

Opération unitaire :

Extraction des protéines du lactosérum par chromatographie échangeuse d'ions (CEI)

I Le produit :

A) Le lait :

Phase gazeuse	Phase aqueuse			Suspension colloïdale	Emulsion grasse
	Solution vraie		Solution colloïdale		
CO ₂ , O ₂ et N ₂ .	Glucides : (lactose, ..)	Ions minéraux	<u>Protéines solubles :</u>	<u>Protéines insolubles</u> (caséines)	Matière grasse
			albumines,		
			globulines		

B) Le lactosérum :

Le lactosérum, ou petit-lait, est la partie liquide issue de la coagulation du lait (étape qui consiste à agglomérer entre elles une grande partie des protéines du lait pour produire du fromage).

Composition du lactosérum pour 1 L :

Protéines	⇒ 2 à 10 g
Glucides	⇒ 48 g
Lipides	⇒ 1 g
Calcium	⇒ 1,05g
Na	⇒ 1,30 g
K	⇒ 1,40 g
Mg	⇒ 0,150 g
Cl	⇒ 1,00 g

Préparation du lactosérum :

- Faire coaguler 250 mL de lait par un minimum d'acide acétique
- Laisser décanter
- Filtrer sur gaze puis sur filtre
- Ramener à **pH 6** avec du NaOH

Les protéines du lactosérum possèdent un véritable intérêt nutritionnel en raison de leur composition élevée en acides aminés essentiels. Les plus importantes sont la ***β-lactoglobuline*** (β-LG), l'***α-lactalbumine*** (α-LA), le ***glycomacropeptide*** (GMP), les ***immunoglobulines bovines*** (IgG), l'***albumine sérique bovine*** (BSA) et la ***lactoferrine bovine*** (LF).

Ces protéines du lactosérum ont un nombre élevé d'acides aminés acides, dès lors, elles présentent des pHi bas (aux alentours de 4,5-5,5) ; elles seront donc chargées négativement au pH du lactosérum préparé.

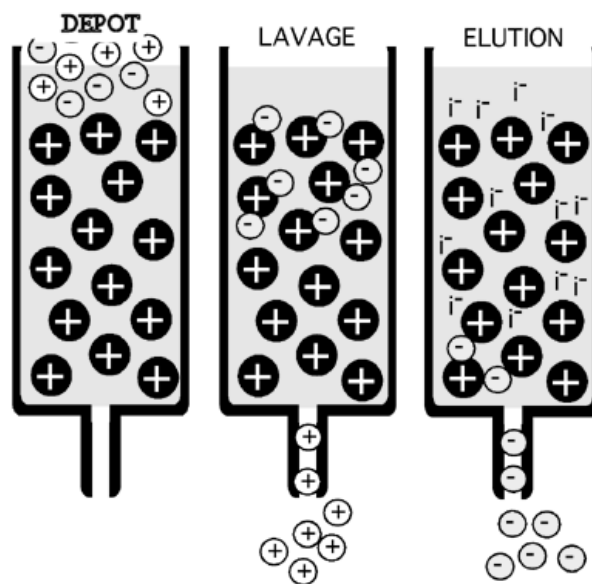
Ainsi, on pourra retenir ces protéines chargées négativement sur chromatographie échangeuse d'anions.

II La méthode : chromatographie échangeuse d'ions :

A) Principe de la méthode :

Dans la chromatographie d'échange d'ions, la **phase stationnaire** comporte des **groupements ionisés** (+ ou -) fixes ; des **ions mobiles** de **charge opposée** assurent **l'électroneutralité**. Les ions retenus au voisinage des charges fixes sont échangeables avec les ions présents dans la phase mobile.

La séparation des molécules d'intérêt est basée sur cette **propriété d'échange d'ions** et ne peut donc s'appliquer qu'à des solutés ionisables.



B) Résine utilisée : QMA Spherosil®:

Silica-based hydrophobic ion exchangers for liquid chromatography QMA Spherosil® are rigid beads based on porous silica. The silanols covering the pore surface are linked to functionalized polymers ; The polymer provides the ionic and slightly hydrophobic properties to the sorbent. QMA is a quaternary amine (see structure in Figure 1).

Figure 1. Structure (left) and internal porous structure (right) of QMA Spherosil.

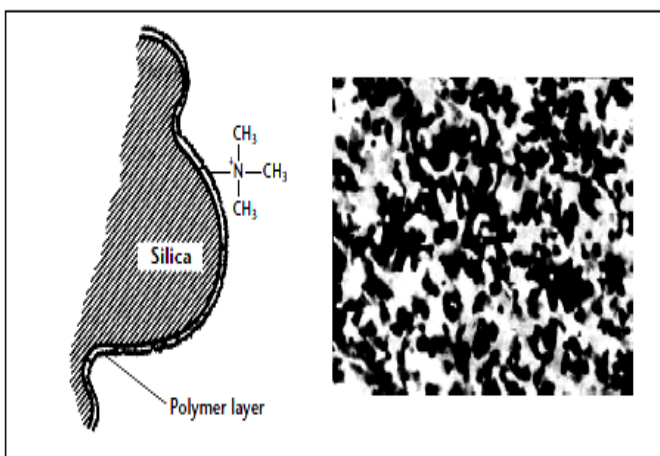
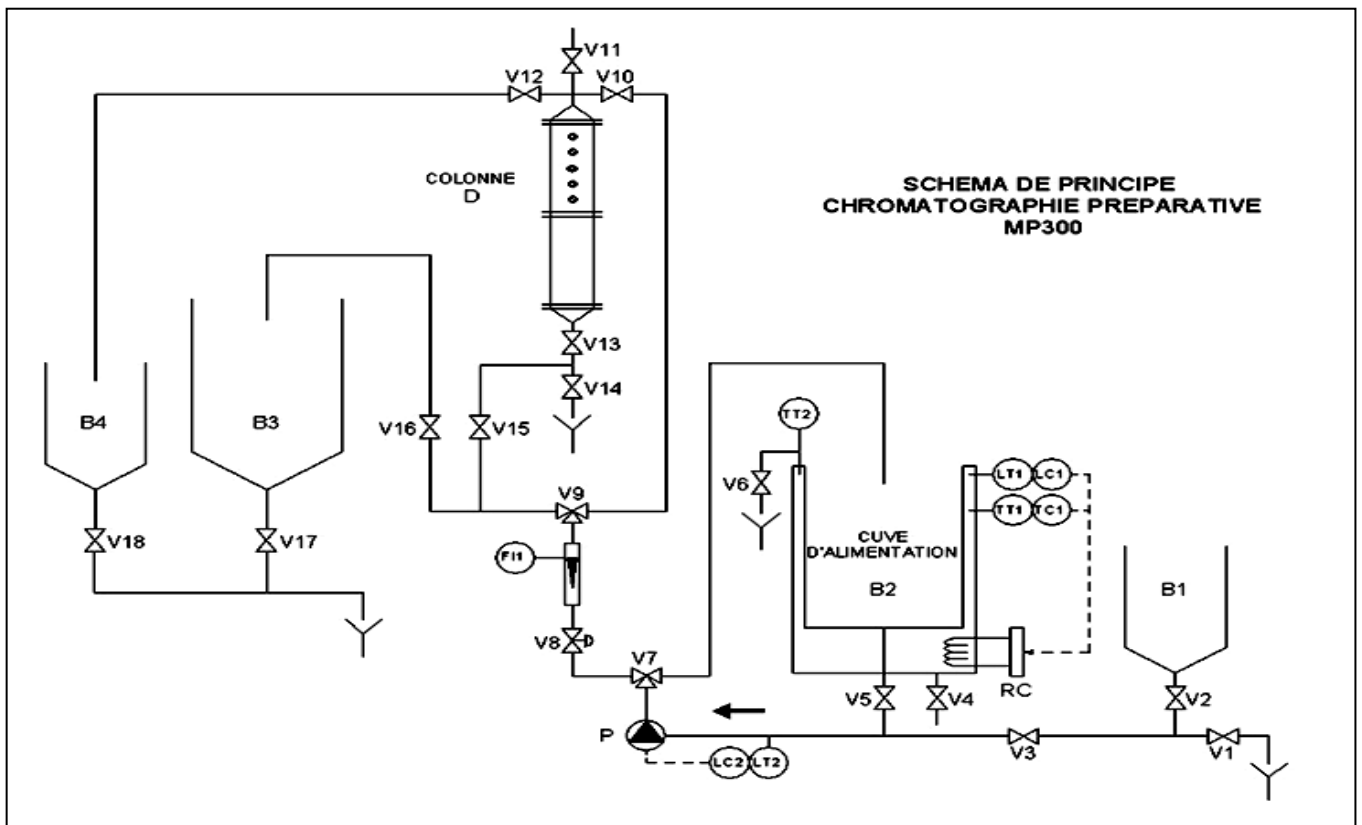
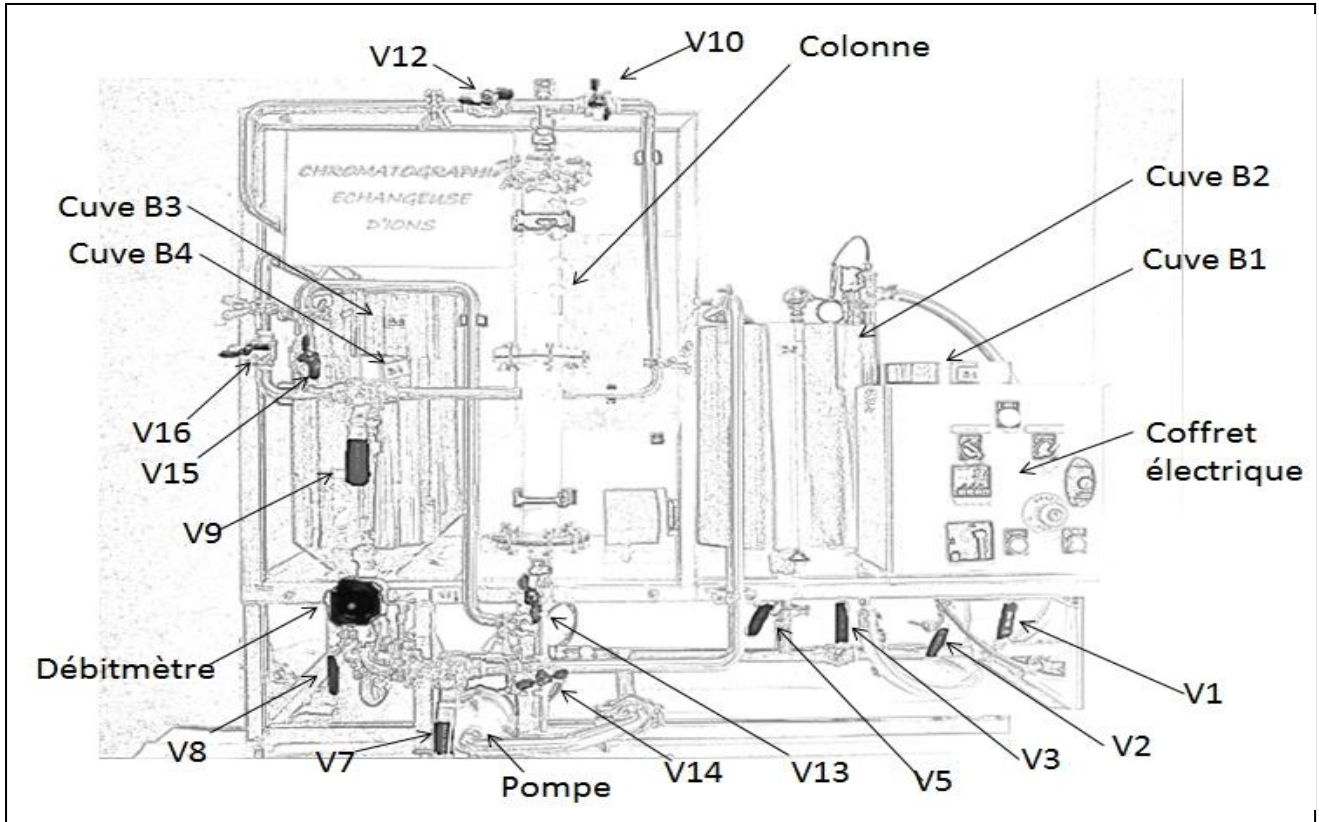


Table 1. Main Properties of QMA Spherosil sorbents.

Particle size (µm):	M grade	40-100
	LS grade	100-300
Exclusion limit (dt) ⁽¹⁾		10 ⁶ - 10 ⁷
Average porous volume (cm ³ /g)		1
Average surface specific area (m ² /g)		25
Nature of ionizable group		Quaternary amine
Average ionized groups (µeq/g)		300
pk of ionizable group		11
Working pH range		1-12
Stability to detergents and denaturing agents		Excellent
Heat stability		Good
Microbial stability		Excellent
Volume changes due to pH and ionic strength		None
Capacity for BSA (µeq/g) ⁽²⁾		30

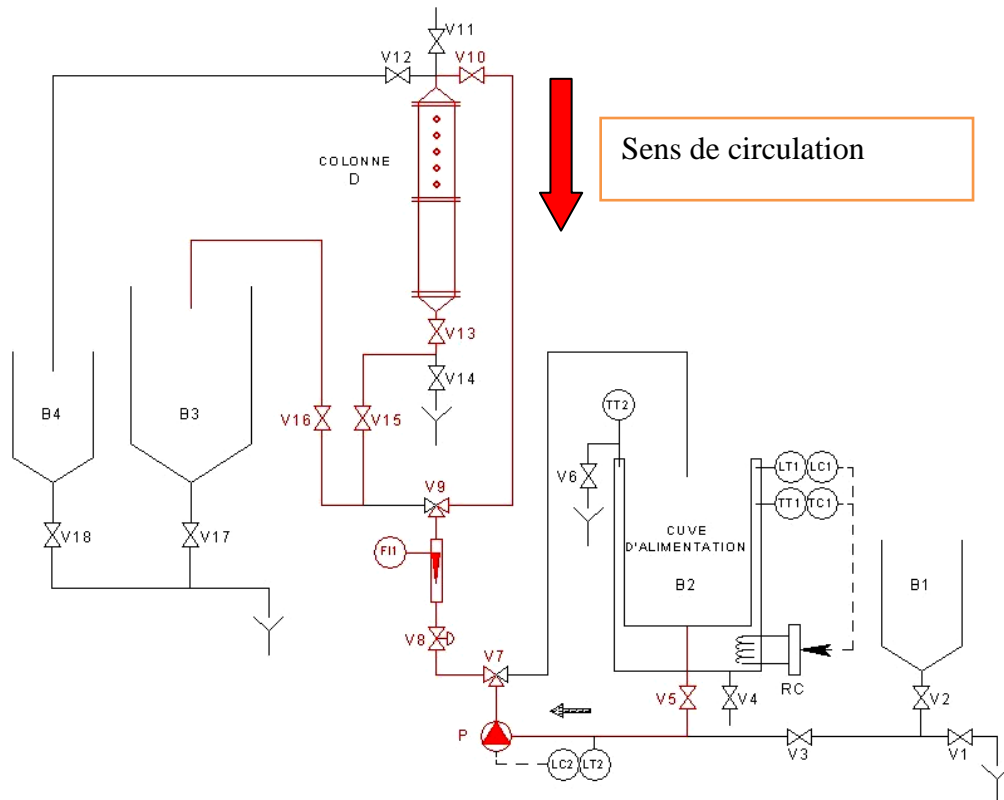
C) Le pilote utilisé : le MP300 :

Spécifications techniques : - Colonne en altuglas (plexiglas transparent fragile !) ; - Un distributeur, maille triangulaire ; - Cuve d'alimentation, de récupération, contenant le liquide d'éluion , contenant la solution de lavage, en inox ; - Pompe centrifuge ; - Sonde de mesure de température ; - Débitmètre ; - Régulateur de température/résistance chauffante ; - Cinq prises d'échantillons par seringue pour analyse en laboratoire :

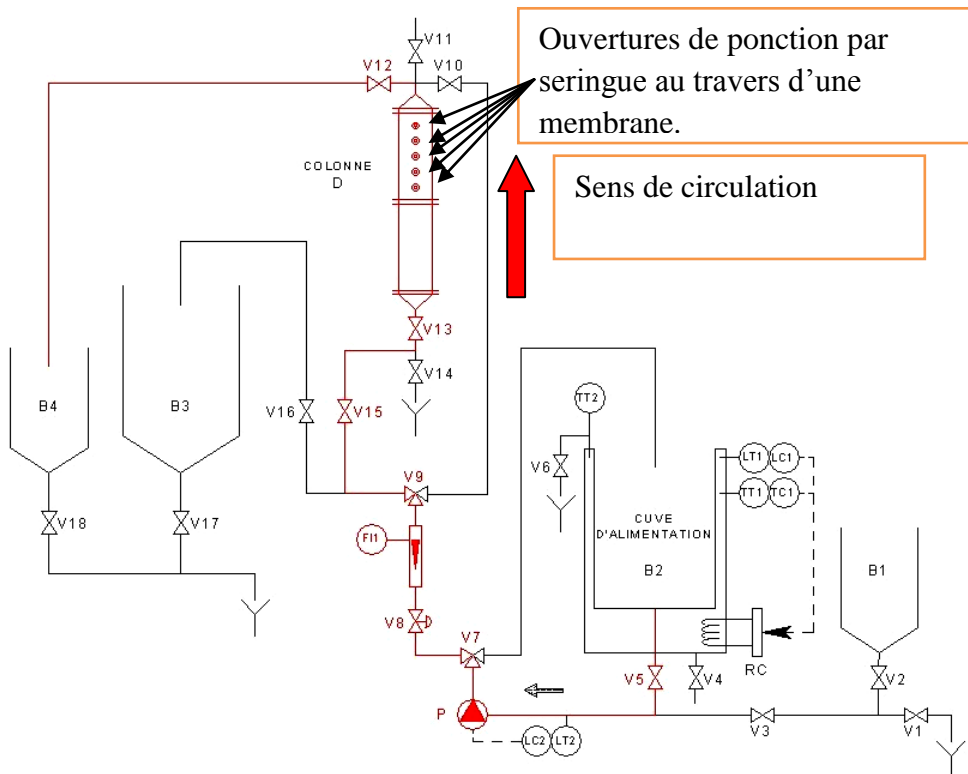


Il existe deux principaux circuits d'utilisation de la colonne :

→ Le circuit en lit fixe :



→ Le circuit en lit fluidisé :



Un lit fluidisé est constitué d'une phase solide composée de petites particules, et d'une phase fluide en écoulement **ascendant** à travers le lit de particules. Il y a alors compétition entre le poids qui tend à faire sédimenter au fond les particules, leur densité étant plus grande que la densité du fluide, et l'entraînement qu'exerce le fluide sur les particules : les possibilités d'échanges sont optimisées.

Autre avantage : la résine se trouvant dans le tronçon inférieur de la colonne, la ponction d'échantillons par seringue au niveau du tronçon supérieur permet de réaliser des mesures ponctuelles post-colonne.

			validée ?	Compt.	
C1.6.Réaliser et contrôler des opérations unitaires, à l'échelle d'un pilote, dans un contexte de production	C1.6.1.	Réaliser les opérations préliminaires à la mise en œuvre du pilote	<i>Préparation correcte et conforme des réactifs, produits et matériels</i>		A
			<i>Réalisation conforme des contrôles préalables à la mise en service du pilote</i>		B
			<i>Vérification et ajustement des points de réglage</i>		C
			<i>Respect du temps imparti</i>		D
			<i>Respect des procédures de prévention des risques</i>		E
			<i>Systèmes d'acquisition et de pilotage opérationnels</i>		F
	C1.6.2.	Mettre en œuvre la fabrication	<i>Suivi et enregistrement correct et pertinent des paramètres de fabrication</i>		G
			<i>Respect du protocole de fabrication</i>		H
			<i>respect des procédures d'échantillonnage ou de prélèvement</i>		I
			<i>Mise en œuvre correcte des opérations analytique préconisées</i>		J
			<i>Diagnostic de conformité ou de non conformité justifié et mise en œuvre des mesures correctrices adaptées</i>		K
			<i>Respect du temps imparti</i>		L
	C1.6.3.	Effectuer l'arrêt et la mise en sécurité des installations	<i>Respect des protocoles d'arrêt</i>		M
			<i>Réalisation du nettoyage, de la désinfection de l'installation et des matériels annexes</i>		N
			<i>Gestion adaptée des produits et déchets</i>		O