



**HAL**  
open science

## Purification des protéines de l'oeuf

Peignon Théo, Stéphane Pezenec

► **To cite this version:**

Peignon Théo, Stéphane Pezenec. Purification des protéines de l'oeuf. Alimentation et Nutrition. 2022. hal-03708524

**HAL Id: hal-03708524**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03708524>**

Submitted on 29 Jun 2022

**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.

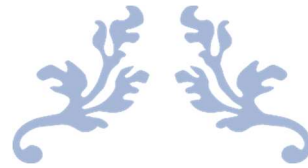
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

INRAE, UMR STLO  
65 Rue de Saint-Brieuc  
35000 Rennes

Département Génie  
Biologique  
Option IAB  
IUT Saint Brieuc  
18 rue Henri Wallon  
22000 Saint-Brieuc



---

# INRAE : PURIFICATION DES PROTEINES DE L'ŒUF

---

UMR STLO



Etudiant : Théo PEIGNON

01 JUIN 2022

Tutrice IUT :  
Meg Rouxel  
Enseignante-chercheuse

Tuteur Entreprise : Stéphane  
PEZENNEC  
Chargé de recherche

INRAE  
65 rue de Saint Brieuc à Rennes

Validation

Je soussigné Pezenec Stéphane responsable de stage de Peignon Théo certifie avoir pris connaissance de ce rapport et autorise le stagiaire à le faire parvenir à l'IUT de Saint-Brieuc.

Date

Signature

# Sommaire

1.	Introduction :	3
1.1	Présentation de l'environnement du stage :	4
1.1.1	L'entreprise :	4
1.1.2	L'environnement :	4
2	Compte rendu du travail effectué :	5
2.1	Généralité/bibliographie :	5
2.1.1	Chromatographie Ionique (résine échangeuse d'anions) :	6
2.1.2	HPLC Phase Inverse :	6
2.1.3	Electrophorèse (SDS-Page) :	6
2.1.4	Spectrophotométrie UV-Visible :	6
2.1.5	Fluorescence :	7
2.1.6	Spectrophotométrie Infra-rouge :	7
2.2	Matériel et Méthodes :	8
2.2.1	Package de la résine Q-Sepharose échangeuse d'anions :	8
2.2.2	Conditionnement de la résine Q-Séparose :	9
2.2.3	Préparation de la solution de blanc d'œuf <<démuciné>> :	10
2.2.4	Chromatographie par paliers :	10
2.2.5	Dialyse :	11
1.1.1	Dosage des protéines du blanc d'œuf par HPLC de partage en phase Inverse sur colonne (C4) :	12
2.2.6	Lyophilisation :	13
2.2.7	Préparation d'étalons de protéine purifiées :	13
2.2.8	Electrophorèse :	14
3	Bilan des résultats acquis :	16
3.1.1	1 <sup>er</sup> Extraction de l'ovalbumine :	16
3.1.2	2 <sup>ème</sup> et 3 <sup>ème</sup> Extraction de l'ovalbumine :	16
4	Bilan personnel :	27
5	Discussion :	28
6	Références :	29
7	Résumé :	30
8	Liste mot Clés :	30

# 1. Introduction

L'œuf est un produit alimentaire issu majoritairement de l'élevage de volaille. Il est utilisé comme aliment pour l'humain sous forme simple ou comme ingrédient dans la composition de nombreux plats. En France c'est 217 œufs qui sont consommés en moyenne par français chaque année (*Source : Itavi d'après IEC, MEG, SSP, Prodcop, Douanes en 2018*). Car en effet hormis ses qualités nutritionnelles excellentes l'œuf possède des caractéristiques physicochimiques intéressantes : un pouvoir émulsifiant, moussant, coagulant qui est principalement lié à ses protéines. Dans l'industrie agroalimentaire ses propriétés sont extrêmement appréciées. Il y a donc un grand intérêt porté aux protéines de l'œuf, ce qui se traduit par l'investissement dans la recherche sur les applications de ce dernier.

Dans le cadre de la validation de mon DUT génie biologie option agroalimentaire, je devais effectuer un stage. J'ai été accepté à l'INRAE dans l'unité STLO et intégré à l'équipe ISFP (Interactions structure et fonctionnalités des protéines). Le sujet de mon stage portait sur la purification de protéines du blanc d'œuf, par une chromatographie sur résine échangeuse d'anions. J'ai effectué aussi leurs caractérisations par HPLC de partage en phase inverse, spectrophotométrie UV-visible et infra-rouge. Car en effet les travaux de l'équipe d'accueil nécessitent des fractions purifiées de certaines protéines majeures. J'ai concentré mes efforts sur une seule protéine de l'albumen d'œuf de poule en particulier, l'ovalbumine. J'ai été suivi par une chercheuse de l'IUT de Saint-Brieuc, Meg Rouxel. Il y aura également un suivi et un encadrement effectuer par des membres du STLO qui sont : Hamon Pascaline, Pezennec Stéphane, Lechevalier Valérie, Le Floch-Fouéré Cécile.

Dans une stratégie de recherche et compréhension nous identifierons la composition du blanc l'œuf, ainsi qu'une familiarisation avec des publications scientifiques permettant une bonne prise en main du sujet. Nous commencerons par la présentation du blanc d'œuf ainsi que le principe des différentes techniques à utiliser. Puis nous décrirons l'ensembles des méthodes utilisées et enfin nous terminerons par le traitement de nos résultats ainsi qu'un bilan personnel.

## 1.1 Présentation de l'environnement du stage

### 1.1.1 L'entreprise

L'**Institut national de la recherche agronomique (INRA)** était un organisme français de recherche en agronomie existant de 1946 à 2019. L'institut a fusionné le 1<sup>er</sup> janvier 2020 avec l'IRSTEA (institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture) pour former l'**Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE, Figure 1)**.



Figure 1 : logo de l'INRAE (Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement).

Avec le statut d'Établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST), l'INRAE est sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ainsi que Le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation.

Premier institut de recherche agronomique en Europe et deuxième dans le monde en nombre de publications en sciences agricoles et en sciences de la plante et de l'animal, l'INRAE mène des recherches pour une alimentation saine et de qualité, pour une agriculture durable, et pour un environnement préservé et valorisé.

### 1.1.2 L'environnement

L'unité mixte de recherche **Sciences et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO, Figure 2)**, créée en 2004, est située sur le site Institut Agro-campus Ouest à Rennes.



Figure 2 : logo du STLO (Sciences et Technologie du Lait et de l'Œuf)

Actuellement placée sous la double tutelle de l'INRAE et de l'Institut Agro- Rennes-Angers, cette structure de recherche, dont les travaux sont dédiés à l'exploration et la valorisation du lait et de l'œuf, se place parmi les plus importantes en Europe dans ce domaine et est en forte interaction avec les entreprises de la filière et avec les régions Bretagne et Pays de Loire. Au 1<sup>er</sup> juin 2022, l'effectif des personnels titulaires est de 76 permanents dont 36 scientifiques (Ingénieur de recherche, chargés et directeurs de recherche). Auxquels il faut ajouter le personnel non titulaire : 17 doctorants, 6 post-docs, 7 CDD sur contrats de recherche et 10 stagiaires.

## 2 Compte rendu du travail effectué

### 2.1 Généralité/bibliographie

Pour mieux me familiariser et comprendre les protocoles qui me seront fournis, il m'a été transmis une publication scientifique publiée à l'Inra-Ensa écrite par Croguennec et al. (2000). Elle est rédigée en anglais et explique comment obtenir de l'ovalbumine (protéine majoritaire du blanc d'œuf) en partant d'un œuf entier. Je vais maintenant présenter la composition de l'œuf puis j'expliquerai les différentes techniques qui seront utilisés.

Dans un œuf il y a environ 10 % de coquille, 60 % de blanc, 30 % de jaune. Le jaune d'œuf est composé de plus de 50 % de matière sèche dont 16 % de protéine. Le blanc est composé de 16 à 11 % de matière sèche dont 90 % de protéine. (Source : Nys et al. 2010)

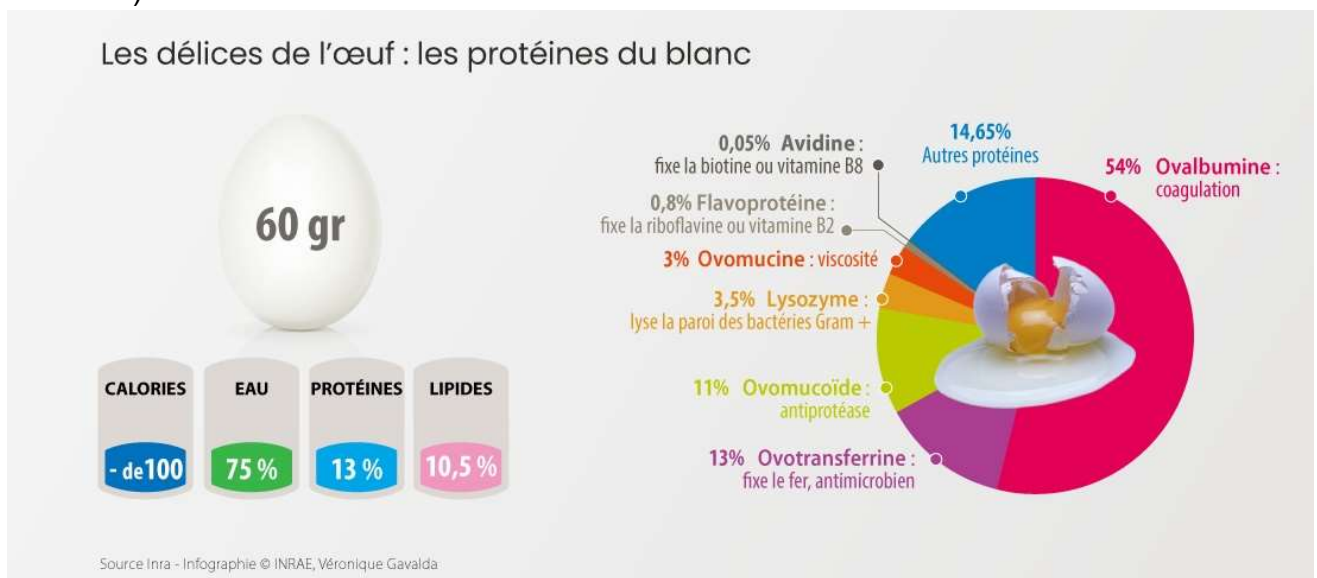


Figure 3 : graphique composition du blanc d'œuf

- L'Ovalbumine a un point isoélectrique de 4,5 et possède une masse de 45 kDa
- L'Ovotransferrine a un point isoélectrique de 6,1 et possède une masse de 77,7 kDa
- L'ovomucoïde a un point isoélectrique de 4,1 et possède une masse de 28 kDa .
- L'Ovalbumine Gène Y a un point isoélectrique de 5,3-5,5 et possède une masse de 53,6 kDa.
- Lysozyme a un point isoélectrique de 10,7 et possède une masse de 14,3 kDa.
- L'Ovomucine (responsable de la viscosité) a un point isoélectrique de 4,5-5 et possède une masse de 5 600- 23 000 kDa .
- La Flavoprotéine (fixe la riboflavine qui lui procure une couleur jaune = indicateur visuel de fin de chromatographie) a un point isoélectrique de 4 et possède une masse de 29,2 kDa. (Source : Nys et al. 2010)

### **2.1.1 Chromatographie échangeuse d'anions**

Les **résines de chromatographie échangeuses d'ions (anions ici)** sont couramment utilisées pour séparer des molécules, telles que de grosses protéines, de petits nucléotides et des acides aminés, en fonction de leur charge. Les groupes fonctionnels dans les résines ont des charges positive qui lient les molécules avec des charges négative (opposées). La libération des molécules liées à la résine est réalisée par déplacement de charge, via l'application d'une concentration croissante d'une molécule de même charge (ici négative) que l'échantillon dans la phase mobile. (Source Abou Dalle 2021-2022)

### **2.1.2 HPLC de partage en phase inverse**

HPLC (ou chromatographie en phase liquide haute performance) est une chromatographie d'adsorption liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire se distingue par son apolarité\*. Elle est constituée, la plupart du temps, par des silices apolaires greffées. Il existe des greffons apolaires de taille différente, de 2 à 18 atomes de carbone (C2 à C18), donc de polarités différentes.

La phase mobile est polaire et hydrophile. Les séparations sont fondées sur des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire.

Ainsi, plus un soluté est apolaire, plus il sera retenu au niveau de la phase solide stationnaire. A l'inverse, plus un soluté est polaire, plus il sera entraîné par la phase mobile liquide. (Source Abou Dalle 2021-2022)

*\*Les liaisons C-C et C-H sont hydrophobes donc apolaires.*

### **2.1.3 Electrophorèse (SDS-Page)**

L'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) est une technique consistant à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille. (Source Castillo 2021-2022)

### **2.1.4 Spectrophotométrie UV-Visible**

La spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible, repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (190-400 nm) et au visible (400-800 nm).

Un spectrophotomètre UV-visible peut être utilisé dans des études quantitatives. La présence d'un analyte donne une réponse que l'on peut supposer proportionnelle à la concentration. Pour des résultats précis, la réponse de l'instrument à l'analyte dans la solution inconnue doit être comparée à une gamme d'étalonnage.

(Source Abou Dalle 2021-2022)



### **2.1.5 Fluorescence**

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par diverses formes d'excitation autres que la chaleur. Une molécule fluorescente (fluorophore) peut absorber l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et la restituer sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Le principe est d'exciter une molécule avec un photon incident. Le retour spontané à un état de plus basse énergie va conduire à l'émission d'un photon par cette même molécule avec une longueur d'onde plus élevée que celle du photon incident. Les spectres d'absorption et d'émission sont caractéristiques du fluorophore étudié, et portent de l'information sur son environnement physicochimique. (*Source* Lakowicz et al 2006)

### **2.1.6 Spectrophotométrie infra-rouge**

Le principe de la spectroscopie infrarouge (IR) repose sur l'absorption de la lumière par la plupart des molécules dans la région de l'infrarouge du spectre électromagnétique et la conversion de cette énergie absorbée en vibrations moléculaires. Cette absorption correspond spécifiquement aux liaisons présentes dans la molécule. Avec un spectromètre, cette absorption du rayonnement infrarouge par le matériau de l'échantillon est mesurée en fonction de la longueur d'onde (sous la forme du nombre d'ondes, typiquement de 4000 à 600  $\text{cm}^{-1}$ ).

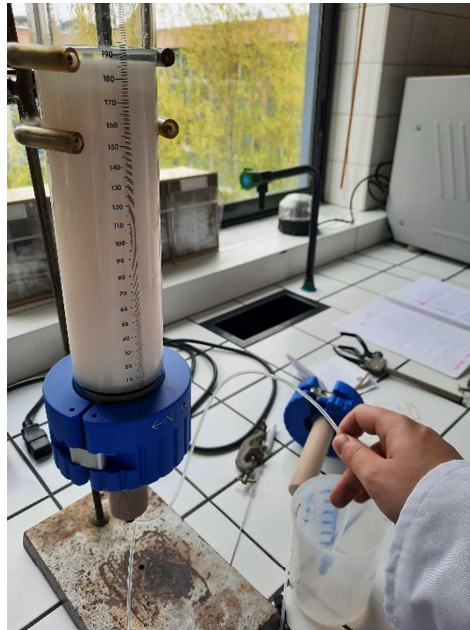
Le résultat est un spectre qui donne une "empreinte chimique" distinctive qui peut être utilisée pour visualiser et identifier des échantillons organiques et inorganiques. Dans le cas des protéines, le spectre est porteur d'informations sur les différents niveaux de structure des protéines.

(*Source* Abou Dalle 2021-2022)

## 2.2 Matériel et Méthodes

### 2.2.1 Package de la résine Q-Sepharose échangeuse d'anions

Nous avons utilisé une colonne en verre Interchim d'une dimension de 50 × 200 mm avec une pression maximale de 10 bars. La résine utilisée est une GE Healthcare qui est une résine échangeuse d'anions forte, composée de billes d'agarose de 90 µm de diamètre en moyenne réticulées à 6% avec des groupements ammonium quaternaires (Q). Elle possède une très bonne stabilité chimique.



*Figure 4 photo package de la résine dans une colonne Interchim*

Cette manipulation a pour but de faire sédimenter la résine (ici 150 ml) en évacuant l'éthanol (figure 4). Il faut absolument faire attention que la résine ne rentre pas en contact avec l'air sous peine de générer un gazage de notre résine menant à son colmatage. Nous la conserverons une fois sédimentée dans sa colonne en circuit fermé.

## 2.2.2 Conditionnement de la résine Q-Sépharose

Cette manipulation a pour but de conditionner la résine pour permettre sa régénération (nettoyage), permettant ainsi son bon fonctionnement lors de la purification de l'ovalbumine. Nous utiliserons une chaîne de chromatographie basse pression ProStar™ voir figure 5 (Varian, Les Ulis, France) équipée d'un détecteur UV à 280 nm.

### Méthode

La manipulation consiste en l'injection de différentes solutions en volume double de celui de notre résine (150 ml), ce qui permet non seulement un remplissage complet de la colonne ainsi qu'un rinçage. Le protocole est synthétisé sous forme de tableau ci-dessous (tableau 1).

Tableau 1 Paramètre conditionnement

Solvant	Concentration	Débit voie A (ml/min)	Débit voie B (ml/min)	Débit total (ml/min)	Durée	Volume(ml) Minimum
NaCl 1M	1M	0	10 ou plus	30 (10)	10 min (30 min.)	300
Eau distillée	/	30 si possible, sinon 15	0	30 (15)	10 min. (20 min.)	300
NaOH 1M	0,5 M	5	5	30 (10)	10 min (30 min.)	300
NaCl 1M	1M	0	10	10 ou plus (30)	60 min.	Jusqu'à atteindre le pH 7
Eau distillée	/	30 si possible, sinon 15	0	30 (15)	10 min. (20 min.)	300
Isopropanol 30%	/	0	10	10	30 min.	300
Eau distillée	/	30 si possible, sinon 15	0	30 (15)	10 min. (20 min.)	300
NaCl 1M	0,5 M	7,5 si possible, sinon 5	7,5 si possible, sinon 5	15 (10)	20 min. (30 min.)	300



Figure 5 Photo de la chaîne de chromatographie basse pression permettant le conditionnement

### **2.2.3 Préparation de la solution de blanc d'œuf démuçiné**

L'objectif de cette manipulation est de préparer le blanc d'œuf de façon à ôter l'ovomucine, protéine responsable de la viscosité du blanc d'œuf, pour que notre blanc d'œuf puisse être chargé sur la résine de chromatographie tout en évitant son colmatage. La manipulation se passera sur 2 jours pour que le pH ait le temps de se stabiliser car le blanc d'œuf agit comme un tampon et toute modification du pH est rendue difficile.

#### **Méthode**

Il faut utiliser 10 œufs frais du commerce. (*Note : la quantité de blanc d'œuf a été calculée pour 250 ml de résine.*) Puis séparer le blanc du jaune manuellement. On doit récupérer environ 330 ml de blanc d'œuf. Ensuite diluer le blanc d'œuf avec 2 volumes d'eau distillée. Il se forme un précipité blanc gélatineux (Ovomucine). Effectuer une agitation afin que le mélange soit homogène car dans le blanc d'œuf, il y a deux types de viscosité. Ensuite ajuster le pH de la solution à pH 6,0 avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 1M sous agitation. Conserver au réfrigérateur (4°C) pour la nuit. Le lendemain centrifuger la solution à 2000×g pendant 3 minutes à 4°C. Et récupérer le surnageant délicatement tout en éliminant le précipité (Ovomucine). Puis ajuster le blanc d'œuf à pH 8,2 avec du NaOH 5M (pH nécessaire pour une bonne fixation de l'ovalbumine sur la résine de chromatographie). Et enfin centrifuger la solution 25 000×g pendant 20 min à 4°C. Après la centrifugation il faut limiter au maximum les mouvements brusques car les protéines d'œuf à l'interface protéines-air coagulent, et ainsi forment des lignes d'agrégats blanc. Donc il faut limiter les mouvements et les échanges avec l'air et récupérer délicatement le surnageant. Enfin vérifier le pH réajuster si nécessaire. Le surnageant est prêt à être chargé sur la colonne de chromatographie.

### **2.2.4 Chromatographie par paliers**

L'objectif de la manipulation est de séparer l'ovalbumine des autres composants (les autres protéines principalement voir figure 3). Nous avons une résine à échangeuse d'anions (charge -). Donc une résine chargée positivement avec des ramifications portant des **groupements**  $-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2N^+(CH_3)_3$ . Le but étant de charger négativement les protéines en fonction de leur pHi ce qui permettra leur fixation par interaction électrostatique avec les groupements chargés positivement de la résine (une charge positive + une charge négative).

### Méthode :

Comme pour le conditionnement la manipulation consiste en l'injection de différentes solutions mais cette fois ci en attendant des conditions précises. La chromatographie est à faire avec un détecteur UV à 280 nm (Cycle aromatique) permettant la bonne acquisition des conditions de passage à une étape suivante. Le protocole est synthétisé sous forme de tableau ci-dessous (tableau 2).

Tableau 2 Paramètre Chromatographie par paliers

Produit	Voie A (Eau)	Voie B (NaCl ou NaOH)	Voie D (Échantillon)	Débit total (ml/min)	Commentaire / note
Eau distillée	10 à 30 ml/min	0	0	10 à 30	
B.O.D.	0	0	10 à 30 ml/min	10 à 30	Ne jamais utiliser de fritter à l'entrée du tuyau, sinon les protéines sont cisailées et il y aura des bulles.
Eau distillée	10 à 20 ml/min	0	0	10 à 20	Jusqu'à atteindre quasi 0 Absorbance
NaCl 1M	96,5%	3,5%	/	10 à 30	Attendre un pic large mais peu intense, 3A. puis attendre quasiment 0 absorbance
NaCl 1M	86,0%	14,0%	/	25	Collecte de l'ovalbumine.
NaCl 1M	0,0%	100,0%	/	25	Collecte de l'ovalbumine moins pure
Eau distillée	100,0%	0,0%	/	20	Système sans la colonne --> rinçage des pompes, tubulures et de la cellule de détection UV.
Eau distillée			100%	100	Purge de la voie D à l'eau distillée.

### **2.2.5 Dialyse**

L'objectif de la manipulation est de retirer le NaCl de notre solution de protéines. Nous utiliserons des boudins de membrane avec des pores de 6 à 8 kDa (kilo dalton) d'une longueur de 12 cm (pour 40 mL).

La manipulation consiste à faire tremper dans un bain d'eau distillée nos fractions, un phénomène d'osmose se met en place : l'eau migre du milieu le moins concentré vers le plus concentré et le sel du plus concentré au moins concentré. Pour une bonne dialyse il faut changer l'eau du bain de dialyse régulièrement pour recréer une différence de pression osmotique, tout en mesurant la conductivité pour évaluer la concentration restante en sel. Un rapport de volume minimal de 1/500 est obligatoire pour effectuer une bonne dialyse.

### **2.2.6 Dosage des protéines du blanc d'œuf par HPLC de partage en phase inverse sur colonne (C4)**

L'objectif de cette manipulation est d'analyser les fractions obtenues lors de la purification et de doser les protéines majoritaires du blanc d'œuf par chromatographie HPLC en phase inverse, ce qui permet de sélectionner les fractions à lyophiliser. Les protéines du blanc d'œuf sont séparées sur une colonne apolaire C4 vydac 214 TP (50 mm \* 4,6 mm). Les protéines les plus polaires (c'est-à-dire les plus hydrophiles) sont éluées en premier, tandis que les protéines fortement hydrophobes comme l'ovalbumine sortent en dernier.

#### **Méthode**

Dans un dosage en HPLC phase inverse on identifie les protéines en fonction de leur temps d'éluion donc nous effectuerons différents gradients d'éluion successifs comme synthétisé dans le tableau 3. Nous utiliserons deux tampons : tampon A = eau Milli-Q - acide trifluoroacétique (TFA) 0,0265% et tampon B = acétonitrile 100% - TFA 0,025%

*Tableau 3 Paramètre éluion HPLC*

Temps	Tampon A	Tampon B	Débit	
0 min.	95 %	5 %	0,8 ml/min.	} gradient 1
17 min.	30 %	70 %	0,8 ml/min.	
19 min.	30 %	70 %	0,8 ml/min.	
20 min.	95 %	5 %	0,8 ml/min.	} gradient 2
22 min.	95 %	5 %	0,8 ml/min.	
24 min.	30 %	70 %	0,8 ml/min.	
25 min.	95 %	5 %	0,8 ml/min.	} gradient 3
27 min.	30 %	70 %	0,8 ml/min.	
28 min.	95 %	5 %	0,8 ml/min.	
32 min.	95 %	5 %	0,8 ml/min.	

Les gradients 2 et 3 servent à rincer la colonne car l'ovalbumine est fortement hydrophobe à tendance à s'adsorber sur la colonne. La température de la colonne est réglée à 40°C (afin d'obtenir une bonne répétabilité des profils chromatographiques).

### 2.2.7 Lyophilisation

Pour conserver nos protéines dans la durée sous forme de poudre il est nécessaire de retirer l'eau par lyophilisation.

Nous avons utilisé un Lyophilisateur CIRP CS10 – 0,8 (figure 6). La lyophilisation consiste à extraire l'eau contenue dans les substances organiques ou minérales par interaction des techniques du vide et du froid. Le produit, préalablement congelé à basse température (tunnel de congélation à  $-25^{\circ}\text{C}$ ), est placé dans une enceinte sous vide. L'abaissement de la pression en dessous du point d'équilibre (point triple) sur la courbe de tension de vapeur de l'eau entraîne une sublimation de la glace, c'est-à-dire que l'eau à l'état de glace s'élimine sous forme de vapeur sans passer par l'état liquide. Le cycle prend en général 72H pour se compléter.



Figure 6 photo Lyophilisateur

### 2.2.8 Préparation d'étalons de protéine purifiées

L'objectif de cette manipulation est de resolubiliser des protéines et être capable de déterminer leur concentration avec la loi de Beer Lambert. Nous utiliserons les protéines pures suivantes en poudre : **Ovalbumine** (*Frac A Juillet 2019 Pasc H /JIAN*), **Ovotransferrine** (*Fab.cécil 4-5/10/07*), **Lysozyme** (*Dialysé janvier 2011 Pascaline*), **Flavoprotéine** (*Anna exp 2 16/06/2004*).

Nous voulons une concentration finale  $C_f = 5 \text{ g/L}$  avec un volume final  $V_f = 3 \text{ mL}$  (Nous partons de protéines en poudre). Nous vérifierons la concentration grâce à l'absorbance. Nous utiliserons un spectrophotomètre paramétré sur une longueur d'onde de  $280 \text{ nm}$  (correspondant à l'absorption par les cycles aromatiques) ainsi que des cuves en quartz qui n'absorbent pas en dessous de  $340 \text{ nm}$ .

## 2.2.9 Electrophorèse

Cette méthode consiste à séparer les protéines selon leur masse moléculaire, dans un but analytique. Ainsi, dans une fraction ou un mélange protéique, il est possible de visualiser les protéines constitutives de cette fraction.

Le gel de polyacrylamide (figure 7) constitue un tamis moléculaire. Dans un gel de type SDS-Page, les protéines ont une charge nette négative conférée par le SDS qui est un détergent anionique. Par conséquent, la plupart des protéines sont dénaturées elles ont des densités de charges négatives équivalentes qui, sous l'effet d'un champ électrique les entraînent à migrer toutes vers l'anode. Les protéines de hauts poids moléculaires seront situées vers le haut de gel alors que les petites protéines seront plutôt localisées en bas de gel.

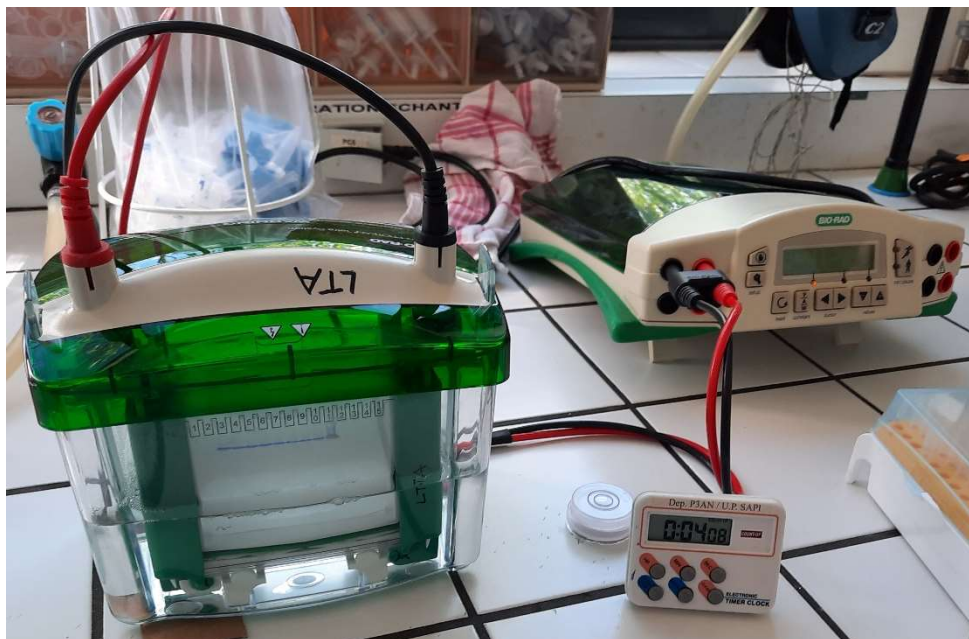


Figure 7 Photo Installation électrophorèse

### Méthode

- Préparations des échantillons

On vise 10  $\mu\text{g}$  à 100  $\mu\text{g}$  de protéines par puits donc il est préférable de procéder ainsi. Préparer une solution à 10 g/L de protéines en les diluant avec une solution de dénaturation (SDS avec un ratio minimum de 1 :1, conseillé 1 :4) pour déposer 15  $\mu\text{L}$  d'échantillon au final. Il est important si possible d'effectuer des dilutions intermédiaires avec de l'eau distillée pour économiser de la solution de dénaturation. Les échantillons sont ensuite chauffés à 95°C (bain à sec) pendant 3 minutes (afin d'accélérer la dénaturation des échantillons).

- Kit de poids moléculaires

Nous utiliserons le kit Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards comme marqueurs de taille (250-10 kDa). Utiliser 10  $\mu\text{L}$  par puits pour une coloration correcte au bleu de Coomassie Bio-Safe. Ne pas le faire bouillir.



- Dépôt des échantillons

Déposer entre 5 et 30  $\mu\text{l}$  d'échantillon (de préférence 15  $\mu\text{l}$ ) ; avec 30  $\mu\text{l}$  (capacité maximale du puits), il y a un risque de débordement dans le(s) puits voisin(s). De préférence, déposer la même quantité d'échantillon dans tous les puits. Bien repérer les dépôts (faire un plan de dépôt).

- Migration

La migration est réalisée avec une tension imposée : 200 V pendant 30 à 40 minutes.

- Fixation des protéines

Mettre le gel dans la solution de fixation (40% éthanol, 10% acide acétique) pendant 30 min.

- Coloration des protéines

Effectuer 4 rinçages de 5 min à l'eau distillée. Puis faire tremper le ou les gel(s) dans la solution de coloration Bio-Safe Coomassie Stain G250 pendant 1 nuit.

- Décoloration du fond de gel

Faire tremper les gels dans la solution de décoloration (éthanol 20%) pendant la nuit.

- Autre information

Si les échantillons sont riches en sels, alors cela change la résistance électrique des échantillons, et provoque une migration hétérogène.

### 3 Bilan des résultats acquis

Nous avons effectué un total de trois extractions d'ovalbumine. Les deux premières ont été effectuées avec ma tutrice Pascaline Hamon et la troisième extraction d'ovalbumine a été effectuée en autonomie.

#### 3.1.1 1<sup>er</sup> Extraction de l'ovalbumine

Lors de la première extraction nous avons eu un incident à l'injection du blanc d'œuf pour la chromatographie par palier. Le tuyau à cause des vibrations (Solution très visqueuse) de la pompe à sauter de son béccher, de l'air s'est alors introduit dans la colonne et elle s'est colmatée. Nous avons donc recommencé au conditionnement pour la deuxième extraction.

#### 3.1.2 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> Extraction de l'ovalbumine

Pour la deuxième extraction d'ovalbumine nous sommes partis de 280 ml de blanc d'œuf (10 œufs). Nous avons récupéré 27 fractions de 40 ml avec la chromatographie par paliers.

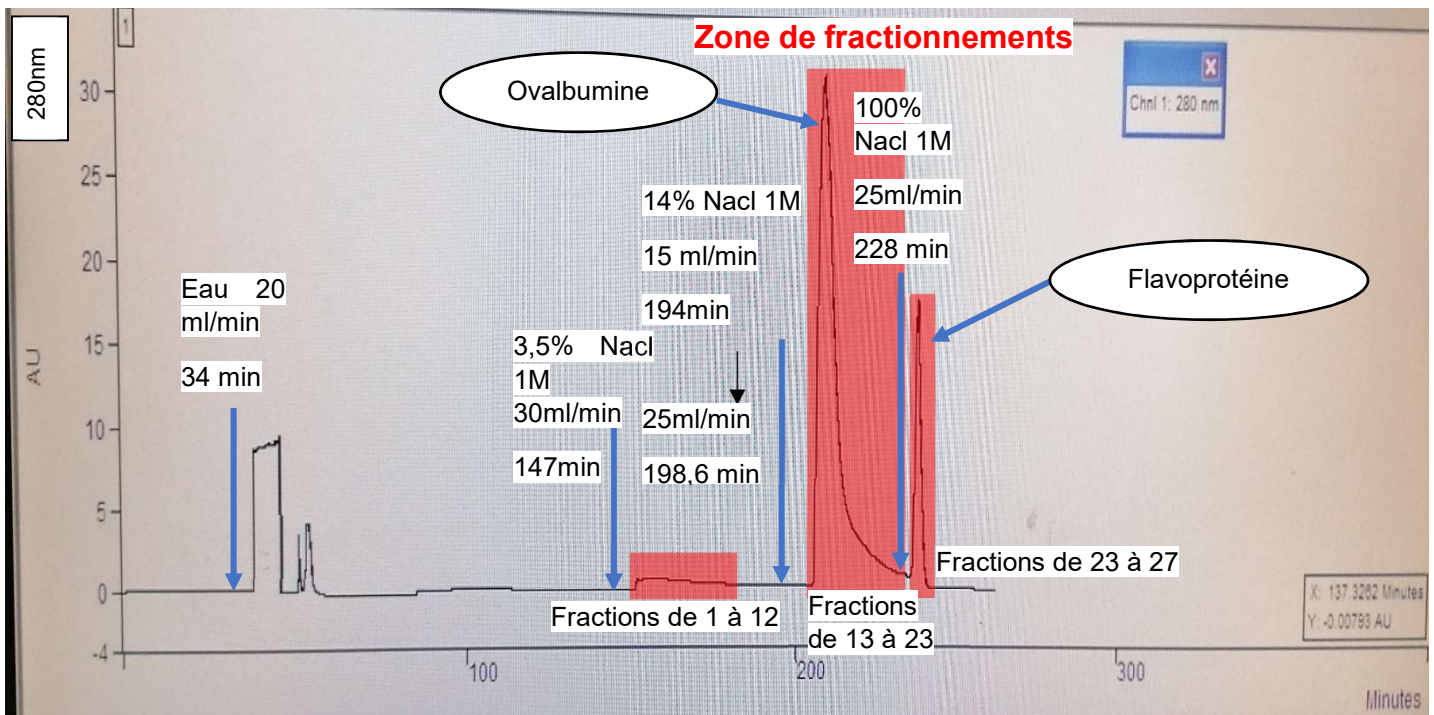


Figure 8 Graphique détecteur (280 nm) de la chromatographie par palier (extraction de protéines)

La figure 8, qui montre l'absorption à 280 nm de l'effluent en fonction du temps d'élution, permet d'observer le déroulement de la chromatographie par palier (2<sup>ème</sup> extraction de protéines). Ce dernier nous permet déjà de prévoir approximativement la composition de nos fractions. L'identification des pics est due à la connaissance empirique des extractions précédentes et aux connaissances sur la quantité de sel permettant d'éluer l'ovalbumine et la flavoprotéine (fixateur de la riboflavine, vitamine colorée en jaune) de notre colonne.

Pour la troisième extraction d'ovalbumine qui a été effectuée en autonomie, je suis parti de 335 mL de blanc d'œuf (10 œufs). Nous avons obtenu 16 fractions de 40 mL avec la chromatographie par paliers.

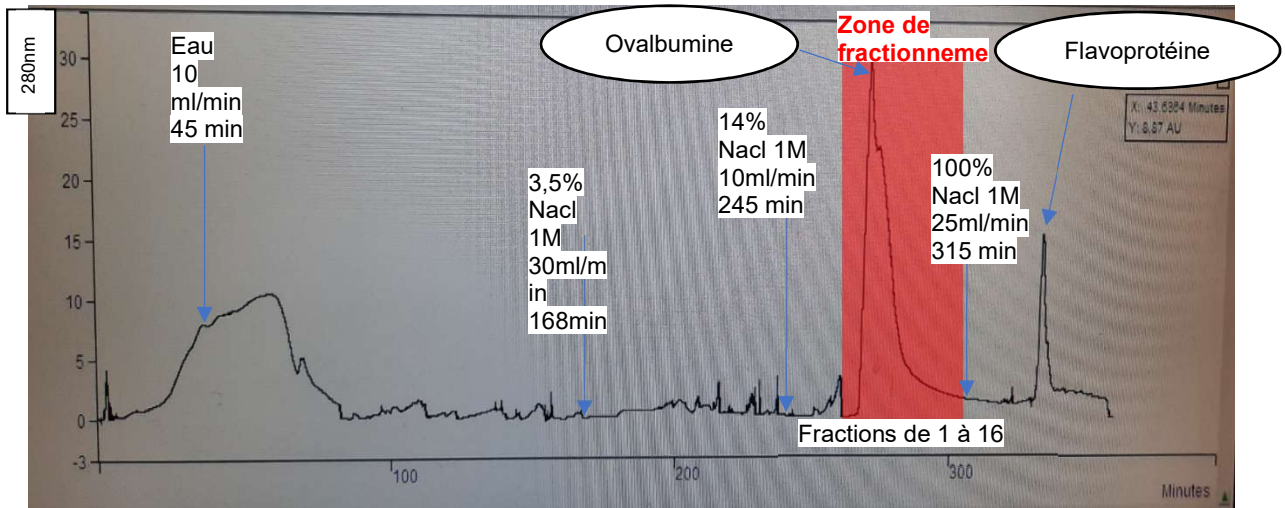


Figure 9 Chromatogramme (détection à 280 nm) de la chromatographie par palier (extraction de protéines)

Dans ce graphique (figure 9) nous pouvons observer le déroulement de la chromatographie par palier (extraction de protéines). Contrairement à la deuxième extraction d'ovalbumine j'ai fait le choix de prélever uniquement le pic d'ovalbumine.

Pour vérifier la composition de nos fractions nous avons effectué une analyse par HPLC en phase inverse.

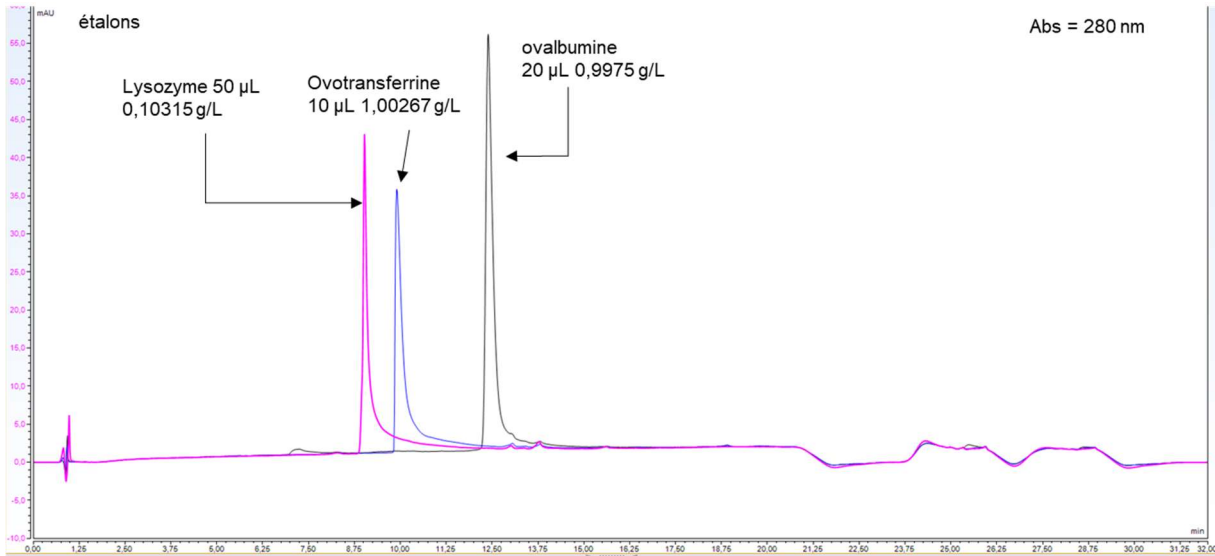


Figure 10 Graphique HPLC de nos étalons

La figure 10 illustre l'analyse séparée de plusieurs protéines pures, qui nous servent d'étalons pour identifier les protéines extraites de notre blanc d'œuf. Le Lysozyme, l'ovotransferrine ont été ajoutés dans l'étalon car même si elles ne sont pas l'objectif principal d'extraction nous avons convenu de les récupérer si elles étaient pures. L'ovalbumine qui est l'objectif d'extraction de ce stage figure ici en troisième pic

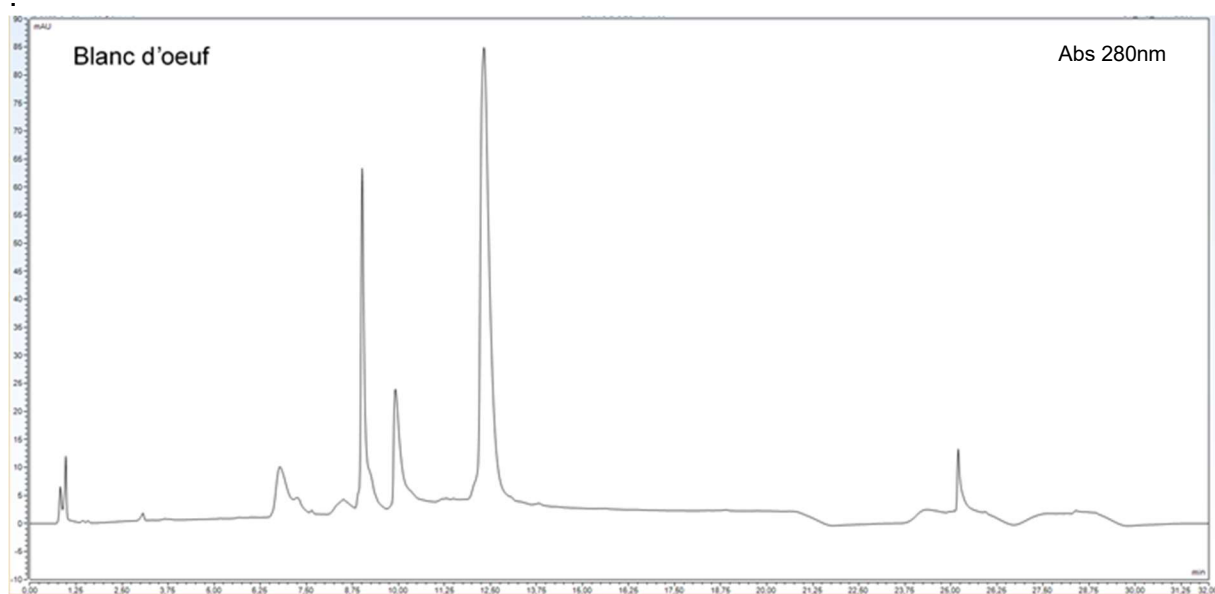


Figure 11 Graphique HPLC d'un Blanc d'œuf

Nous avons aussi analysé un blanc d'œuf (Figure 11) dilué au centième pour avoir une idée des protéines de départ avant purification. On repère d'ailleurs les trois pics principaux qui sont élués dans l'ordre suivant : lysozyme, ovotransferrine, ovalbumine.

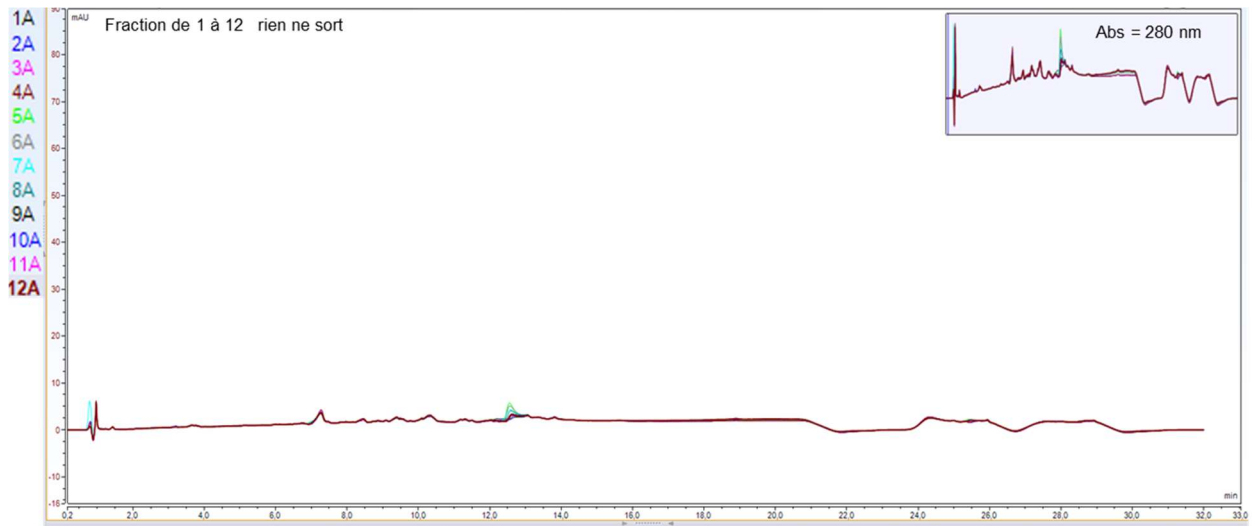


Figure 12 Graphique HPLC des fractions 1 à 12

Malheureusement sur les fractions 1 à 12 (figure 12) nous n'avons rien extrait de notable. Les fractions ne seront pas conservées.

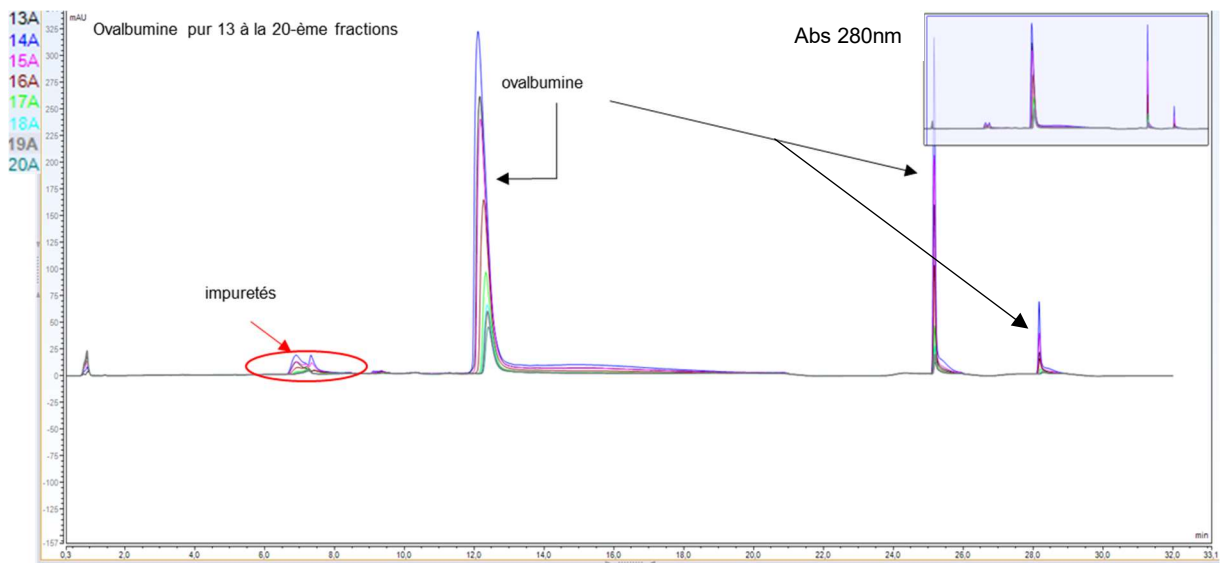


Figure 13 Graphique HPLC des fractions 13 à 20

Les fractions 13 à 20 (figure 13) sont les plus pures et les plus concentrées, la fraction 14 étant celle de premier choix. La pureté est jugée satisfaisante.

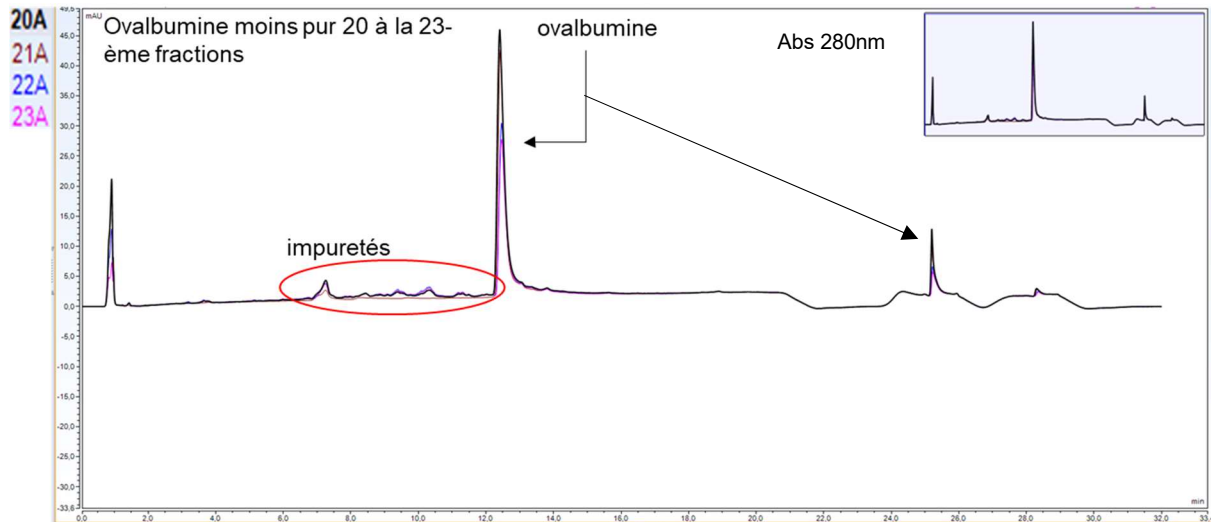


Figure 14 Graphique HPLC des fractions 20 à 23

Les fractions 20 à 23 (figure 14) sont peut concentrées en ovalbumine et comportent davantage d'impuretés mais peuvent quand même être utilisées pour des manipulations qui ne requièrent pas une très grande pureté (mise au point...)

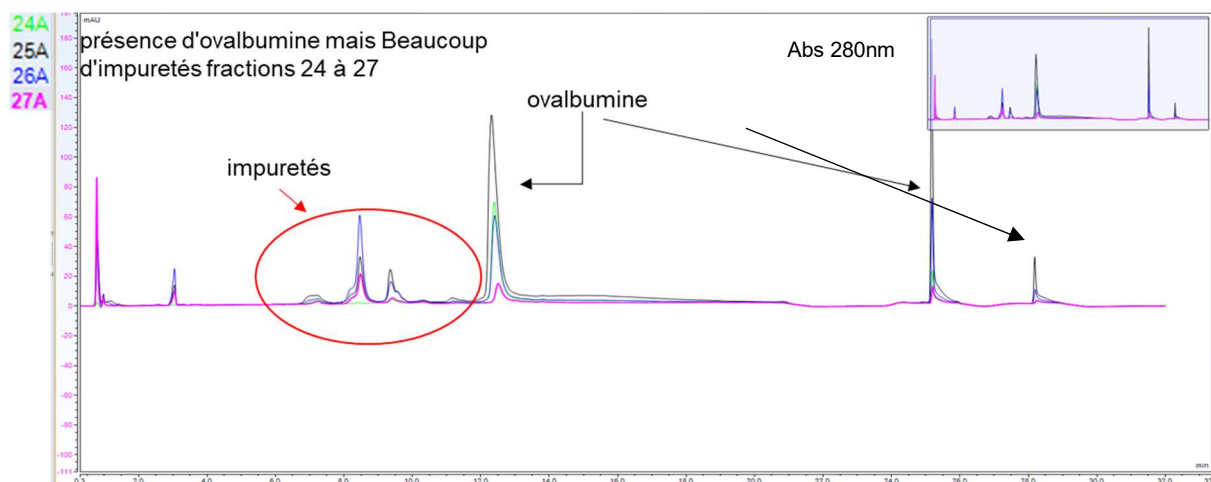


Figure 15 Graphique HPLC des fractions 24 à 27

Les fractions 24 à 27 (figure 15) sont les moins pures et ne seront pas gardées.

Comme pour la 2<sup>ème</sup> extraction d'ovalbumine, dans la 3<sup>ème</sup> extraction nous vérifions la composition de nos fractions avec une HPLC en phase inverse à 280 nm :

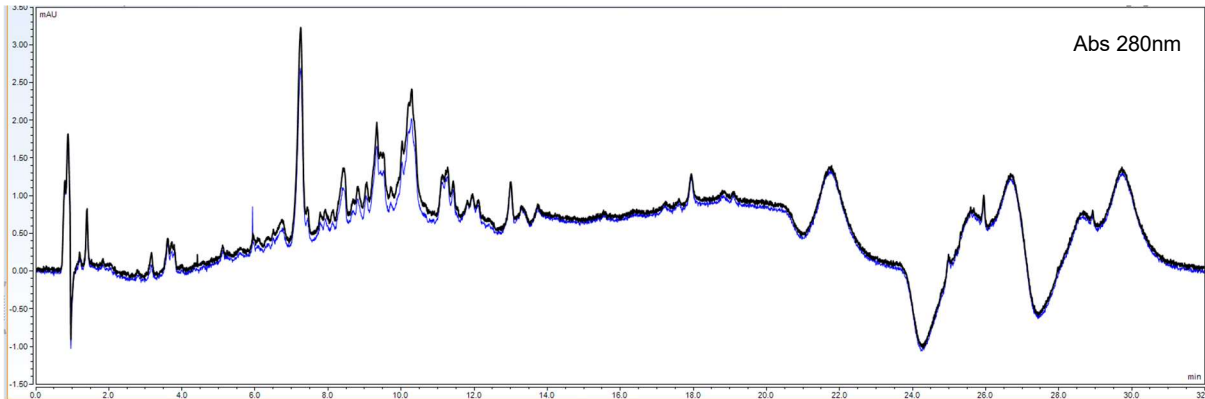


Figure 16 Graphique HPLC des fractions 1 et 2

Ici dans les fractions 1 et 2 (figure 16) nous n'avons rien qui sort si ce n'est des impuretés : elles ne seront donc pas conservées.

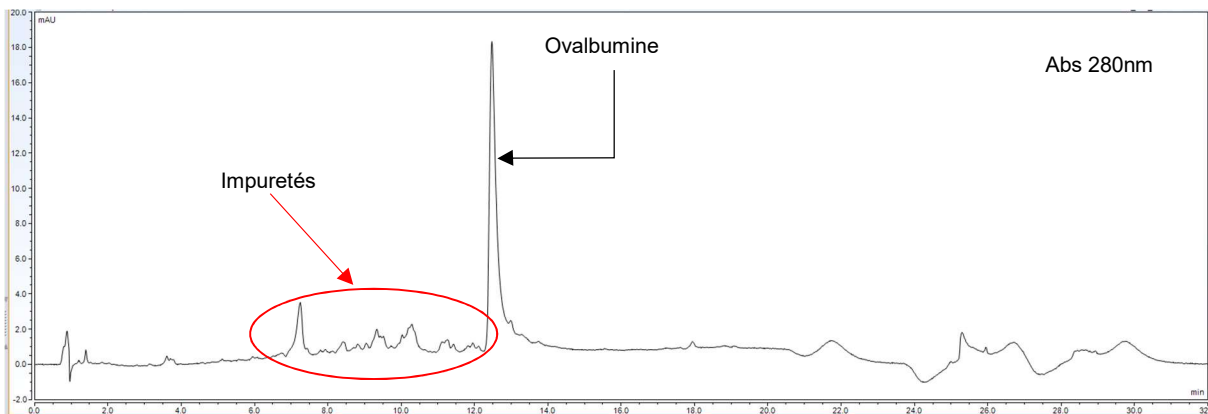


Figure 17 Graphique HPLC de la fraction 3

Notre fraction 3 (figure 17) contient peu d'ovalbumine et beaucoup d'impuretés mais elle est tout de même gardée car elle peut servir pour des manipulations test.

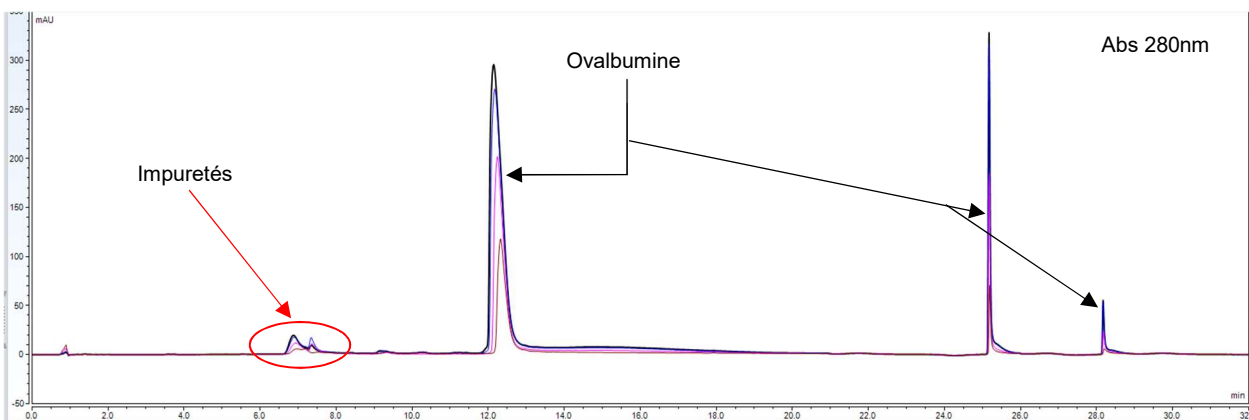


Figure 18 Graphique HPLC des fractions 4 à 7

Les fractions 4 à 7 (figure 18) sont les fractions les plus pures et les plus concentrées en ovalbumine. La fraction 4 étant celle de premier choix. Elles seront donc

lyophilisées. Nous n'avons pas le reste des fractions car la colonne HPLC s'est bouchée.

Cependant pour compléter l'identification de la composition de nos fractions qui n'a pas pu être fini avec l'HPLC de la 3<sup>ème</sup> extraction nous avons fait une électrophorèse. Nous avons déposé dans notre gel de polyacrylamide les solutions suivantes : les étalons sont : Blanc d'œuf (BO), marqueur de taille (M), Ovalbumine (OVAL), Lysozyme (LYSO), Ovotransferrine (OVOT), Flavoprotéine (FLAV). Ainsi que nos fractions 3 à 16, la 1 et 2 ayant été éliminées.

On remarque tout de suite figure 19 qu'il y a de l'ovalbumine (rouge).

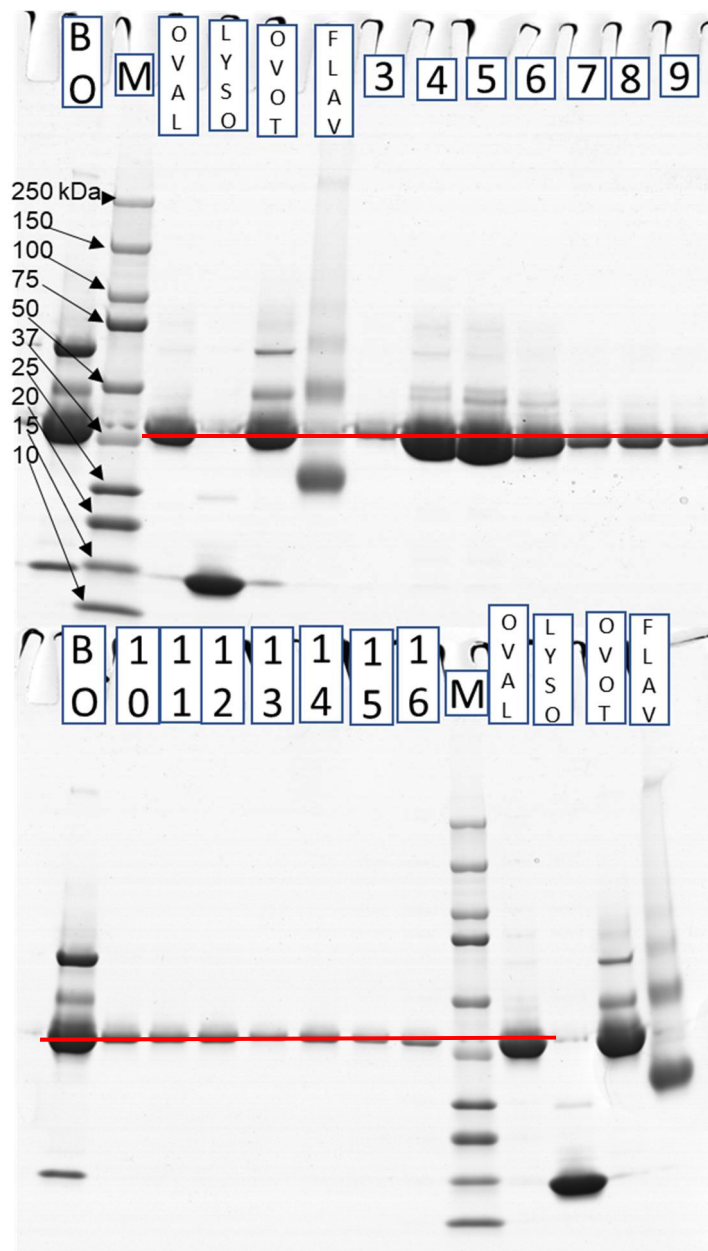


Figure 19 Photo électrophorèse



Avant de lancer la lyophilisation des fractions issues de la 2<sup>ème</sup> extraction nous avons effectué la dialyse de nos 27 fractions. Nous avons tracé pour les dialyses de chaque extraction deux graphiques sur la conductivité : un en fonction du temps (heures cumulées) et un en fonction du volume (Litres cumulés). La dialyse a été effectuée avec des renouvellements de bains de cinq litres d'eau distillée.

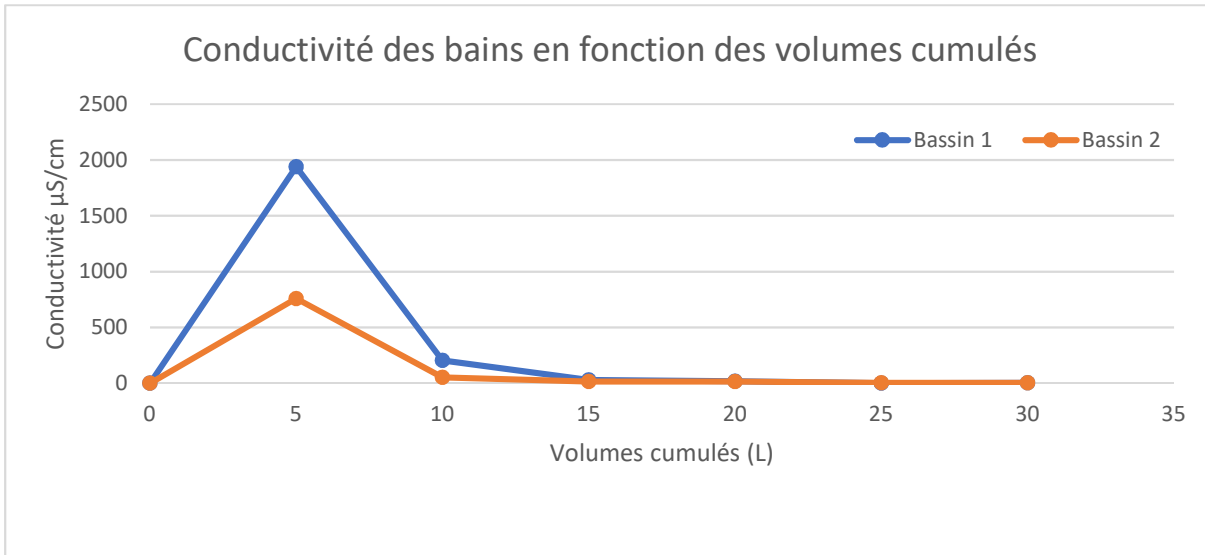


Figure 20 Graphique dialyse Ovalbumine conductivité/ L cumulés

Le bain 1 contient 14 boudins de 40 ml et le bain 2 contient 13 boudins de 40 ml.

Sur la figure 20, nous avons calculé un rapport de dilution total au 1/1 000 000. Il est donc plus efficace de dialyser dans plusieurs petits volumes car pour obtenir le même rapport de dilution avec un seul volume il aurait fallu avoir un bassin de 500 000 L.

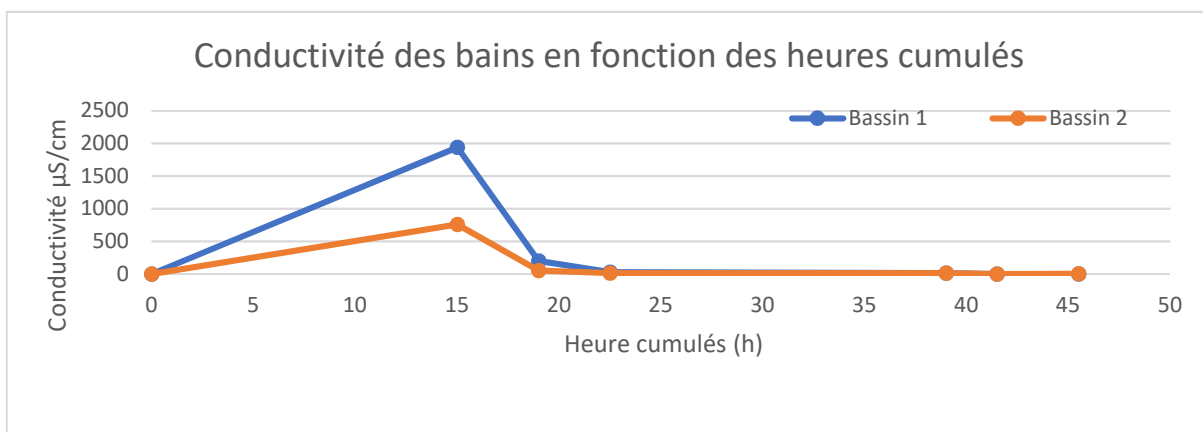


Figure 21 Graphique dialyse Ovalbumine conductivité/heure cumulés

Nous remarquons ici (figure 21) que dès les dix-neuf premières heures, la grande majorité du sel a été éliminée. Les changements de bain suivants ne retirent que peu de sel, ils sont tout de même effectués pour maximiser l'élimination du sel.

Les résultats de dialyse de la 3<sup>ème</sup> extraction sont assez similaires à la 2<sup>ème</sup> extraction d'ovalbumine :

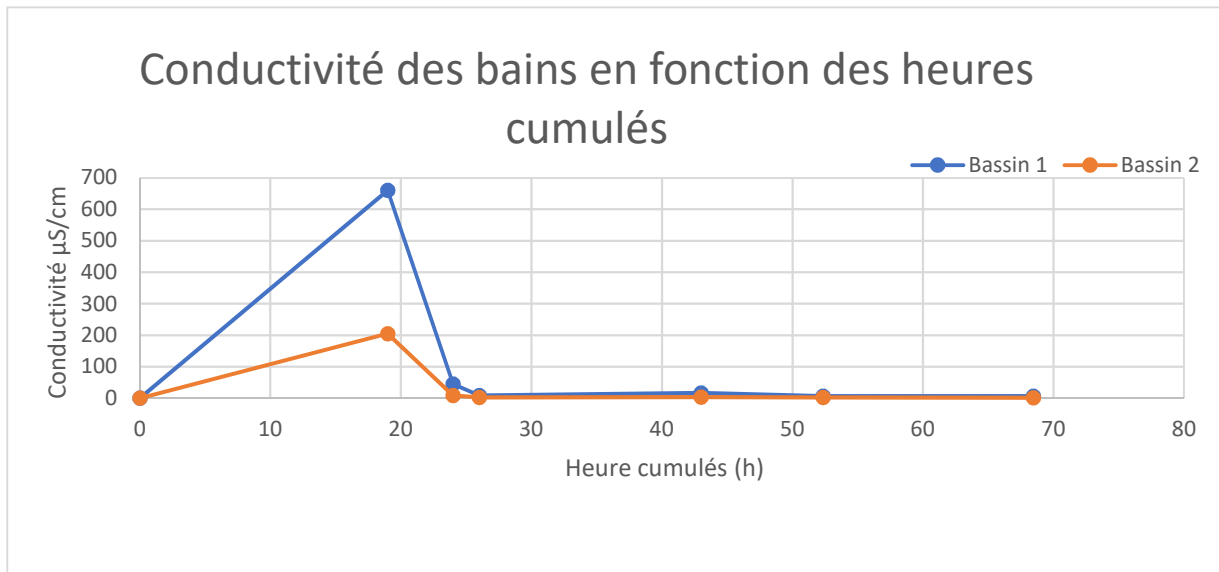


Figure 22 Graphique dialyse Ovalbumine conductivité/heure cumulés

Nous remarquons ici (figure 22) que dès les vingt-quatre premières heures que la grande majorité du sel a été éliminée. Le bain 1 contient 10 boudins de 40 ml et le bain 2 contient 6 boudins de 40 ml.

Sur ce graphique (figure 23) nous calculons que nous avons obtenu un rapport de dilution total au 1/3 714 700. Pour obtenir le même rapport de dilution avec un seul volume il aurait fallu avoir un bassin de 1 485 880 L.

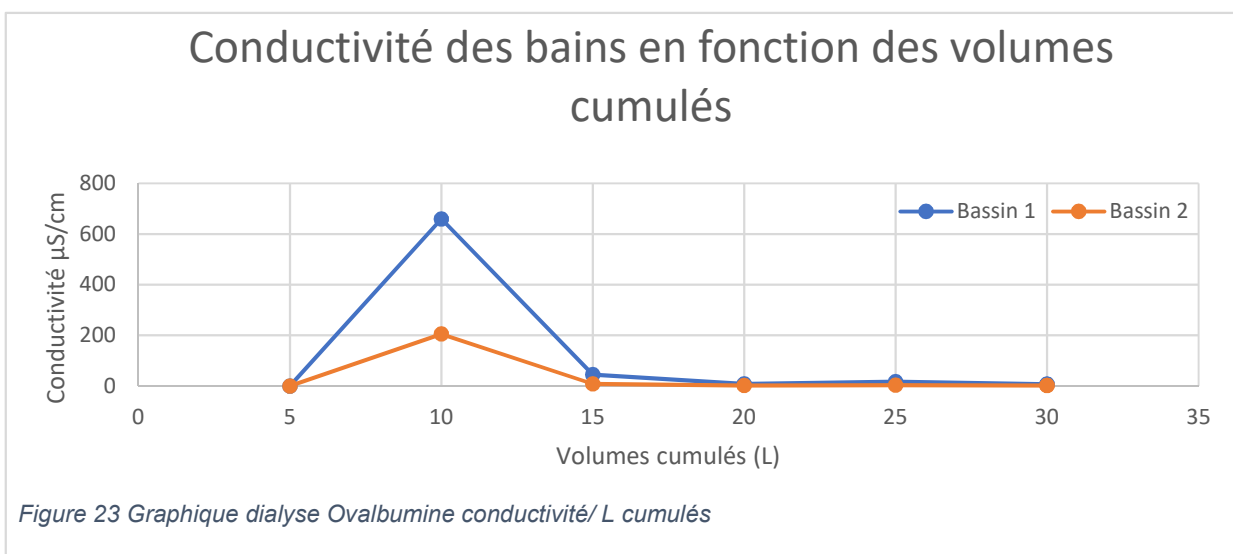


Figure 23 Graphique dialyse Ovalbumine conductivité/ L cumulés

Nous avons ensuite effectué la lyophilisation.

Par souci de disponibilité des appareils et du temps de préparation d'échantillons, la lyophilisation a été effectuée avant la fin de l'HPLC, ce qui fait que nous avons lyophilisé toutes nos fractions. Cependant, les fractions 1 à 12 ont été éliminées car il n'y avait pas d'ovalbumine.

Tableau 4 Résultat lyophilisation avec la Pureté (HPLC) 2ème extraction

N° fraction	Lyophilisat (g)	Pureté%
13	1,4023	92
14	1,5123	92,36
15	0,6633	91,19
16	0,8819	90,2
17	0,6165	88,81
18	0,3436	90,65
19	0,3469	88,91
20	0,2589	89,62
21	0,2065	93,42
22	0,2084	80,42
23	0,2048	80,43
24	0,2181	87,65
25	1,4423	78,12
26	0,9341	54,89
27	0,1474	47,81

Nous obtenons non pas une poudre mais des paillettes extrêmement peu denses. Au final nous obtenons 6,9 g d'ovalbumine, plus ou moins pure (>80%) selon les fractions sur les 22.7 g théoriques attendus (2.27 g d'ovalbumine par œuf).

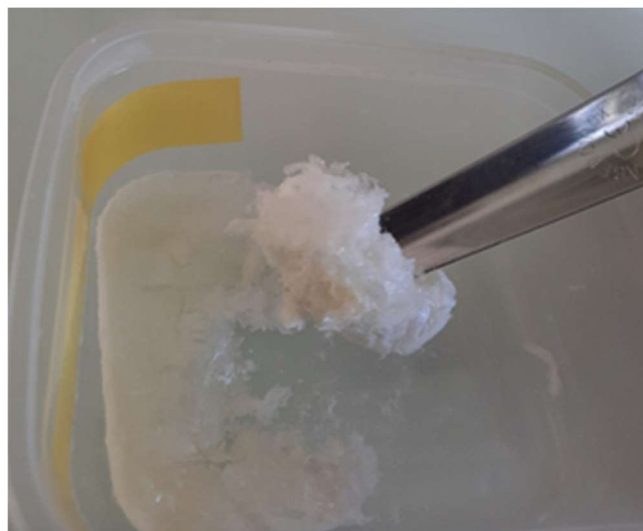


Figure 24 photo Lyophilisa sous forme de paillettes

Pour la 3<sup>ème</sup> extraction, nous avons décidé d'éliminer les fractions 1 et 2 car elles ne comportaient pas de protéine lors de leur analyse à l'HPLC.

Tableau 5 Résultat lyophilisation avec la Pureté (HPLC) 3<sup>ème</sup> extraction

N° fraction	Lyophilisat (g)	Pureté % HPLC
3	0,1586	57,43
4	2,1102	92,62
5		90,81
6	1,2743	91,61
7		90,55
8	0,5848	/
9	0,4191	/
10	0,3135	/
11	0,2669	/
12	0,2033	/
13	0,1829	/
14	0,1582	/
15	0,1351	/
16	0,1431	/

Au final nous obtenons 7,5 g d'ovalbumine plus au moins pure (>80%) en fonction des fractions sur les 22.7 g théoriques attendus. Comme vu précédemment il nous manque la pureté d'un grand nombre d'échantillons à cause de l'incident avec la colonne HPLC.

## 4 Bilan personnel

Pour commencer, mon stage a été une expérience d'apprentissage enrichissante. Durant la période j'ai pu mettre en application une grande partie de mes connaissances acquises lors de mon diplôme Universitaire de technologie. J'ai pu appliquer mes connaissances de calcul et d'équation de laboratoire (Concentration, Beer Lambert, Dilution...).

Avant le début du stage, je me suis posé des questions sur la mission qui allait m'être confiée par rapport à mes compétences acquises. Mais ensuite, après quelques jours je me suis rendu compte que ce que j'avais appris pendant mon DUT me permettait d'accomplir les tâches confiées.

Cette aisance m'a permis d'être force de proposition lors des préparations sur notre projet.

J'ai consolidé mes connaissances techniques en physicochimie comme L'HPLC, la chromatographie d'échange d'anions, l'électrophorèse. L'utilisation des équipements de laboratoire m'a permis de compléter mon savoir sur les différentes utilisations.

Je me suis facilement intégré au personnel du laboratoire qui a été bienveillant à mon égard. Chacun a su partager avec moi leurs différents projets de recherche, que ce soit des projets de stagiaire bac +2 aux recherches en cours menées par des doctorants et /ou docteurs.

Ce stage aura été pour moi une expérience exceptionnelle qui m'aura permis de vivre quelques semaines en laboratoire, d'y voir l'organisation générale, et surtout d'acquérir en autonomie.

Je remercie personnellement toute l'équipe du STLO et particulièrement les tutrices et tuteurs : Hamon Pascaline, Pezennec Stéphane, LeChevalier Valérie, Le Floch-Fouéré Cécile ; qui sans leur bienveillance et leur aide n'auraient pu me permettre de mener à bien ce stage.

## 5 Discussion

Pour un œuf de 60 g on retient 2,27 g d'ovalbumine. Lors de notre 2<sup>ème</sup> purification à 80% de pureté minimum nous obtenons  $(6,9/22,7) \% = 30\%$  de rendement alors que pour la 3<sup>ème</sup> purification à 80% de pureté minimum nous obtenons  $(7,5/22,7) \% = 33\%$ . Si on compare avec la publication de (Croguennec et al 2000) à une pureté stricte de 80% il obtenait 27% dans des conditions similaires. On peut dire que nous avons effectué une meilleure purification. Mais la comparaison de nos rendements avec cette publication est à prendre avec précaution car dans cette publication le rendement ne prend pas en compte les fractions de pureté supérieure à 80%. Dans le présent rapport, notre rendement prend en compte les fractions supérieure ou égale à 80%. Dans une autre publication (Pezennec et al 2000) les auteurs ont obtenu pour un œuf 0,5 g d'ovalbumine à une pureté supérieur à 90%. Ce qui nous donne un rendement de  $(0,5/2,27) \% = 22 \%$ .

Ceci illustre le compromis entre pureté et rendement. On retient que la méthode diffère entre chaque expérience. Cependant si on compare le rendement de 22.03% avec mes deux rendements l'écart est bien plus grand 8,19%-11,01%. C'est un exemple clair de choix de pureté par rapport à la quantité de protéines gardées. Nous avons fait le choix pour nos 2 purification réussite de garder les factions avec un minimum de 80% de pureté en ovalbumine pour en avoir une quantité plus importante.

Nous avons eu dans le conditionnement de notre résine, lors du changement de pH (neutre vers basique) la résine qui avait tendance à se gazer. L'hypothèse est que le changement de pH entraine une rétractation de la résine et l'entrée d'air dans la colonne. Aucune solution n'a été trouvée.

Nous avons aussi rencontré quelques difficultés avec l'isopropanol. Toujours lors du conditionnement, nous avons eu un problème de gazage, causé par l'isopropanol, au contact de l'eau libère des gaz dissouts, nous avons donc effectué un dégazage sous vide avec un gradient de concentration lors de l'injection. Cette solution a permis de ne pas gazer notre résine lors de cette étape.

Nous avons aussi essayé de trouver une solution générale au problème du gazage de notre colonne. Dans un premier temps nous avons placé la sortie tuyau de la colonne en hauteur par rapport à la colonne entière. Cela semble avoir un effet positif sur le dégazage et/ou remplissage de la colonne. Et voulant une solution plus efficace, nous avons bouché temporairement la sortie de colonne mais il y a un risque de surpression, mais avec un effet garanti et efficace pour dégazage et/ou remplissage colonne. Nous avons atteint 120 PSI la limite étant à 140 PSI.

## 6 Références

- Abou Dalle 2021-2022, IUT Saint-Brieuc, Spectrométrie ; Technique séparatives.
- Castillo 2021-2022, IUT Saint-Brieuc, Génétique.
- Croguennec. T, Nau. F, Pezennec. S, Brule. G, 2000. Simple Rapid Procedure for Preparation of Large Quantities of Ovalbumin. (J. Afric. Food Chem. 2000, 48, 4883-4889)
- Itavi d'après IEC, MEG, SSP, Prodcum, Douanes en 2018
- Lakowicz, J.R., ed. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy (Boston, MA, Springer, États-Unis)
- Nys. Y, Structure et composition global de l'œuf, Chapitre 5, P 162, Lavoisier, Science et technologie de l'œuf, volume 1 Production et qualité, Nau. F, Guérin-Dubiard. C, Baron. F, Thapon. JL

## 7 Résumé

J'ai effectué mon stage de fin d'études de mon DUT Génie Biologique Option Industrie agroalimentaire au sein du laboratoire INRAE à Rennes dans l'unité STLO. Lors de ce stage de 11 semaines, j'ai mis en pratique mes connaissances acquises durant ma formation, tout en étant confronté à la rigueur du monde de la recherche.

Il m'a été confié de purifier de l'ovalbumine, une protéine majoritaire du blanc d'œuf qui est un bon modèle d'étude dans la recherche pour ses propriétés physicochimiques et nutritionnelles. J'ai reçu une formation très complète sur l'équipement de laboratoire que j'ai utilisé.

Ce stage a été une expérience professionnelle très enrichissante pour moi, il m'a fait découvrir le domaine de la recherche. Ce stage m'a donné la chance de participer directement aux projets de recherche en cours en fournissant de l'ovalbumine purifiée. J'ai découvert les enjeux économiques autour de l'utilisation des protéines du lait et de l'œuf.

Cet apprentissage de courte durée m'a permis de conforter mon choix de travailler dans le domaine de l'agroalimentaire. En effet même si je ne continue pas mes études, dans un objectif de rester dans la recherche, je me dirige dans une certaine continuité vers une professionnalisation dans l'agroalimentaire en management production.

## 8 Liste mot Clés :

Œuf, Protéine, Purification, Chromatographie ionique, HPLC, Electrophorèse