
- Δp = différence de pression à travers le filtre
- μ = viscosité du filtrat
- r_m = résistance de la membrane
- r_c = résistance du gâteau

Séparation des produits insolubles

- La filtration: Un peu de théorie ...

- La valeur de r_m est caractéristique du filtre.
- r_c augmente durant la filtration.
- La valeur de r_c est donnée par:

$$r_c = \alpha \frac{W}{A} = \alpha \frac{CV}{A} \quad (2)$$

- Avec W = la masse totale du gâteau sur le filtre, C = la concentration de matière filtrable par unité de volume du filtrat, α la résistance moyenne spécifique du gâteau
- La masse totale du gâteau est reliée au volume total du filtrat par la relation:

$$W = CV \quad (3)$$

- En substituant les équations 2 et 3 dans 1, avec A constant, on obtient:

$$\frac{d(V/A)}{dt} = \frac{\Delta p}{(r_m + \alpha \frac{CV}{A})\mu} \quad (4)$$

Séparation des produits insolubles

- La filtration: Un peu de théorie ...

L'intégration de 4 à partir de la condition initiale: @ $t=0, V=0$

$$V^2 + 2VV_0 = Kt \quad (5)$$

■ Avec:

$$V_0 = \frac{r_m}{\alpha C} A \quad \text{et} \quad K = \left(\frac{2A^2}{\alpha C \mu} \right) \Delta p$$

■ L'équation 5 peut être arrangée en :

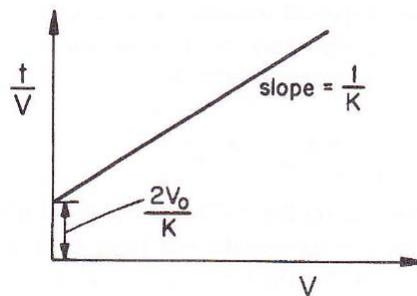
$$\frac{t}{V} = \frac{1}{K}(V + 2V_0)$$

■ Une représentation graphique de t/V en fonction de V permet de déterminer expérimentalement r_m et α

Séparation des produits insolubles

- La filtration: Un peu de théorie ...

■ Pente = $1/K$; ordonnée à l'origine = $2V_0/K$



Séparation des produits insolubles

- **La filtration: Un peu de théorie ...**
 - Généralement le gâteau est compressible et α varie avec Δp .
 - La concentration en adjuvant de filtration (1-5 %) a un effet significatif sur la résistance spécifique du gâteau.
 - Il forme un gâteau poreux

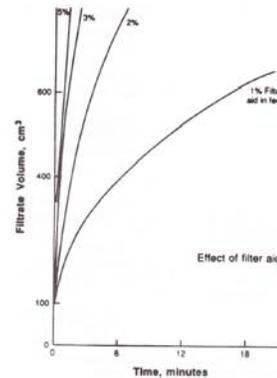


Figure 11.5. Effect of filter aid on the specific resistance to filtration of *Streptomyces griseus* broth (pH = 3.7 to 3.8). (With permission, from P. A. Beller, E. L. Cussler, and W-S. Hu, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York, 1988, p. 19.)

Séparation des produits insolubles

- **La filtration: Un peu de théorie ...**
 - Les conditions opératoires influent également sur l'efficacité de filtration:
 - La résistance spécifique du gâteau diminue lorsque le pH est diminué.
 - Une augmentation de la température améliore la filtration du milieu de fermentation de certains champignons (pénicilline)
 - La durée de la fermentation: une durée de fermentation de 180 à 200 h est utilisée lors de la production de pénicilline pour minimiser la résistance du gâteau et maximiser l'activité antibiotique

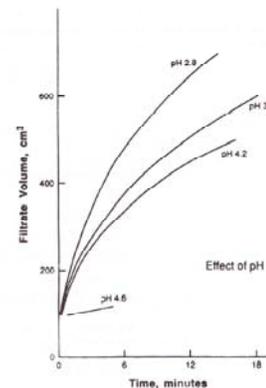
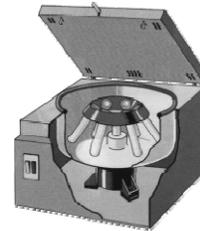


Figure 11.6. Effect of pH on the rate of filtration of *Streptomyces griseus* with 2% filter aid. (With permission, from P. A. Beller, E. L. Cussler, and W-S. Hu, *Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York, 1988, p. 18.)

Séparation des produits insolubles

- **La centrifugation - Définition**

- La centrifugation est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange en fonction de leur densité en les soumettant à une force centrifuge.
- Le mélange à séparer peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide.
- L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse



Séparation des produits insolubles

- **La centrifugation - Principe**

- Le champ d'accélération terrestre ($g = 9.8 \text{ m.s}^{-2}$) ne permet que la sédimentation de grosses particules (c'est ce qu'on appelle la décantation).
- Pour les plus petits éléments, la diffusion s'oppose à la sédimentation. Il faut donc faire appel à des accélérations importantes → on utilise des centrifugeuses ou des ultracentrifugeuses.
- La force centrifuge relative en g est fonction de la vitesse en tours/min du rotor et de la distance entre l'axe du rotor et le point considéré (ou rayon de rotation) selon la formule :

- Avec : r = distance en cm entre l'axe du rotor et le point considéré (rayon de rotation), n = vitesse de rotation en tours par minute

$$FCR = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot n^2$$

- **Exemple** : un rotor a un rayon de rotation de 10 cm. A quelle vitesse faudra-t-il programmer la centrifugeuse pour obtenir une accélération de 100 000 g ?

Séparation des produits insolubles

- Classes de centrifugeuses et leurs applications

	Classes de centrifugeuses		
	Low-speed	High-speed	Ultra-speed
Vitesse maximale (rpm x 1000)	10	28	100 - 150
FCR maximale (x 1000)	7	100	800 - 900
Applications			
Bactéries	oui	oui	(oui)
Cellules de plantes & animales	oui	oui	(oui)
Noyaux	oui	oui	(oui)
Précipités	quelquefois	souvent	(oui)
Fractions membranaires	quelquefois	quelquefois	oui
Ribosomes			Oui
Macromolécules			Oui
Virus		Souvent	Oui

Séparation des produits insolubles

- Classes de centrifugeuses et leurs applications



Low-High speed



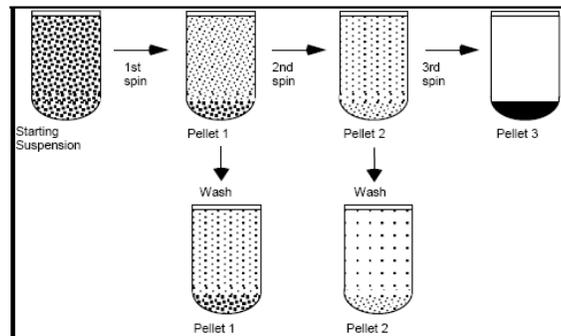
Ultracentrifuge

Séparation des produits insolubles

- **Les différents types de centrifugation – La centrifugation différentielle**
 - La séparation s'effectue selon la taille des particules
 - Cette méthode est utilisée pour
 - culoter des cellules, des bactéries
 - obtenir des préparations partiellement pures d'organites et de macromolécules
 - Pour l'étude des organites, les tissus ou les cellules doivent au préalable être rompus → Formation d'un homogénat
 - Durant la centrifugation, les grosses particules sédimentent plus vite que les petites
 - Un homogénat peut être centrifugé plusieurs fois en augmentant progressivement la FCR et le temps afin d'obtenir des culots de différents organites.
 - Préalable à des centrifugations plus élaborées

Séparation des produits insolubles

- **Les différents types de centrifugation – La centrifugation différentielle**
 - Pour l'élimination de contaminants

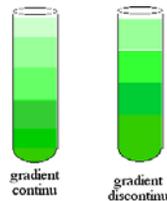


Séparation des produits insolubles

- **Les différents types de centrifugation – La centrifugation sur gradient de densité**
 - Quelle que soit l'accélération, si la particule a la même masse volumique que le solvant, elle ne se déplacera pas dans le tube d'ultracentrifugation.
 - Si le tube contient un gradient de densité, les particules s'arrêteront de migrer lorsqu'elles atteindront la zone de densité égale à leur propre densité.
 - C'est le principe de la centrifugation isopycnique (à l'équilibre de densité).
 - Si le milieu contenu dans le tube est constitué par des couches superposées de densités croissantes, on parle de gradient de densité discontinu.
 - Si la densité du milieu croît de façon continue, on a un gradient continu de densité.

Séparation des produits insolubles

- **Les différents types de centrifugation – La centrifugation sur gradient de densité**



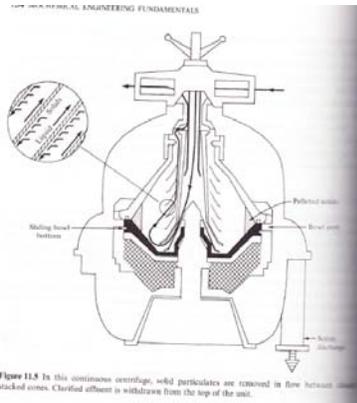
Préparation des gradients discontinus et continus pour les centrifugations



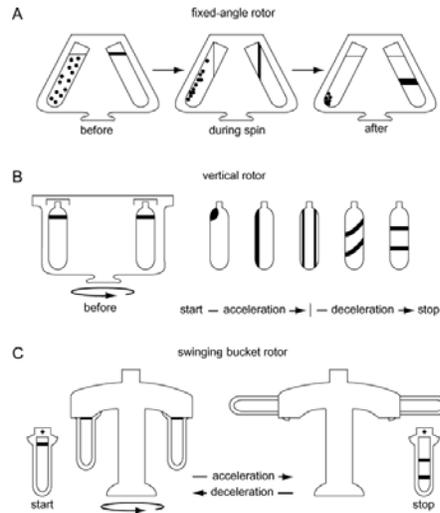
Remarque : Lorsqu'on n'a pas d'appareil pour faire des gradients continus on peut transformer les tubes de gradients discontinus en gradients continus en les plaçant dans une étuve chaude. La température et le temps pour faire le gradient doit être déterminés suivant les produits et de l'étuve utilisées.

Séparation des produits insolubles

- Les différents types de centrifugation – Les rotors



[Cf. animation](#)



Séparation des produits insolubles

- Les différents types de centrifugation – Quelques termes utiles (cf. Cole Parmer)
 - **Pellet (culot):** hard-packed concentration of particles in a tube or rotor after centrifugation.
 - **Supernatant (surnageant):** The clarified liquid above the pellet.
 - **Adapter:** A device used to fit smaller tubes or centrifugal devices in the rotor cavities.
 - **RPM:** Revolutions Per Minute (Speed).
 - R_{max} : Maximum radius from the axis of rotation in centimeters.
 - R_{min} : Minimum radius from the axis of rotation in centimeters.
 - **RCF:** Relative centrifugal Force. $RCF = 11.17 \times R_{max} (RPM/1000)^2$

Séparation des produits insolubles

- Les différents types de centrifugation – Quelques termes utiles (cf. Cole Parmer)
- **K-factor:** Pelleting efficiency of a rotor. Smaller the K-factor, better the pelleting efficiency.

$$K = \frac{2,53 \cdot 10^{11} \cdot \ln(R_{max}/R_{min})}{RPM^2}$$

- **S-value:** the sedimentation coefficient is a number that gives information about the molecular weight and shape of the particle. S-value is expressed in Svedberg units. The larger the S-value, the faster the particle separates
- **Pelleting time:** time taken to pellet a given particle. $T = K/S$ where T = pellet time in hours. K = K-factor of the rotor, and S = sedimentation coefficient.

Séparation des produits insolubles

- Les différents types de centrifugation – Quelques termes utiles (cf. Cole Parmer)
- **Rotor conversion formula:** If the time to pellet a sample in your "old" rotor is known, one could determine the time it would take for the same sample to pellet in a "new" rotor.

$$\frac{T_1}{K_1} = \frac{T_2}{K_2} \longrightarrow T_1 = T_2 \left(\frac{K_1}{K_2} \right)$$

Where:
 T1 = Time to pellet in the "new" rotor
 T2 = Time to pellet in the "old" rotor
 K1 = K-Factor of the "new" rotor
 K2 = K-Factor of the "old" rotor

Example of a rotor conversion:

Old Rotor (Beckman® JA-10) New Rotor (Sorvall® SLC-1500)

T2 = 20 min; K2 = 3610 T1 = (?) min; K1 = 1676

Old Pelleting Time = 20 min New Pelleting Time = 9.2 min

Séparation des produits insolubles

- **Coagulation et floculation**

- La coagulation et la floculation sont généralement employés pour former des agrégats avant la centrifugation, la décantation ou la filtration pour améliorer la performance de ces procédés.



- La coagulation est la formation de petits flocs à partir de colloïdes dispersés en utilisant des agents coagulants.

- La floculation est l'agglomération de ces petits flocs en plus grosses particules en utilisant des agents floculants qui sont généralement des poly électrolytes ou des sels. ([vidéo](#))

Séparation des produits insolubles

- **Coagulation et floculation**

- Les électrolytes simples utilisés en coagulation sont des acides, bases, sels et des ions multivalents. Ils sont peu onéreux mais moins efficaces que les poly électrolytes.
- Certaines particules solides comme le charbon activé, la silice, etc. peuvent également être employés.

TABLE 11.1 Flocculant Dosages

Agent	Flocculant dose (g (100 g dry cell wt) ⁻¹)				
	Glucose broth	Hydrocarbon broth	Resuspended cells in buffer	Penicillin broth	Dilute slurries
Polyelectrolytes					0.045-4.5
Anionic polyelectrolytes					
Polystyrene sulphate	0.2	0.1	0.06		
Polyacrylamide	Ineffective	Ineffective	Ineffective		
Cationic polyelectrolytes					
Polyethylene imine	10		7.0		
Calcium chloride				200	
Colloidal clay, bentonite	2.0	20.0	0.6		
Inorganic coagulants					0.045-4.5

With permission, from B. Atkinson and F. Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan, Inc., New York, 1983.

Séparation des produits insolubles

- **Avantages de la Coagulation/ floculation**
 - Très économique
 - Simple et efficace
 - Dimensions des installations réduites
 - Les rendements sont excellents sur les matières en suspension et bons sur les matières oxydables
 - Exploitation très facile
 - Mise en service et arrêt instantané
 - peu de mécanique et d'électricité

Rupture cellulaire

- **Introduction**
 - Si le produit désiré est intracellulaire, les cellules doivent être brisées.
 - La méthode de « brisure » dépend du type cellulaire et de la nature du produit intracellulaire d'intérêt.
 - Les méthodes de rupture cellulaire peuvent être classifiées en deux catégories:
 - Mécanique
 - Non mécanique



Rupture cellulaire

- **Les méthodes mécaniques en milieu liquide - sonicateur**

- Les vibreurs ultrasoniques sont utilisés pour briser les parois et membranes des bactéries et des cellules animales.
- La fréquence des ondes est de l'ordre de 20 kHz.
- Les bâtonnets sont détruits plus facilement que les cocci, et les bactéries Gram – plus facilement que les Gram +.
- Un générateur électronique est utilisé pour générer les ondes et un transducteur convertit ensuite ces dernières en oscillations mécaniques au moyen d'une sonde en titane immergée dans la suspension cellulaire.



Rupture cellulaire

- **Les méthodes mécaniques en milieu liquide - sonicateur**

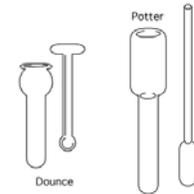
- Les composés intracellulaires (enzymes, métabolites, protéines) sont alors relâchés dans le milieu.
- Ce traitement aux ultrasons peut dénaturer les produits d'intérêt.
- La sonication s'accompagne souvent d'une dissipation importante de chaleur ce qui est un problème important notamment si le volume à traiter est important.
- Protection contre les ultrasons
- Cette méthode est plutôt utilisée en laboratoire



Rupture cellulaire

- **Les méthodes mécaniques en milieu liquide – Homogénéisateurs**

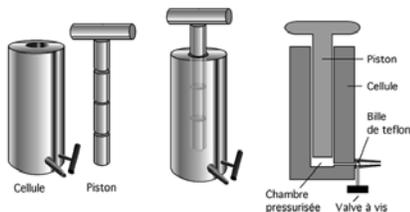
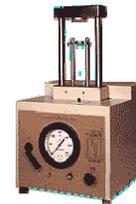
- L'homogénéisateur de type Dounce ressemble à une éprouvette (aux parois épaisses) dans laquelle s'enfonce un piston serré.
- Le passage des cellules dans l'espace extrêmement exigü entre le piston et la paroi interne du tube cause leur bris
- L'homogénéisateur de type Potter-Elvehjem ressemble à un Dounce motorisé; son piston a souvent une tête de téflon et tourne dans le cylindre contenant les cellules resuspendues.
- Couteaux coaxiaux rotatifs (ex: Polytron)



Rupture cellulaire

- **Les méthodes mécaniques en milieu liquide – French press**

- L'appareil vise à forcer les cellules à passer dans un espace plus petit qu'elles, ce qui déchire leur membrane.
- Il consiste en un cylindre creux en métal dans lequel s'enfonce un piston de métal nanti de plusieurs o-rings d'un caoutchouc très solide.
- À la base du cylindre, une petite valve est installée; celle-ci peut être obstruée par une petite bille en téflon.

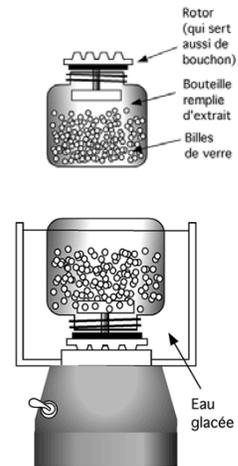


- La suspension de cellules est versée dans le cylindre. Le piston est installé, obstruant le trou, et une puissante vis sans fin commence à l'enfoncer dans le cylindre
- Comme il n'y a que peu d'air dans le cylindre et qu'un liquide est incompressible, l'enfoncement du piston fait très rapidement grimper la pression sur les parois du cylindre.
- Quand on ouvre légèrement la valve, la suspension de cellules est éjectée et les cellules sont déchiquetées.

Rupture cellulaire

- **Les méthodes mécaniques en milieu liquide – Les billes de verre**

- L'appareil utilisé pour cette technique ressemble à un *blender* à ceci près qu'il est beaucoup plus petit et ne contient pas de lames.
- Son contenant amovible est rempli de petites billes de verre sur lesquelles on verse la suspension de cellules. La suspension se répartit entre les billes. Il est important de remplir complètement le contenant et de ne pas y laisser d'air pour éviter de faire de la mousse et d'oxyder les protéines.
- Le tout est alors scellé et on lance la machine, qui fait tourbillonner les billes de verre dont l'action abrasive détruit les cellules.
- Séparer les billes du lysat est très facile parce que les billes coulent au fond dès que l'agitation cesse.
- On doit prendre soin de garder le tout au frais; Le mouvement des billes génère en effet beaucoup de chaleur.



Rupture cellulaire

- **Les méthodes mécaniques en milieu liquide – Les billes de verre**

- Le broyeur à bille Dyno Mill permet d'homogénéiser la taille de particules d'une solution. Elle peut servir à casser les cellules d'une préparation cellulaire.
- A cause de la taille de la tubulure et de la cellule de broyage, il faut passer au minimum 1L de culture. Il est d'ailleurs possible d'homogénéiser plusieurs litres très rapidement.



- Le Dyno Mill est disponible dans une version 275 L et peut traiter 2000 kg/h de suspension cellulaire ou 340 kg M.S./h de levure
- Principe de fonctionnement: La chambre est remplie de 80 % de billes. Après alimentation en suspension cellulaire et, à haute vitesse, l'impact du cisaillement et des millions de billes brisent les parois cellulaires

Rupture cellulaire

- Les méthodes mécaniques en milieu solide
 - Le broyeur à boulets peut être utilisé pour briser un culot cellulaire congelé.
 - La presse de Hughes
 - La presse X



Broyeur à boulets



Rupture cellulaire

- Les méthodes mécaniques
 - Toutes ces méthodes peuvent endommager le produit : La chaleur = dénaturation des protéines
 - Le relargage des protéases des compartiments cellulaires peut endommager également le produit.
 - Certaines techniques comme le broyeur à billes nécessite des temps de résidence élevés : Si 100 % de bris cellulaire est désiré, les composés fragiles libérés précocement lors du procédé peuvent être endommagés.
 - Lorsque le bris cellulaire est effectué, les produits libérés se trouve dans un environnement oxydant (en raison de la présence d'air) causant une rapide dénaturation et agrégation.
 - Les considérations liées à la qualité du produit doivent être prises en compte lors de la sélection de la méthode de rupture cellulaire.

Rupture cellulaire

- **Les méthodes non-mécaniques**
 - Le choc osmotique permet de briser certaines cellules fragiles avec un minimum de dommages. Les cellules sont incubées dans une solution hypo-osmotique.
 - Cherchant à rétablir l'équilibre osmotique, l'eau pénètre dans la cellule et finit par causer une rupture de la membrane plasmique par éclatement de la cellule.
 - Amélioration de la technique avec un peu de détergent (NP-40, LDAO, Triton X-100) et avec une action mécanique (quelques coups de piston dans un homogénéisateur de type Dounce).
 - Cette technique permet de récupérer des noyaux presque intacts une fois séparés des débris de la membrane plasmique.
 - Utilisation de cristaux de glace

Rupture cellulaire

- **Les méthodes non-mécaniques**
 - Avec les levures, les plantes, les bactéries, il faut tenir compte de la paroi cellulaire qui protège la membrane plasmique.
 - Si on n'opte pas pour une méthode mécanique et violente d'extraction, il faudra d'abord détruire cette paroi avant de s'en prendre au reste de la cellule.
 - Pour les bactéries on peut utiliser différents enzymes comme
 - le lysozyme (du blanc d'oeuf de poule, par exemple)
 - la lyticase de *Staphylococcus aureus* .
 - Pour les cellules végétales, on utilise un mélange de deux enzymes, la cellulase et la pectinase en raison de la nature biochimique de la paroi dite pecto-cellulosique.

Séparation des produits solubles

- **Introduction**
 - La plupart des bioproduits comme les antibiotiques, les acides organiques, les enzymes extracellulaires, les acides aminés, etc. sont solubles et extracellulaires.
 - Différentes méthodes ont été développées pour récupérer ces produits solubles:
 - Précipitation
 - Extraction
 - Ultrafiltration
 - Adsorption

Séparation des produits solubles

- **La précipitation**
 - Il s'agit généralement de la première étape dans la purification d'une protéine intracellulaire ou extracellulaire.
 - Les protéines dans un milieu de culture peuvent être séparés des autres composants par précipitation au moyen de 2 méthodes:
 - Addition de sels: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sulfate de dextran, sulfate de streptomycine
 - Réduction de la solubilité à basse température par l'ajout de solvants organiques

Séparation des produits solubles

- **La précipitation - « salting-out »**

- Le « salage » de protéines est obtenu en augmentant la force ionique du milieu de culture par l'ajout de sels.
- Les ions ajoutés interagissent avec l'eau plus fortement que cette dernière avec les protéines → précipitation
- La solubilité de protéines en solution est donnée par:

$$\log \frac{S}{S_0} = -K'_s(I)$$

- Ou S est la solubilité de la protéine en solution (g/L), S_0 = solubilité de la protéine lorsque $I = 0$, I étant la force ionique. K'_s est la constante de salage qui est une fonction de la température et du pH.

Séparation des produits solubles

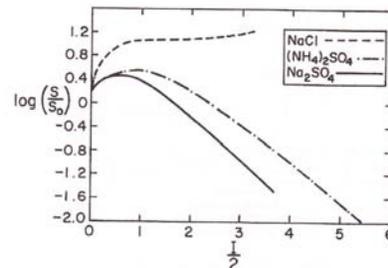
- **La précipitation - « salting-out »**

- La force ionique est définie par:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$$

- Avec C_i = concentration molaire de l'espèce ionique i (mol/L); Z_i = charge (valence)

- À haute force ionique, la solubilité de la protéine diminue avec la force ionique



Effet de sels inorganiques sur la solubilité de l'hémoglobine

Séparation des produits solubles

- **La précipitation – « salting out » - étude empirique**

- Le sel le plus utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines est le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$.
- Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution (au contraire du NaCl, dont la solubilisation exothermique aide à faire fondre la glace dans les rues l'hiver)
- Il ne dénature pas les protéines et ne coûte pas cher.

		% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:		106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	710	5	
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	675	10	
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	639	15	
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	602	20	
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	567	25	
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	533	30	
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	498	35	
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	463	40	
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	426	45	
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	390	50	
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	355	55	
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	321	60	
									0	31	63	97	132	168	205	244	286	65	
										0	32	65	99	134	171	209	251	70	
											0	32	66	101	137	174	216	75	
												0	33	67	103	139	177	80	
													0	34	68	105	141	85	
														0	34	70	143	90	
															0	35	145	95	
																0	147	100	

- Le tableau donne les quantités de $(NH_4)_2SO_4$ requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C.
- Inconvénient: Les culots de protéines peuvent alors être resuspendus. Ils contiendront cependant encore une grande quantité de sulfate dont il faudra se débarrasser.

Séparation des produits solubles

- **La précipitation – étude empirique**

- La protéine se trouvera dans une des fractions C20, C40, C60, C80 ou C100.
- Si on sait à l'avance comment notre protéine réagit au *salting-out*, on peut viser avec plus de précision
- Si elle précipite à environ 35% sulfate (AcM)
 - Première coupure avec 30% sulfate
 - Deuxième à 40% sulfate
 - Dernière (juste au cas) à une teneur en sel plus élevée.
 - On sait que la protéine se trouve dans la fraction C40, et qu'elle est débarrassée de tout ce qui précipite en-deçà de 30% sulfate et au-delà de 40%.

(1) Ajustement à 20% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C20)
(2) Ajustement du surnageant à 40% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C40)
(3) Ajustement du surnageant à 60% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C60)
(4) Ajustement du surnageant à 80% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C80)
(5) Ajustement du surnageant à 100% sulfate	Centrifugation et récupération du culot (fraction C100)

Séparation des produits solubles

- **La précipitation – Solvant organique**

- L'addition de solvants organiques à basse température ($T < -5\text{ °C}$) entraîne la précipitation des protéines en réduisant la constante diélectrique de la solution.

- La solubilité comme fonction de la constante diélectrique est donnée par:

$$\log\left(\frac{S}{S_0}\right) = -K'/D^2$$

- Avec D = constante diélectrique de la solution

- Une réduction de D engendre une forte attraction entre les molécules de protéines et facilite la précipitation.
- L'addition de solvants réduit également les interactions protéines/eau → diminution de la solubilité de la protéine
- Les solvants peuvent causer une dénaturation de la protéine

Séparation des produits solubles

- **Extraction liquide - liquide**

- C'est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur.
- Elle consiste à extraire un ou plusieurs constituants d'une solution par dissolution au contact d'un solvant dans lesquels les corps sont solubles.
- En choisissant un solvant adéquat, on peut sélectivement extraire les produits désirés hors du milieu de culture pour les « transférer » dans le solvant.
- Lorsque l'extraction est complétée, le solvant riche en produit est appelé l'extrait et le liquide résiduel est appelé le raffinat.

Séparation des produits solubles

- **Extraction liquide - liquide**

- La distribution, ou le partage d'un soluté entre les deux phases à l'équilibre est donnée par le coefficient de partage (ou de distribution, ou de répartition).
- Cette grandeur se définit comme le rapport des teneurs respectives en soluté dans l'extrait et le raffinat lorsque l'équilibre est réalisé.

$$K = \frac{y^*}{x} \quad (1)$$

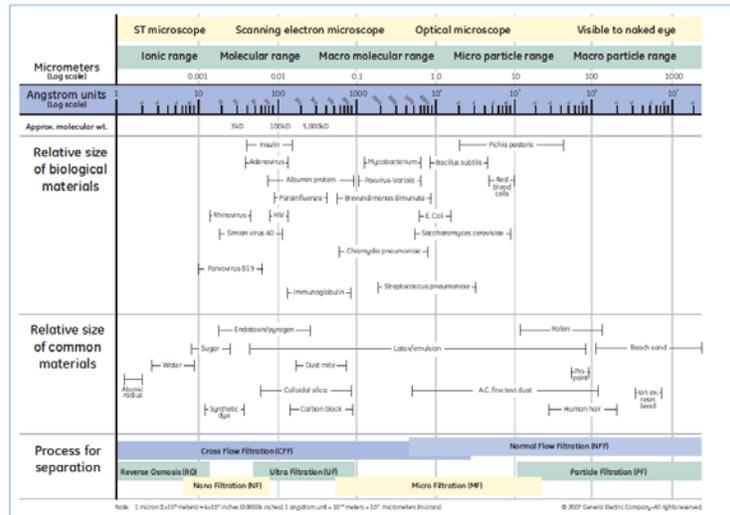
- Avec y^* = teneur du soluté dans l'extrait, x = teneur du soluté dans le raffinat, à l'équilibre.
- Un système avec un K important est souhaité puisqu'il nécessite moins de solvant et produit un extrait plus concentré.

Séparation des produits solubles

- **Séparation membranaire**

- Par définition, la filtration est un procédé de séparation permettant de séparer les constituants d'un mélange qui possède une phase liquide et une phase solide au travers d'un milieu poreux.
- La filtration conventionnelle utilise de la toile, de la fibre de verre, etc. comme filtre
- Les mêmes principes de filtration peuvent être utilisés pour séparer des petites particules en utilisant des membranes de polymères.
- Les procédés de séparation membranaire peuvent être classés en 3 catégories selon la taille des particules à séparer
 - Microfiltration
 - Ultrafiltration
 - Osmose inverse

Échelle de filtration

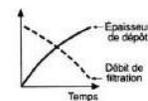
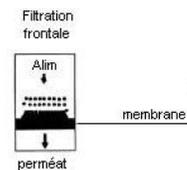


GE Healthcare

Séparation des produits solubles

- **Séparation membranaire – La filtration frontale**

- Dans ce cas, toute l'eau qui pénètre dans le module est pressée contre la membrane.
- Certains solides et composés, selon la taille des pores de la membranes, restent derrière la membranes tandis que l'eau la traverse → il y a ensuite une plus grande résistance pour passer la membrane.
- Quand la pression de l'eau d'alimentation est continue, le flux traité diminue. Après un certain temps le flux a tellement diminué que la membrane a besoin d'être nettoyé.
- La filtration frontale est utilisée car la perte d'énergie est moindre que lorsqu'on applique une filtration tangentielle.
 - Toute l'énergie qui est dans l'eau est utilisée pour passer la membrane.
 - La pression nécessaire pour presser l'eau à travers la membrane est appelée la pression transmembranaire = la pression moyenne de l'alimentation moins la pression du perméat.



Séparation des produits solubles

- **Séparation membranaire – La filtration tangentielle**

- Dans ce cas, l'alimentation est recyclée. Lors de la recirculation du milieu, le flux est parallèle à la membrane.
- Seulement une petite partie de l'alimentation est utilisée pour la production de perméat, la plus grande partie de l'eau quittant le module ou étant recyclée.
- La filtration tangentielle a donc un coût énergétique élevé car tout le milieu alimentant le système doit être apporté sous pression.
- La vitesse de l'eau alimentant le système de façon parallèle à la membrane est relativement élevée.
- Le but de ce débit est le contrôle de l'épaisseur du gâteau. Les forces d'écoulement sont élevées, ce qui permet d'emporter les solides en suspension dans l'eau.

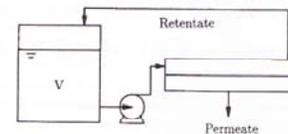
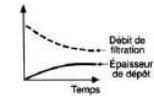
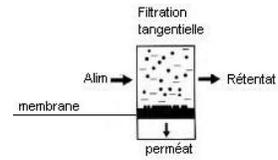


Figure 10.13 Typical batch ultrafiltration setup.

Force motrice de la filtration

- **Pression**
- **Dialyse**
- **Osmose**

1. Flow distribution manifold
2. Back plate
3. Spacers
4. Washer
5. Nut
6. Guide rods
7. Stand
8. Retentate port
9. Filtrate port
10. Feed port
11. Tie rod

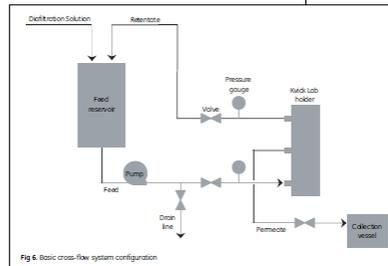


Fig 6. Basic cross-flow system configuration

GE Healthcare)

Séparation des produits solubles

- **La dialyse**

- Une des méthodes les plus utilisées pour changer la concentration en sels d'une solution protéique est la dialyse.
- Dans une dialyse, les protéines dans une concentration de sels donnée sont séparées d'une solution à la concentration en sels différente par une membrane poreuse.
- Les pores de cette membrane peuvent avoir différentes tailles;
 - certaines membranes ne laisse passer que des ions
 - d'autres laisse passer de petites protéines (jusqu'à des poids moléculaires de 50 000 Da).
- Les sels auront tendance à équilibrer leur concentration de part et d'autre de la membrane.
- En utilisant un volume de tampon de dialyse beaucoup plus grand que celui de la solution protéique, on changera rapidement la teneur en sels de celle-ci en la même que celle du tampon de dialyse.

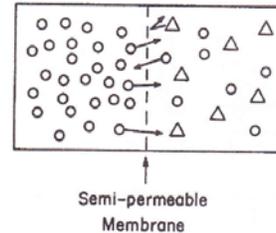
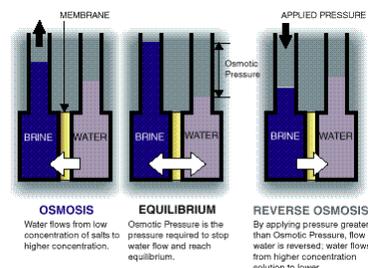


Figure 11.18. A typical dialysis membrane separation. Low-MW component 1 (○) diffuses through membrane from high to low concentration region. High-MW component (△) cannot pass.

Séparation des produits solubles

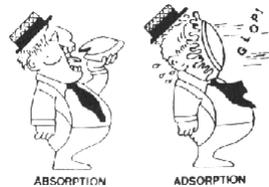
- **Séparation membranaire – Osmose inverse**

- L'eau circule d'un compartiment avec peu de solides dissous vers un compartiment avec une teneur élevée en solides dissous
- La pression osmotique est la pression utilisée pour arrêter la circulation d'eau à travers la membrane, afin d'obtenir un équilibre
- En appliquant une pression supérieure à la pression osmotique, le débit d'eau s'inverse; l'eau circule alors du compartiment avec le plus de solides dissous vers le compartiment avec le moins de solides dissous



Séparation des produits solubles

- **Adsorption**
 - L'adsorption est un phénomène de fixation de molécules sur la surface d'un solide.
 - Ce phénomène est utilisé pour récupérer des molécules dispersées dans un fluide.
 - L'adsorption peut être classée en 3 catégories:
 - L'adsorption conventionnelle
 - L'échange d'ions
 - L'adsorption d'affinité



Séparation des produits solubles

- **Adsorption conventionnelle**
 - Lors de l'adsorption conventionnelle la fixation provient de l'établissement, entre le solide et les molécules, de liaisons de Van Der Waals (liaisons de type électrostatique de faible intensité, avec des énergies d'interaction entre 5 et 40 kJ/mol).
 - Les charbons activés sont les particules les plus utilisées dans l'industrie.
 - Ceux-ci sont constitués à partir de matières organiques que l'on combine à des substances inorganiques
 - 1^{ère} étape: calcination (ou pyrolyse), à forte température, des produits constituants

Séparation des produits solubles

- **Adsorption conventionnelle – Le charbon activé**
 - 2^{ème} étape: l'activation qui consiste à augmenter le pouvoir adsorbant en éliminant les goudrons qui obstruent les pores et ce selon deux procédés distincts:
 - l'activation physique qui consiste en une nouvelle combustion avec un choc thermique (à 900 à 1 000 °C), effectuée dans un courant d'air et de vapeur d'eau, injectés sous pression → Procédé d'oxydation contrôlée
 - Effet: cela va créer des millions d'alvéoles microscopiques sur la surface du charbon, augmentant de façon très importante sa surface et son pouvoir d'adsorption. Ce procédé donne un charbon à pores étroits
 - l'activation chimique par de l'acide phosphorique entre 400 °C et 500 °C. Ce procédé donne un charbon à pores plus larges.
 - La surface développée par le charbon actif est énorme : un gramme de charbon actif a une surface spécifique comprise entre 400 et 2 500 m²/g. Il est hydrophobe

Séparation des produits solubles

- **Adsorption conventionnelle – Principales applications du charbon activé**
 - Traitement de l'eau potable:
 - Purification de l'eau pour la consommation humaine dans les applications domestiques ou municipales
 - Traitement des eaux résiduaires:
 - Abattement de substances potentiellement dangereuses ou nocives des eaux industrielles, des lixiviats ou des eaux résiduaires urbaines
 - Traitement des produits alimentaires:
 - Purification ou décoloration d'une grande variété d'aliments.
 - Médical:
 - Traitement des intoxications et diverses pathologies par le charbon actif en poudre. Incorporation de tissus de charbon actif dans les pansements, les filtres à odeurs et les masques.

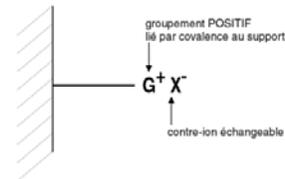


Séparation des produits solubles

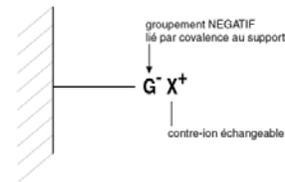
- **Adsorption échange ionique**

- Une résine échangeuse d'ions est composée de 3 éléments:
 - Un réseau de polymère organique : exemple: styrene-divinylbenzene, acrylate, methacrylate, plyamine, cellulose, dextran, etc.
 - Des groupements ioniques fonctionnels qui sont fixés de façon permanente à ce réseau (anions ou cations)
 - Des contre ions
 - La chromatographie par échange d'ions se pratique le plus souvent sur colonne, mais la méthode peut être transposée sur couche mince.
- Du papier échangeur d'ions est également commercialisé .
- L'échange d'ions peut être réalisé en batch : la résine est mise en présence de la solution et agitée mécaniquement

Résine échangeuse d'anions (anionique) :



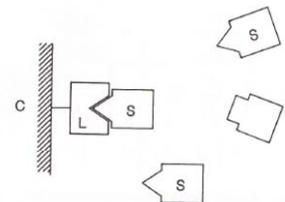
Résine échangeuse de cations (cationique) :



Séparation des produits solubles

- **Adsorption d'affinité**

- Ce phénomène repose sur l'interaction chimique entre un soluté et un ligand, ce dernier étant attaché à la surface d'une particule via une liaison covalente ou ionique.
- Exemples de couples ligand/soluté:
 - Inhibiteurs d'enzyme / enzymes
 - Antigènes / anticorps
 - Bases complémentaires / acides nucléiques
 - Récepteurs / hormones
- Cette méthode est hautement sélective. Inconvénient → coût élevé de la résine

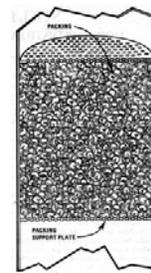


Séparation des produits solubles

- **Adsorption en lit fixé « Fixed-Bed Adsorption »**

- La molécule adsorbante peut être insérée «packed» dans une colonne cylindrique. Le milieu à purifier peut ensuite passer au travers la colonne pour une adsorption sélective.
- Dans ce type de colonne, la capacité d'adsorption est limitée en raison de la quantité fixée de résine.
- Il existe 3 zones dans une colonne:

- Une zone saturée
- Une zone d'adsorption
- Une zone vierge



Séparation des produits solubles

- **Adsorption en lit fixé « Fixed-Bed Adsorption »**

- À t_b , la colonne est saturée excepté dans sa partie la plus basse.
- Si la solution continue de s'écouler la concentration en soluté va augmenter jusqu'à ce qu'elle soit identique à celle du milieu à traiter.
- L'adsorption est stoppée à t_0 et le matériel fixé est ensuite élué

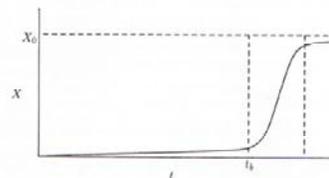


Figure 10.12 Breakthrough curve for fixed-bed adsorption.

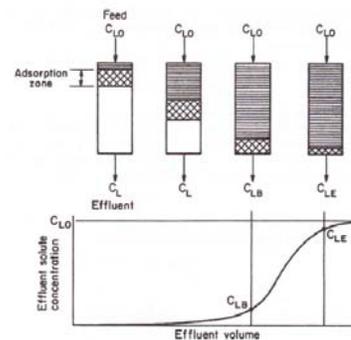
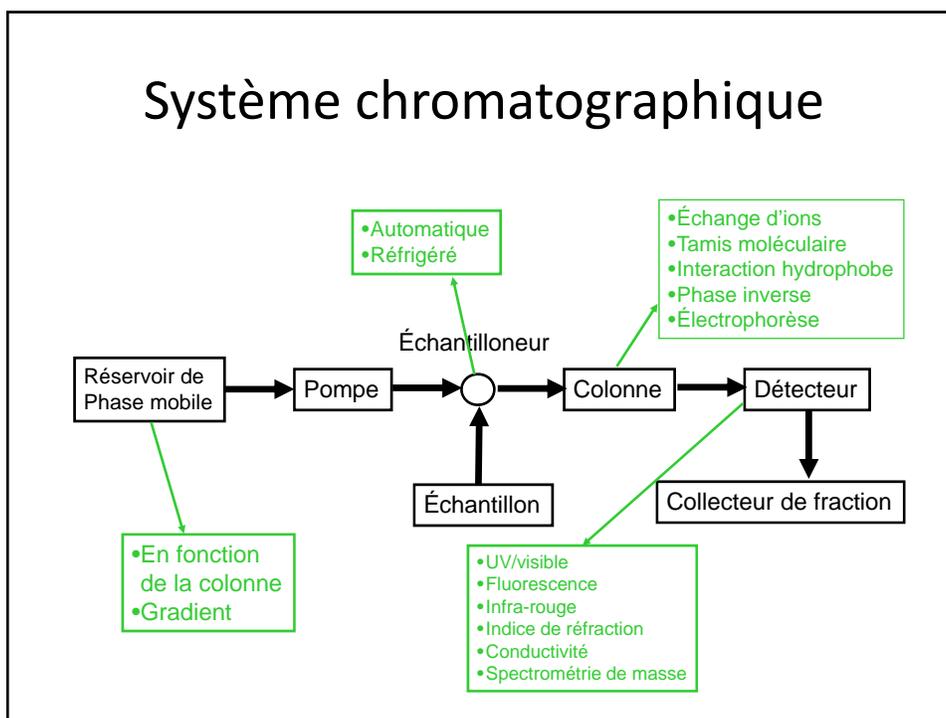


Figure 11.17. Movement of adsorption zone through a fixed-bed downflow adsorber and the corresponding breakthrough curve. (With permission, from D. W. Sandstrom and H. E. Klei, *Wastewater Treatment*, Pearson Education, Upper Saddle River, NJ, 1979, p. 291.)

Système chromatographique



Étapes finales de la purification

- **La cristallisation**

- La cristallisation est une opération unitaire du génie chimique à la fois d'une très grande complexité théorique et d'une importance économique vitale.
- En 1994, 25 à 30 % du chiffre d'affaires de la chimie est réalisé avec des produits obtenus dans des procédés comportant au moins une étape de cristallisation ou de précipitation.



- Ce pourcentage atteint 75 à 80 % pour les procédés de chimie organique fine, principalement utilisés pour la fabrication de principes actifs de l'industrie pharmaceutique ou agrochimique.

Étapes finales de la purification

- **La cristallisation**
 - Les productions obtenues dans les cristallisoirs industriels varient en fonction de la taille de l'installation. Elles peuvent atteindre :
 - plusieurs centaines de tonnes par jour pour des produits dits de grande commodité tels que l'hydrogénocarbonate de sodium, l'acide adipique ou le sulfate d'ammonium dans des procédés continus ;
 - quelques dizaines de tonnes par jour en discontinu pour des produits tels que l'acide salicylique, l'aspirine ou le paracétamol ;
 - voire moins d'une tonne par jour pour des produits à forte valeur ajoutée (composés pharmaceutiques ou agrochimiques par exemple ainsi que certains produits de chimie de spécialité).

Étapes finales de la purification

- **La cristallisation**
 - Pour obtenir un produit cristallisé à partir d'une solution, il est nécessaire de créer une sursaturation, c'est-à-dire d'agir physiquement ou chimiquement sur la solution pour que la concentration du soluté dans la solution dépasse la solubilité (ou concentration à saturation).
 - Cela peut être réalisé de différentes manières:
 - refroidissement par échange ou par évaporation d'un tiers corps (refroidissement direct) ;
 - refroidissement par évaporation sous vide (en réinjectant ou non dans l'appareil le solvant vaporisé puis condensé) ;
 - évaporation isotherme, au cours de laquelle c'est l'augmentation de la concentration qui crée la sursaturation ;
 - relargage par ajout d'un sel (salting out) ou d'un tiers solvant ;
 - réaction chimique entre deux corps solubles pour créer un produit insoluble, auquel cas on parlera de précipitation

Étapes finales de la purification

- **Séchage**
 - L'extraction de solvant à partir d'un produit purifié humide est généralement effectuée pas séchage.
 - Le choix des conditions de séchage est dicté par rapport aux propriétés physiques du produit, sa sensibilité à la chaleur et son degré final d'humidité.
 - Il existe 5 types majeurs d'équipement de séchage de produit de fermentation:
 - « *vacuum-tray dryer* »
 - « *freeze drying (lyophilisation)* »
 - « *rotary-drum dryers* »
 - « *spray dryers* »
 - « *pneumatic conveyor dryers* »



Spray dryer



Vacuum-tray dryer



Lyophilisateur

Références

- Bioprocess Engineering, Basic Concepts, Second Edition, ML. Shuler, F. Kargi, 2002, Prentice Hall
- Biochemical Engineering, J.M. Lee, 1991, Prentice Hall
- Techniques de l'Ingénieur
- Benoit Leblanc, Université de Sherbrooke