



UMRt BioEcoAgro

Institut Charles Viollette

Université de Lille, Lille, France

École doctorale Sciences de la Matière, du
Rayonnement et de l'Environnement

Département des sciences des aliments

Institut sur la Nutrition et les Aliments
Fonctionnels

Université Laval, Québec, Canada

Faculté des études supérieures et
postdoctorales

THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR

De l'Université de Lille en Biotechnologies, Agroalimentaires,

Sciences De l'Aliment, Physiologie

Et de l'Université Laval en Sciences des Aliments

Mise en œuvre de procédés membranaires pour la séparation
sélective de la nisine à partir de surnageants de cultures complexes

Thèse préparée et soutenue publiquement par Alexandre Rulence le 12 Juillet

2023

Mme Loubna FIRDAOUS	Maître de conférences - HDR, Université de Lille	Directrice de thèse
M. Ismail FLISS	Professeur, Université Laval	Directeur de thèse
M. Laurent BAZINET	Professeur, Université Laval	Co-directeur de thèse
M. Denis GROLEAU	Professeur, Université de Sherbrooke	Rapporteur
M. Romain KAPEL	Professeur, Université de Lorraine	Président Rapporteur
Mme Gisèle LAPOINTE	Professeure, Université de Guelph	Examinatrice
M. Pascal DHULSTER	Professeur associé, Université de Nîmes	Membre invité

Résumé

La nisine, une bactériocine produite par les bactéries lactiques du genre *Lactococcus* présente des propriétés physico-chimiques d'intérêt tel qu'une thermorésistance ainsi qu'une activité antimicrobienne contre certaines souches pathogènes alimentaires. Elle est actuellement la seule bactériocine reconnue comme GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA (U.S. Food and Drug Administration) et donc la seule bactériocine pouvant être utilisée comme conservateur naturel en agroalimentaire. La nisine représente donc une alternative d'intérêt à l'utilisation de conservateurs chimiques. Cependant, la nisine est actuellement sous-exploitée du fait de problèmes liés à sa production et sa purification à grande échelle. En effet, les bactéries lactiques nécessitant des milieux riches et complexes rendent la production par fermentation coûteuse et peu rentable. De même, sa purification à l'échelle industrielle ne se fait actuellement que par des procédés à faible rendement tels que le foisonnement ou la précipitation aux sels couplés à des techniques chromatographiques.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes donc d'abord intéressés à la recherche de co-produits pour la fermentation de *Lactococcus lactis* en tant qu'alternative à l'utilisation des milieux riches comme le MRS. Le lactosérum est actuellement le principal co-produit usuellement employé. La recherche de co-produits de grade alimentaire pour la production efficace et à faibles coûts de la nisine par fermentation pourrait répondre au problème actuel de rendement de la production. Différents hydrolysats de protéines issus de co-produits végétaux et de poissons ont été testés dans la production de la biomasse bactérienne et de la nisine à l'aide de deux souches productrices afin d'optimiser la production de nisine. Ces résultats ont permis de montrer une meilleure production avec la souche *L.lactis* UL719 en comparaison avec une souche commerciale. Ils ont aussi permis de montrer l'efficacité de certaines sources de peptones végétales et d'une peptone de poisson dans la production de nisine en comparaison avec le lactosérum et le milieu MRS. Durant ce travail, des alternatives à la purification de la nisine ont aussi été étudiées. Pour cela, des procédés d'électrodialyse (ED) et d'ultrafiltration (UF) ont été appliqués à la purification de la nisine. Une première étude de la purification par électrodialyse, non reportée dans la littérature pour la purification de la nisine, a été mise en place pour la purification d'une solution commerciale, mettant en évidence des phénomènes d'interaction de la nisine avec les membranes échangeuse d'ions. L'application de l'ED pour la purification de la nisine a aussi été mise en place sur le traitement d'un surnageant de culture complexe

produit des suites des études de la production. L'utilisation du procédé d'ultrafiltration a aussi été étudiée pour la purification de la nisine à partir d'un surnagent de culture complexe, mettant en parallèle les résultats issus des deux types de procédés membranaires. Ces études ont donc permis de démontrer l'efficacité de l'UF et de l'ED dans la purification de la nisine, l'ED qui de plus pourrait s'inscrire dans une démarche écocirculaire, de la production de la nisine à l'aide de co-produits, à sa purification par le traitement des effluents salins issus de la précipitation aux sels de la nisine lors de sa purification.

Abstract

Nisin, a bacteriocin produced by lactic acid bacteria (LAB) presents physicochemical properties such as thermal resistance and antimicrobial activity against food pathogens bacteria. Nisin is actually the only bacteriocin labelled as Generally Recognized As Safe (GRAS) by the U.S Food and Drug Administration (FDA) and is thus the only bacteriocin used as a natural preservative in the food industry, making it an interesting alternative to the use of chemical preservatives. However, its uses are hampered at industrial scale due to low yields and high costs linked to its production using commercial broths. Moreover, its purification implies several separation techniques characterised with low yields such as salting out and chromatographic techniques making nisin further less competitive on the food preservatives market.

In this case, we investigated in this work the use of food grade by-products from the food industry in place of expensive commercial broths. Several by-products composed of vegetal and fish peptones were tested for the production of nisin alongside whey permeate since whey is commonly employed for production of nisin and several bacteriocins. Therefore, we tested and compared different vegetal and fish proteins hydrolyzates regarding biomass production and nisin yields. Moreover, two different strains of *Lactococcus lactis* were tested in order to optimize nisin production. Results showed a greater nisin production using *L.lactis* UL 719 strain when compared to a commercial strain. Results also showed the efficiency of some vegetal and one fish by-product as broth for the production of nisin when compared to whey medium and commercial broth MRS. During this work, we also investigated alternatives for nisin purification. Ultrafiltration (UF) and electrodialysis (ED) were studied for nisin purification since no literature reported such application of ED and UF for nisin purification. ED was applied to the purification of nisin from a commercial solution and from a nisin cell-free supernatant produced with whey permeate. UF was applied to the purification of nisin from a cell-free supernatant. This enabled to assess UF and ED, and compare two different membranes techniques, for this application. During this work, phenomenon of nisin interactions with ion exchange membranes, never reported in the literature, were proposed and enabled ED nisin purification with a purification factor comparable to those obtained with the conventional methods actually used. Moreover, an eco-circularity framework was proposed for nisin purification with ED coupled with salts precipitation, from nisin production using by-products, to its purification with ED and recycling of salts.

Valorisations scientifiques

Publications

RULENCE A., PERREAULT V., THIBODEAU J., FIRDAOUS L., FLISS I., BAZINET L., One step purification of active nisin from a commercial product by electro dialysis and elucidation of nisin cation exchange membrane fouling mechanism, accepté et publié dans Chemical Engineering Science (27 Juillet 2023).

Communications orales

RULENCE A., FLISS I., FIRDAOUS L., BAZINET L., Séparation de la nisine par électrodialyse à partir d'une solution commerciale et de surnageants de culture. Congrès SFGP, 07-10 Novembre 2022, Toulouse, France.

Communications par affiche

RULENCE A., BAZINET L., FLISS, I., FIRDAOUS., L. Combined salt precipitation and ultrafiltration for nisin purification. Bacteriocin International Conference - BIC 2023, 19-21 Juin 2023, Lille, France.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iv
Table des matières	vi
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations	xiii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	4
1. Introduction.....	5
1.1. Généralité sur les bactériocines	5
1.2 La nisine.....	7
1.2.1 Structure et propriétés physico-chimiques.....	7
1.2.2 Propriétés antimicrobiennes et mode d'action	9
1.2.3 Toxicité	11
1.3 Contexte scientifique et industriel de l'utilisation de la nisine	12
2 Production de la nisine.....	12
2.1 Facteurs influençant la production de la nisine	12
2.1.1. Influence du milieu de culture.....	12
2.2 Approches pour améliorer la production de la nisine	16
2.2.1 Souches productrices de nisine	16
2.2.2 Optimisation des conditions de culture.....	16
3. Purification de la nisine	21
3.1 Techniques de purification de la nisine	21
3.1.1 Concentration	21
3.1.2. Purification	22
4. Application de la nisine	26
4.1 Utilisation de la nisine comme conservateur alimentaire.....	26
4.2 Autres applications de la nisine	28
5. Procédés membranaires	29
5.1 Ultrafiltration.....	29
5.2 Électrodialyse	29
5.3. Phénomènes limitants : concentration de polarisation, colmatage et densité de courant limite	31
Chapitre II : Matériel et Méthodes	33
1. Réactifs, matières premières, souches bactériennes et milieux de culture	34

1.1. Réactifs	34
1.2. Souches bactériennes	34
1.3. Milieux de fermentation	34
1.3.1. Milieu de culture.....	34
1.3.2. Co-produits :	35
2. Protocole de production.....	36
2.1. Préparation des milieux de cultures	36
2.2. Conditions de fermentation pour comparaison des différents co-produits	36
2.3. Production de la nisine sur un milieu à base de perméat de lactosérum	37
3. Procédés de séparation et de purification de la nisine	37
3.1. Purification de la nisine par centrifugations successives	38
3.2. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	38
3.2.1. Détermination de la saturation en sels de sulfate d'ammonium.....	39
3.2.2. Production de fractions prépurifiées par précipitation au sulfate d'ammonium	39
3.3. Séparation de la nisine par électrodialyse (ED)	39
3.3.1. Équipement d'électrodialyse.....	39
3.3.2. Purification d'une solution commerciale de nisine	40
3.3.3. Purification par ED d'un surnageant de culture complexe	41
3.4. Séparation par ultrafiltration.....	42
3.4.1. Équipement d'ultrafiltration.....	42
3.4.2. Détermination de la pression de travail	43
3.4.3. Séparation à partir d'un surnageant de culture complexe.....	43
4. Analyses	44
4.1. Analyses globales	44
4.1.1. Mesure de la biomasse bactérienne.....	44
4.1.2. Quantification en protéines	45
4.1.3. Activités antimicrobiennes.....	45
4.1.4. Détermination de l'activité spécifique	46
4.2. Analyses liées aux protocoles d'électrodialyse.....	46
4.2.1. Caractérisation des membranes échangeuses d'ions	46
4.2.2. Mesure de la conductivité	47
4.2.3. Analyses par UPLC-MS	47
4.3. Analyses liées aux protocoles d'ultrafiltration	48
4.3.1. Caractérisation des flux de perméat des membranes	48
4.3.2. Caractérisation de l'efficacité du lavage et de l'indice de colmatage	49
4.3.3. Caractérisation de la résistance en série	49
Chapitre III : Production de la nisine à l'aide de co-produits.....	51
1. Introduction	52
2. Résultats et discussion.....	52

2.1. Détermination de l'apport en co-produit.....	52
2.2. Comparaison des co-produits pour la production de la nisine.....	53
2.2.1. Production de biomasse.....	53
2.2.2. Mesure de l'activité antimicrobienne	54
3. Conclusion	58
Chapitre IV : Séparation de la nisine par électrodialyse – Étude de sa purification à partir d'une solution commerciale.....	60
1. Introduction	61
2. Purification par électrodialyse.....	61
2.1. Test préliminaire de déminéralisation et phénomène de colmatage induit.....	61
2.1.1 Évolution du taux de déminéralisation, du pH et de l'activité antimicrobienne	61
2.1.2. Caractérisation des membranes échangeuses d'ions (MEI).....	63
2.1.3. Courbe de courant-voltage.....	63
2.1.4. Mécanisme de colmatage de la nisine avec les membranes échangeuses de cations (MEC).....	65
2.2. Déminéralisation par ED avec contrôle de pH.....	69
2.2.1. Évolution du taux de déminéralisation, du pH et de l'activité antimicrobienne	69
2.2.2. Caractérisation des MEI.....	70
3. Comparaison de la purification de la nisine par ED et par centrifugations successives.....	70
3.1. Taux de déminéralisation.....	70
3.2. Activité antimicrobienne totale	71
3.4. Analyses UPLC-MS	76
4. Conclusion.....	78
Chapitre V : Purification de la nisine à partir d'un surnageant complexe de culture par électrodialyse.....	80
1. Introduction	81
2. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	81
3. Purification de la nisine après précipitation par ED.....	83
3.1. Taux de déminéralisation et évolution de l'activité antimicrobienne.....	83
3.2. Caractérisation des MEI.....	85
4. Purification par ED de la nisine.....	86
5. Conclusion	90
Chapitre VI : Purification de la nisine à partir d'un surnageant de culture complexe par ultrafiltration	93
1. Introduction	94
3. Evolution des flux de perméat	95
2.1.1. Perméabilité à l'eau de la membrane d'ultrafiltration	95

2.1.2. Flux de perméat en mode recirculation totale.....	96
.....	96
2.1.3. Flux de perméat en mode concentration	96
.....	99
2.2. Caractérisation du colmatage des membranes	100
2.2.1. Efficacité du nettoyage et indice de colmatage	100
2.2.2. Modèle de résistance en série	101
2.3. Caractérisation de la purification des CFS	103
2.3.1. Bilans matières	103
2.3.2. Facteur de purification et rendement en activité de nisine.....	106
3. Conclusion.....	109
Conclusion générale et perspectives	111
Bibliographie.....	115

Liste des figures

• Chapitre 1

Figure 1.1 : Représentation schématique des deux formes de nisine A et Z. Abu acide Aminobutyrique ; Ala-S-Ala lanthionine, Abu-S-Ala β -méthyllanthionine ; DHB déhydrobutyrine. On différencie aussi 5 boucles intramoléculaires dans la nisine allant de A à E. Nomenclature des acides aminés particuliers selon Jung et al [17] 9

Figure 1.2 : Modèle représentant la formation du pore par interaction de la nisine avec les lipides II de la membrane de la cellule cible. (1) La nisine se lie à la partie glucidique du lipide II via son extrémité Nter (2). L'extrémité Cter de la nisine permet ensuite la translocation à travers la membrane. Plusieurs complexes nisine/lipide II sont nécessaires pour la formation du pore. Schéma adapté selon Wiedemann et al., (2001) et McAuliffe et al (2001) [20], [21] et réalisé sur BioRender..... 10

Figure 1.3 : Schéma d'un module d'électrodialyse à membranes échangeuses d'ions. MEC : membrane échange de cation, MEA : membrane échangeuse d'anion. C+ : cation, A- : anion..... 30

• Chapitre 2

Figure 2.1: Démarche mise en place pour la purification de la nisine selon les différentes techniques étudiées..... 37

Figure 2.2: Organigramme de la purification de la nisine par centrifugations successives de la solution commerciale de nisine 38

Figure 2.3 : Schéma du pilote d'électrodialyse utilisé pour le protocole. CEM : membrane échangeuse de cations ; AEM : membrane échangeuse d'anion 40

Figure 2.4 : Organigramme des protocoles mis en place pour la séparation de la nisine par ED et par centrifugations successives. 41

Figure 2.5: Organigramme de la purification de la nisine à partir d'un CFS par ED avec étape de précipitation au sulfate d'ammonium 42

Figure 2.6: Schéma de l'équipement d'ultrafiltration..... 42

Figure 2.7 : Organigramme des protocoles mis en place pour la séparation de la nisine par ultrafiltration avec ou sans étape de précipitation au sulfate d'ammonium. 44

• Chapitre 3

Figure 3.1 : Quantification de la biomasse produite après fermentation sur co-produits par mesure de la masse sèche cellulaire (CDW) en $g.L^{-1}$ 53

Figure 3.1 : Quantification de la biomasse produite après fermentation sur co-produits par mesure de la masse sèche cellulaire (CDW) en $g.L^{-1}$ 54

Figure 3.2 : Activités antimicrobiennes issues de la fermentation des deux souches *L.lactis* UL 719 (a) et *L.lactis* ATCC 11454 (b) sur les différents co-produits testés sur la souche sensible *L.innocua* CIP 80.11. 55

Figure 3.3: Activités antimicrobiennes issues de la fermentation des deux souches *L.lactis* UL 719 (a) et *L.lactis* ATCC 11454 (b) sur les différents co-produits testés sur la souche sensible *L.ivanovii* HPB 28. 56

• Chapitre 4

Figure 4.1: Évolutions des paramètres durant la purification par ED de la solution commerciale de nisine (a) évolution du pH pendant le procédé de déminéralisation à 10V. (●) représente le pH de la solution de nisine commerciale et (○) le pH de la solution de KCl. (b) Évolution de l'activité antimicrobienne de la nisine pendant le procédé d'ED. 62

Figure 4.2 : Courant limite avant et après traitement de la solution de nisine commerciale. (○) courant limite avant déminéralisation ; (●) courant limite après 45min de déminéralisation. Le trait bleu représente le moment où la valeur de 10 V est atteinte pendant le test de courant limite. 65

Figure 4.3 : Représentation de l'interaction de la nisine avec la MEC pendant la déminéralisation de la solution de nisine. Les différents états de charge de la nisine durant l'ED sont illustrés selon l'évolution du pH ainsi que de l'évolution de l'intensité de

courant durant le procédé. (a) La Nisine⁺ migre vers la cathode. (b) La Nisine⁺ interagit avec les charges fixes anioniques de la MEC. (c) La dissociation de l'eau se produit au niveau de la couche limite de la MEC avec accumulation de la Nisine⁺ sur la surface de la membrane. (d) Les ions OH⁻ migrent dans la solution de nisine commerciale quand les ions H⁺ migrent au travers de la MEC dans la solution de KCl. Le pH de la solution de nisine augmente, menant à la perte de la charge positive de la nisine (Nisine[°]). (e) La Nisine[°] se désorbe de la MEC. (f) Évolution du pH et de l'intensité de courant (A) durant le procédé d'ED. 68

Figure 4.4 : Évolution des différents paramètres lors de la déminéralisation (a) évolution du taux de déminéralisation de la solution de nisine commerciale, (b) du pH de la solution de nisine et de KCl et (c) de l'activité antimicrobienne de la solution de nisine. (●) Solution commerciale de nisine et (○) solution de KCl. 69

• Chapitre 5

Figure 5.1 : Évolution de (a) la conductivité de la solution de nisine et de KCl, (b) du pH de la solution de nisine et de KCl et (c) l'activité antimicrobienne de la solution de nisine. Ces paramètres ont été mesurés jusqu'à atteindre 95% de taux de déminéralisation de la solution de nisine. (●) solution de nisine et (○) solution de KCl..... 85

Figure 5.2 : Aire sous pic de la nisine déterminée par UPLC sur le CFS initial, après précipitation au sel et après ED. Le pic de nisine a été confirmé par spectrométrie de masse en accord avec la masse moléculaire rapportée de la nisine de 3 500 Da..... 88

Figure 5.3 : Concept d'écocircularité pour la production et la purification de la nisine par ED et le traitement des effluents salins. 92

• Chapitre 6

Figure 6.1: Flux de perméat à l'eau des membranes d'ultrafiltration à différentes PTM à 20°C 95

Figure 6.2 : Flux de perméat du surnageant de culture mis en recirculation à sur différentes PTM de 1 à 5 bars à 20°C. Le plateau observé à partir de 3 bars permet de déterminer une PTM de travail de 2 bar (<80% à la PTM limite). 96

Figure 6.3 : Évolution des flux de perméat moyens lors de la première étape de concentration des surnageants de cultures complexes en fonction du FRV. (●) Avec étape de précipitation au sulfate d'ammonium ; (○) Sans étape de précipitation au sulfate d'ammonium. 98

Figure 6.4 : Évolution des flux de perméat moyens lors de la deuxième étape de diafiltration des surnageants de cultures complexes en fonction du FRV. (●) Avec étape de précipitation au sulfate d'ammonium ; (○) Sans étape de précipitation au sulfate d'ammonium. 99

Figure 6.5 : Contributions des différents colmatages à la résistance globale du colmatage. Rrev : colmatage réversible ; Rirr, colmatage irréversible. 103

Liste des tableaux

• Chapitre 1

Tableau 1.1: Classification des bactériocines des BL selon Klaenhammer et al [16] et complété selon Cleveland et al [26] et Drider et Rebuffat [8]..... 7

Tableau 1.2 : Différents co-produits issus de l'industrie agroalimentaire pour la production de bactériocines. 19

Tableau 1.3 : Comparaison de différentes techniques employées dans la purification de la nisine. 25

Tableau 1.4 : Principaux exemples d'utilisation de la nisine en agroalimentaire et autres applications non alimentaires..... 28

• Chapitre 2

Tableau 2.1 : Composition (% base sèche) en azote et en carbone des différents co-produits et extraits de levure utilisés pour la composition des milieux de culture..... 35

Tableau 2.2: Propriétés et caractéristiques de la membrane HyStream TangenX utilisée en ultrafiltration 43

• Chapitre 3

Tableau 3.1 : Supplémentation des milieux de culture en fonction du milieu commercial MRS 53

• Chapitre 4

Tableau 4.1 : Épaisseur et conductivité des MEI avant et après le test de déminéralisation par ED..... 63

Tableau 4.2 : Caractérisation des MEI avant et après ED avec contrôle de pH à 3,8. 70

Tableau 4.3 : Activité antimicrobienne et teneur en protéine de la solution de nisine commerciale après procédés d'ED et de centrifugation successive 75

Tableau 4.4 : Détermination de l'aire sous pic de la nisine par UPLC-MS dans les échantillons lyophilisés après ED et centrifugation, sur une même base poudre (1% p/V). 77

• Chapitre 5

Tableau 5.1 : Paramètres mesurés après précipitation au sulfate d'ammonium du CFS. La détermination de la teneur en protéine et de l'activité antimicrobienne a permis la caractérisation du taux de purification et du rendement en activité protéique de la nisine. 82

Tableau 5.2 : Mesure de l'épaisseur et la conductivité des membranes avant et après électrodialyse..... 86

Tableau 5.3 : Paramètres mesurés sur le CFS initial, après précipitation au sulfate d'ammonium et après ED. 86

Tableau 5.4 : Comparaison des différentes techniques utilisées dans la purification de la nisine avec facteur de purification et rendement en activité de nisine..... 89

• Chapitre 6

Tableau 6.1 : Caractéristiques des deux solutions de nisine traitées par ultrafiltration. 94

Tableau 6.2 : Perméabilité à l'eau des membranes avant et après traitement et nettoyage, indice de colmatage et efficacité de nettoyage. 100

Tableau 6.3 : Résistances déterminées durant l'ultrafiltration des surnageants de culture avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium 102

Tableau 6.4 : Bilan de matières des protéines et de la matière sèche entre les différentes fractions issues de l'ultrafiltration des solutions avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium, détermine selon Équation 13. 105

Tableau 6.5 : Paramètres de la purification de la nisine par ultrafiltration avec mesures de la teneur en protéine et de l'activité antimicrobienne pour la détermination de l'activité spécifique, du facteur de purification et du rendement en activité. 108

Liste des abréviations

AA : Acide aminé

AU : Unité Arbitraire

BL : bactérie lactique

CFS : surnageant sans cellule ou « cell-free supernatant »

DCL : Densité de courant limite

ED : Électrodialyse

EN : Efficacité du nettoyage

FRV : Facteur de réduction volumique

GRAS : Generally Recognized As Safe

IC : Indice de colmatage

MEA : membrane échangeuse d'anions

MEC : membrane échangeuse de cations

MEI : membrane échangeuse d'ions

P1, P2 : Perméat 1 et 2

PTM : Pression transmembranaire

R1, R2 : Rétentat 1 et 2

UF : Ultrafiltration

UPLC-MS : Ultra Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

Remerciements

Je souhaiterais exprimer ici mes sincères remerciements ainsi que ma gratitude envers toutes les personnes que j'ai pu rencontrer durant mes années de thèse, que nous nous soyons rencontrés à Lille où à Québec. Voyager entre Lille et Québec et vous rencontrer m'aura permis d'évoluer personnellement et m'aura apporté tant d'expérience.

Je tiens tout d'abord exprimer ma gratitude envers mes directeurs de thèse Loubna Firdaous et Ismail Fliss ainsi que mon co-directeur de thèse Laurent Bazinet, grâce à qui j'ai pu travailler sur mon projet de thèse. Merci de m'avoir permis de poursuivre ce projet de thèse entre nos deux institutions, merci de votre soutien et de votre disponibilité.

Je souhaite aussi remercier respectueusement M. Romain Kapel ainsi que M. Denis Groleau d'avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit de thèse, ainsi que Mme Gisèle Lapointe d'avoir accepté le rôle d'examineur dans mon jury de thèse. Merci aussi à Pascal Dhulster d'avoir accepté de faire parti de mon jury en tant que membre invité.

J'aimerais exprimer ma gratitude envers Jacinthe Thibodeau ainsi que Véronique Perreault, professionnelles de recherche de l'équipe de Laurent pour leur précieuse aide durant mes travaux, leur disponibilité constante et surtout leur bonne humeur. J'aimerais également chaleureusement remercier Hélène Gaudreau, professionnelle de recherche dans l'équipe de Ismail. Merci de m'avoir accueilli au laboratoire lorsque je suis arrivé à Québec, mais surtout merci de ta gentillesse et de ta grande disponibilité tout au long de ma présence à l'Université Laval.

Durant ma thèse, j'ai aussi pu avoir l'opportunité de bénéficier du statut d'ATER pour lequel j'ai pu donner des enseignements à l'IUT de Lille. J'aimerais donc remercier Bertrand Fertin pour son aide précieuse et sa disponibilité lors de ces enseignements.

J'adresse aussi mes remerciements à Mathieu Carpentier d'avoir fait partie de mon jury lors de mes CSI, mais surtout de m'avoir aidé dans mes derniers travaux en me permettant d'accéder à son laboratoire.

Mes séjours entre la France et le Québec m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes que j'aimerais remercier ici en espérant n'oublier personne.

J'aimerais d'abord exprimer ma reconnaissance à Adrien Forestier, ancien ingénieur de recherche à l'Institut Charles Viollette ; sans ton aide j'aurais été totalement perdu au début de ma thèse. J'aimerais aussi remercier tous ceux que j'ai rencontré à l'ICV : Max, Hélorie, Barbara, Carlos, Jihen, Fatima, Montassar, Florian, Océane et à tous ceux que j'oublie. Merci d'avoir rendu mon retour en France plus sympa.

Mon séjour à Québec m'a aussi permis d'avoir la chance de rencontrer des personnes sans qui mon séjour n'aurait pas été pareil. Je pense particulièrement à Tristan (Trimu !), faire le tour de la Gaspésie en 3 jours aura été la meilleure des mauvaises idées, à Éva et Gilles (merci pour toutes ces soirées jeux de société), à Marie-Ève, ma québécoise préférée (autoproclamée mais que je ne saurais contre dire), à Éléa,, et à Élodie, ma GF, ma partenaire de balades nocturnes et de resto (tout ça me manque !). Passer tous ces moments avec vous m'aura fait passer une de mes meilleures années avec tant de souvenirs. J'espère vous exprimer ici toute ma reconnaissance pour votre soutien, notre rencontre et notre amitié. J'espère vous revoir tantôt.

Je pense aussi à ceux avec qui j'ai pu passer du temps à Québec. Merci notamment à Aude (voyager au Sagueney avec toi et grâce à toi aura été un de mes meilleurs souvenirs à Québec), à Doriane et à Maël sans qui mon arrivée à Québec ne se serait pas si bien passée. Je pense aussi à Adèle et Aurélien, merci de votre sympathie et de ces moments passés ensemble.

Je ne pourrais pas ne pas remercier Alexis Spalletta. J'aimerais profiter de ce paragraphe pour te remercier d'être mon ami depuis tout ce temps. Merci d'être toujours présent, même lorsque j'étais au Canada.

Je voudrais finir plus personnellement par remercier mes parents, ma grand-mère, mes frères et ma sœur pour leur soutien tout au long de ce parcours et durant mes voyages.

Introduction

La perte de denrées alimentaires est un sujet d'inquiétude de plus en plus important dans le monde. Il est estimé que chaque année, un tiers de la production alimentaire globale est jetée en tant que déchet [1]. La contamination bactérienne des aliments et notamment des produits laitiers représente une des causes principales de cette perte alimentaire : elle représente par exemple 25% des pertes des produits laitiers aux États-Unis chaque année [2]. La sécurité alimentaire et leur mode de conservation sont donc un sujet d'intérêt de plus en plus important chez les industriels et les consommateurs. Les différentes méthodes de traitements thermiques couramment utilisées comme la pasteurisation permettent l'inactivation des enzymes ainsi que des formes végétatives des microorganismes (bactéries, moisissures, levures). Cependant, malgré ces traitements, la présence de bactéries thermorésistantes représente toujours un problème nécessitant une veille constante. La stérilisation permet de pallier ce problème de bactéries résistantes et de spores toujours présentes, mais n'est pas compatible avec tous les produits du fait des réactions de brunissement des aliments ainsi que de la dégradation des protéines et des vitamines contenues [3]. L'utilisation de conservateurs chimiques devient alors une solution, mais elle est cependant de plus en plus décriée du fait de leurs effets secondaires comme l'apparition d'allergies [4,5], ou l'utilisation de sels de nitrate liée à l'apparition de cancer, lorsque consommé en trop grande quantité [6].

De ce fait la recherche de molécules antimicrobiennes d'origine naturelle ou naturellement présentes dans certains produits se développe de façon importante depuis plusieurs années [7]. Les peptides antimicrobiens (AMP) sont des petits peptides impliqués dans la défense de leur hôte agissant contre bactéries, virus et champignons. Ces AMP sont retrouvées chez différentes espèces incluant les bactéries, les insectes, les plantes ainsi que certains vertébrés. Ils représentent donc une grande famille hétérogène de molécules partageant certaines spécificités communes, dont leur petite taille moléculaire (20-50 aa), leur charge cationique ainsi que leur propriété amphiphile et hydrophobe. Dans les cas des AMP produits par les bactéries, ceux-ci sont alors dénommés bactériocines [8,9].

La recherche et le développement de l'utilisation des bactériocines sont donc devenus un sujet d'étude important. L'utilisation des bactériocines et de leur souche productrice en complément ou en remplacement des techniques de traitement thermique et

chimique peut permettre d'éviter la contamination des produits par les bactéries pathogènes tout en évitant l'altération de leurs qualités organoleptiques, permettant aussi d'envisager d'augmenter leur durée de conservation ainsi que de maintenir leurs propriétés nutritionnelles.

La nisine représente une des bactériocines les plus importantes, découverte et utilisée depuis plusieurs décennies maintenant, elle présente un grand intérêt dans l'industrie alimentaire, la nisine étant la seule bactériocine reconnue comme antimicrobien naturel par la FDA (Generally Recognized As Safe) ou encore par l'Union européenne sous le sigle E234 [10]. La nisine est donc employée actuellement comme conservateur naturel dans l'alimentation. Son utilisation est cependant limitée actuellement du fait de problèmes liés à sa production et sa purification. La production de la nisine est notamment limitée par un faible rendement de production, ainsi que des coûts élevés du fait de l'utilisation de milieux riches et complexes [11]. Sa purification est limitée, elle, par l'utilisation de techniques à faibles rendements et difficilement extrapolables à grande échelle. Ces problématiques s'illustrent parfaitement par les différents produits de nisine retrouvés actuellement dans le commerce, ne contenant que de 0,5 à 5% de nisine [12].

Dans ce contexte, cette thèse s'est intéressée à la production de la nisine par la recherche de milieux de cultures alternatifs afin de pallier l'utilisation de milieu coûteux. Elle s'est ensuite intéressée à la purification de la nisine à l'aide de procédés membranaires que sont l'ultrafiltration et l'électrodialyse afin de démontrer leur efficacité dans un schéma de purification de la nisine. Pour cela, ce projet de thèse s'est axé autour de trois objectifs distincts : (1) la recherche et l'utilisation de co-produits issus de l'industrie agroalimentaire en tant que milieux alternatifs pour la production de la nisine ;(2) purification de la nisine par électrodialyse et (3) purification de la nisine par ultrafiltration.

Le premier chapitre s'attèle à introduire et décrire les bactériocines et la nisine, leurs principaux intérêts et applications, afin de mieux comprendre le contexte et les enjeux liés à la nisine. Ce chapitre permettra de poser les problématiques de cette étude liées à la production et la purification de la nisine. Le deuxième chapitre introduit le matériel et les méthodes employés pour répondre aux problématiques et objectifs posés. Le troisième chapitre développe la recherche de milieux de cultures alternatifs pour la production de la nisine par l'étude de sa production sur différents co-produits issus de l'industrie agroalimentaire. Le quatrième chapitre introduit l'utilisation de l'électrodialyse dans la purification de la nisine à partir d'une solution commerciale afin d'évaluer la

faisabilité de séparation de la nisine par ce procédé. Le cinquième chapitre s'est donc par la suite intéressé à l'application de l'électrodialyse pour la purification de la nisine après fermentation et pré-purification par précipitation au sulfate d'ammonium. Enfin le dernier chapitre a permis d'étudier la purification de la nisine par ultrafiltration avec et sans précipitation au sel et ainsi comparer l'efficacité des deux procédés. Cette thèse se terminera sur une conclusion générale des différents travaux menés durant ce projet ainsi que sur les perspectives qui en découlent.

Ce projet de thèse s'est déroulé au sein l'Institut Charles Viollette de l'UMRt BioEcoAgro à l'Université de Lille en France et à l'Université Laval au sein du département des Sciences des Aliments à Québec. Ce travail a pu être réalisé grâce au support financier de la région Hauts de France, que je remercie, lors de mon séjour en France. J'aimerais aussi remercier le LIAAN d'avoir financé mon déplacement à Québec dans le cadre de ma soutenance de thèse.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Introduction

Ce chapitre 1 expose la synthèse bibliographique liée au sujet d'étude de ce projet de thèse. Ce chapitre exposera notamment les bactériocines dans leur généralité afin de mieux comprendre la famille des molécules dont est issue la nisine, puis d'introduire les spécificités de la nisine en matière de propriétés physico-chimiques faisant de la nisine une molécule d'intérêt. Ce chapitre permettra ensuite d'introduire les problématiques liées à la nisine après avoir détaillé les différentes méthodes actuelles de production et de purification de la nisine.

1.1. Généralité sur les bactériocines

Les bactériocines des bactéries lactiques sont des peptides ribosomiaux à caractère antimicrobien de faible poids moléculaire permettant aux bactéries productrices de se protéger des autres souches bactériennes proche de la souche productrice, ce qui rend donc leur spectre d'action étroit. Elles agissent comme toxines émises par une bactérie dans le but de se protéger, coloniser ou répondre à un environnement défavorable favorisant ainsi sa survie [13]. Les bactériocines les plus étudiées sont celles produites par les bactéries lactiques (BL), ces bactéries étant produites naturellement dans les produits laitiers et le lait cru et impliquées dans la fermentation spontanée de produits alimentaires. Les bactériocines des bactéries lactiques présentent aussi des activités inhibitrices contre des souches pathogènes telles que *Listeria monocytogenes* [10]. Elles sont de ce fait pour la plupart reconnues comme bactéries GRAS (Generally Recognized As Safe) [10].

Les bactériocines des BL sont généralement de petits peptides constitués d'une structure d'une soixantaine d'acides aminés (AA) [14] et possédant des propriétés hydrophobes et cationiques. Elles diffèrent selon la présence de groupes particuliers d'acides aminés (AA) leur donnant une grande disparité quant à leur activité antimicrobienne, mais aussi leurs propriétés physico-chimiques (point isoélectrique, charge nette) [15]. En raison de leurs propriétés, les bactériocines se différencient des antibiotiques. Parmi les définitions données pour décrire les bactériocines, celle énoncée par Klaenhammer (1988) a été retenue. Cette dernière définit les bactériocines en tant que protéines ayant une activité bactéricide contre les espèces bactériennes proches de la souche productrice. Il décrit les bactériocines comme représentant une large classe de substances antagonistes qui varient selon leur poids moléculaire, leur spectre et leur mode d'action ainsi que leurs propriétés physico-chimiques. Klaenhammer propose en

1993 à partir de cette définition une classification des bactériocines, encore reconnue et utilisée aujourd'hui, selon quatre classes (Tableau 1.1) [16]:

[•1] Classe I ou lantibiotiques, les bactériocines de cette classe sont dénommées lantibiotiques en raison de la présence d'AA spécifiques que sont la lanthionine (Lan) et la bêta-méthyllanthionine provenant de la modification des précurseurs de déhydroalanine et de déhydrobutyrine respectivement. Ces AA particuliers permettent de donner aux lantibiotiques des propriétés physico-chimiques caractéristiques telles que la formation de liaisons thioéthers intramoléculaires ainsi que la formation de boucles caractéristiques de cette première classe (Figure 1.1). Elles sont aussi caractérisées par une faible taille moléculaire inférieure à 5 kDa et présentent des propriétés physico-chimiques telles qu'une stabilité à une température allant jusqu'à 120°C lorsqu'elles se trouvent dans un environnement optimal pour leur stabilité. Cette classe I comprend notamment la nisine, bactériocine historiquement représentative des lantibiotiques [17,18].

Les bactériocines de classe I peuvent aussi être subdivisées en deux sous-groupes selon la classification proposée par Jung (1991) [19] basée sur les caractéristiques structurales et fonctionnelles des lantibiotiques. Les lantibiotiques de type A sont des peptides allongés et flexibles allant jusqu'à 34 AA. Ce sous-groupe inclut notamment la nisine et la subtiline. Les lantibiotiques de type B correspondent à des peptides allant jusqu'à 19 AA de longueur et présentent plutôt une forme globulaire [20]. Les lantibiotiques de type A agissent en perturbant la membrane des microorganismes cibles, les lantibiotiques de type B agissent eux en inhibant la biosynthèse de la paroi bactérienne [21,22]. Plus récemment, cette sous classification des lantibiotiques est devenue moins claire du fait de la mise en évidence des deux modes d'action chez la nisine : disruption de la membrane et inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire en se fixant aux lipides II [23].

[•2] La classe II regroupe les bactériocines non-lantibiotiques, c'est-à-dire ayant une chaîne peptique non modifiée (ne possédant pas d'AA tel que la Lan), mais étant de petite taille moléculaire (inférieure à 10 kDa) et thermorésistants comme les lantibiotiques. Cette classe II est encore subdivisée en trois sous-classes : (a) les peptides listeria-actifs, du fait de leur capacité à inhiber la croissance de *Listeria sp.*, et peuvent aussi être décrites comme des bactériocines Pediocine-like du fait de la présence d'une séquence consensus d'AA appelée « boîte pédiocine » au niveau de leur extrémité Nter. Ce groupe regroupe la pédiocine ou encore les entérocinés [24]. (b)

les peptides à complexe type pores, leur particularité étant que leur activité antimicrobienne nécessite deux peptides pour être active et permettre la formation d'un pore dans la membrane de la cellule cible (exemple de la plantaricine et de la lactococcine G) [25]. Et (c) les peptides thiols-actifs nécessitant la réduction de ses résidus cystéines pour pouvoir être fonctionnels [8].

[•3] La classe III regroupe les bactériocines thermolabiles de taille moléculaire supérieure à 30 kDa [10]. Cette classe ne comprend que 4 bactériocines qui sont l'helvéticine J, l'entérollysine A, la zoocine A et le millericine B.

Tableau 1.1: Classification des bactériocines des BL selon Klaenhammer et al [16] et complété selon Cleveland et al [26] et Drider et Rebuffat [8]

Classe	Caractéristiques	Bactériocines représentatives
I	AA particuliers : lanthionines et β -méthyl lanthionine	
	Lantibiotiques : peptides de petite taille <5kDa	
Ia	Linéaire et flexible	Nisine
Ib	Globulaire	Mersacidin
II	Non-lantibiotiques : non modifié, de petite taille et thermorésistant	
	IIa <i>Listeria-actif</i> , possède une séquence consensus en N terminal	Leucocine
	IIb Deux peptides nécessaires à l'activité antimicrobienne	Lactococcine G
	IIc Peptides thiols-actifs	Canocycline A
III	Grande taille (>30kDa) et thermolabiles	Helveticine J

1.2 La nisine

1.2.1 Structure et propriétés physico-chimiques

La nisine est une bactériocine de type lantibiotique appartenant donc à la classe I des bactériocines. Comme dit précédemment, les lantibiotiques sont caractérisés par la présence d'acides aminés particuliers comme la lanthionine (Lan). En plus de la Lan et

de la bêta-méthyllanthionines, ainsi que des acides aminés déhydro- que sont la déhydroalanine (DHA), la déhydrobutyrine (DHB) (Figure 1.1) [17,18]. Ces AA particuliers confèrent une conformation particulière à la nisine. La formation de ponts thioéthers appelés β -méthyl lanthionines donnent à la nisine et aux bactériocines de classe I leur activité biologique spécifique [20]. Ces propriétés particulières et constitutives permettent notamment la formation de boucles intrinsèques : ces boucles, au nombre de cinq dans la nisine, donne à la molécule sa capacité à résister aux hautes températures et à la dégradation protéolytique en permettant le maintien d'une rigidité dans la structure peptidique [22]. Ce sont notamment les AA en position 3-7, 8-11, 13-9, 23-26 et 25-28 qui permettent la formation des cinq boucles dans la structure de la nisine. Ces boucles sont désignées respectivement A, B, C, D et E, les deux dernières étant liées [27].

La nisine possède une masse moléculaire de 3 510 Da [13]. Cependant, il existe différents types de nisine ayant été identifiés dans la littérature avec notamment deux formes majoritairement retrouvées, la nisine A et la nisine Z. Ce sont ces deux formes de nisine que l'on retrouve dans les produits commerciaux tel que la nisapline [28]. Ces deux variants ne diffèrent que d'un AA dans leur structure : quand la nisine A possède une histidine en position 27, la nisine Z possède, elle, une asparagine. Cette seule particularité dans la structure des deux peptides leur confère des différences en matière de solubilité et de résistance aux variations de pH, la nisine Z, étant plus soluble est plus stable à des pH au-dessus de 6 du fait de la chaîne polaire de l'asparagine par rapport à l'histidine de la nisine A [13]. La solubilité et la stabilité de la nisine, ainsi que son activité antimicrobienne, sont donc dépendantes du pH du substrat dans lequel la nisine se trouve, la solubilité et la stabilité de la nisine étant plus importantes lorsque le pH est de plus en plus acide : à pH 2-3, la nisine peut être autoclavée à 121°C pendant 15 minutes sans perdre sa stabilité et donc son activité antimicrobienne. La nisine est au contraire quasiment insoluble en condition de pH alcalins [22,29].

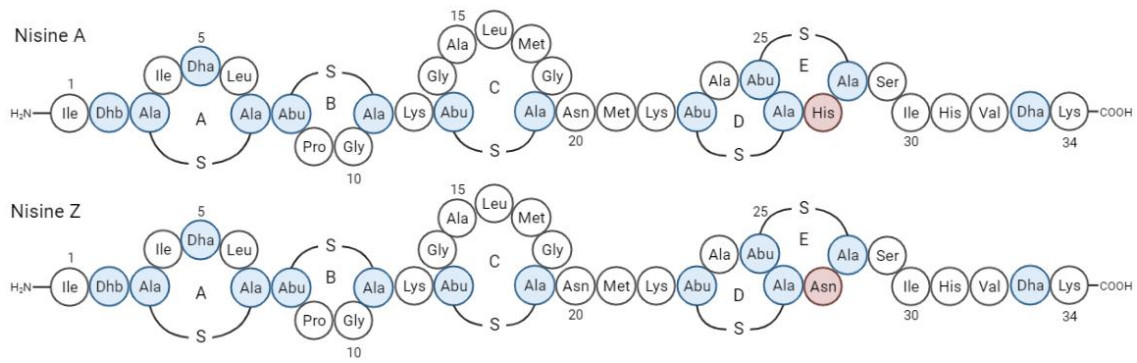


Figure 1.1 : Représentation schématique des deux formes de nisine A et Z. Abu acide Aminobutyrique ; Ala-S-Ala lanthionine, Abu-S-Ala β-méthyllanthionine ; DHB déhydrobutyrine. On différencie aussi 5 boucles intramoléculaires dans la nisine allant de A à E. Nomenclature des acides aminés particuliers selon Jung et al [17]

Il est aussi intéressant de noter la capacité de la nisine à pouvoir former des structures complexes allant du monomère, dimère jusqu'au tétramère avec des masses moléculaires de 3350, 6700 à 13 400 Da, respectivement [10,27,30]. Cette propriété à pouvoir exister sous forme de monomère ou de polymère a été décrite durant une étude portant sur la caractérisation de la masse moléculaire de la nisine utilisant la technique SDS-PAGE, révélant alors les interactions intermoléculaires entre molécules de nisine [10]. Pour expliquer cette faculté à se complexer, McAuliffe et al (2001) [22] ont suggéré que la formation de complexes de nisine permettrait, selon les auteurs, l'insertion de la nisine dans la membrane cellulaire des organismes cibles. Cependant, l'interaction des peptides de nisine menant à la formation de ces complexes reste un sujet d'étude à approfondir concernant les conditions spécifiques à leur formation [31].

1.2.2 Propriétés antimicrobiennes et mode d'action

Comme dit précédemment, les lantibiotiques peuvent agir selon deux modes d'action : les types A agissent par disruption de la membrane cytoplasmique des bactériocines par la formation de pores. Les lantibiotiques de type B agissent en inhibant la biosynthèse des peptidoglycanes de la paroi bactérienne [21,22]. Le cas de la nisine est un cas particulier, car faisant partie du type A des lantibiotiques, elle agit en perturbant la membrane cellulaire des bactéries causant la fuite des ions du cytoplasme de l'organisme cible et donc son apoptose (Figure 1.2) [32]. Cependant, bien que n'étant pas globulaire, quelques études ont démontré l'action de la nisine sur l'inhibition de la

synthèse de la paroi cellulaire bien que cette inhibition reste lente et réduite comparée à l'autre action de la nisine sur les bactéries cibles [22,23].

La nisine peut agir sur les formes végétatives, et sur les formes sporulées des bactéries, qu'elle inhibera plus efficacement que les formes végétatives [33]. L'activité antimicrobienne contre les spores se base sur les groupes sulfhydryle de la nisine qui permettent au peptide de s'insérer dans la paroi du pore. Cette activité est plus efficace lorsque les spores sont soumises à des traitements thermiques, ce qui est un facteur important à prendre en compte, compte tenu de l'utilisation de la nisine en agroalimentaire [22,34].

Quelques études mettent aussi en évidence un autre facteur important dans la description de l'activité antimicrobienne de la nisine : la formation de complexes multimériques pour permettre l'incorporation de la nisine dans les parois cellulaires. Liu et Hansen (1990) [17] décrivent la formation de ces multimères de nisine lors de tests sur gel d'électrophorèse. Ils décrivent alors la formation de plusieurs complexes à pH basique (pH 11) qui pourraient découler d'interactions intermoléculaires entre groupes acides et groupes nucléophiles des acides aminés. Prince (2016) [30] a étudié l'effet de la concentration en nisine sur la formation de tétra/pentamères impliqués dans l'activité antimicrobienne. Driessen et al (1995) [32] décrivent un « wedge model » : la nisine, chargée positivement, interagit avec la membrane cellulaire chargée négativement permettant l'accumulation de molécules de la nisine selon ces mêmes interactions électrostatiques, permettant alors l'intégration de nisine dans la membrane au niveau du point d'accumulation, et donc, la formation de pores.

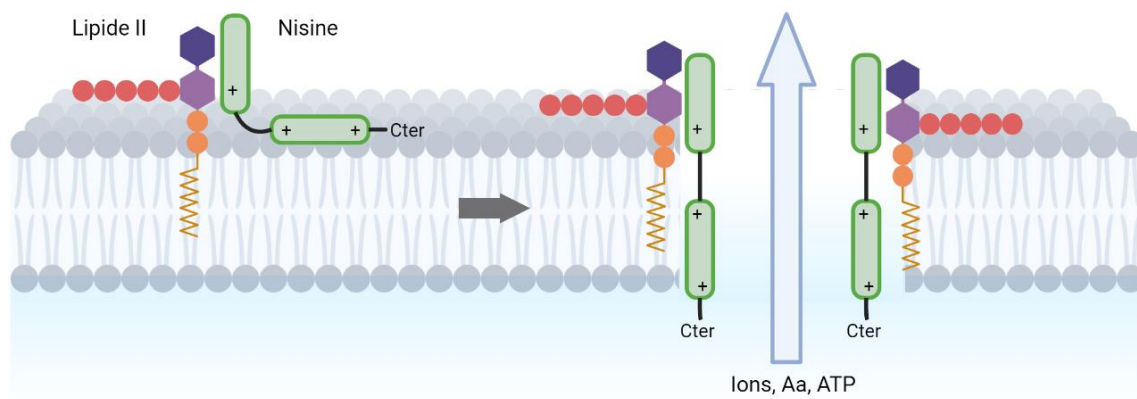


Figure 1.2 : Modèle représentant la formation du pore par interaction de la nisine avec les lipides II de la membrane de la cellule cible. (1) La nisine se lie à la partie glucidique du lipide II via son extrémité Nter (2). L'extrémité Cter de la nisine permet ensuite la translocation à travers la membrane. Plusieurs complexes nisine/lipide II sont nécessaires pour la formation du pore. Schéma adapté selon Wiedemann et al., (2001) et McAuliffe et al (2001) [20], [21] et réalisé sur BioRender.

Pour former ces pores, la nisine après introduction dans la membrane bactérienne doit concentrer et organiser d'autres molécules de nisine ainsi que certains lipides impliqués dans la formation de la paroi bactérienne de peptidoglycanes (PEG). La conformation spécifique des molécules de nisine et de lipide permet alors la formation du pore de 2 à 2.5 nm provoquant la fuite du cytoplasme de la bactérie de molécules essentielles comme le potassium, l'ATP ou encore les AA provoquant ainsi la disruption du flux cytoplasmique et du potentiel de la membrane [13,23]. Pour permettre cet arrangement de molécules, la nisine possède dans sa structure différentes régions dont chacune a un rôle spécifique dans la formation de ce pore. La région Cter hydrophobe permet le maintien de la nisine dans la membrane alors que la région Nter hydrophile permet l'interaction et la déviation des lipides II impliqués dans la biosynthèse de la paroi, ainsi que d'autres molécules de nisine. Pour permettre l'organisation des molécules autour de celle de nisine intégrée à la membrane, Alkatib et al (2014) [35] ont décrit la troisième région sur la structure de la nisine qu'est le point charnière entre les extrémités Cter et Nter possédant une grande flexibilité permettant donc l'action de l'extrémité Nter.

1.2.3 Toxicité

La nisine a depuis longtemps été considérée comme non toxique en alimentation. Son occurrence dans plusieurs sources de laits crus permettait encore de considérer la nisine comme une molécule naturellement présente et déjà consommée sans effet nocif [36]. Une première étude réalisée par Hara et al. [29] a permis de démontrer l'innocuité de la nisine testée sur des rats en déterminant la dose létale moyenne (DL50) à 7g/kg lorsque administrée oralement. Des études plus poussées, concernant la toxicité à long terme en prenant en compte de multiples paramètres (prise de poids, fertilité, taille des organes), ont été faites sur la prise de doses excessives de nisine chez le rat par Frazer et al. [37]. L'étude a alors démontré la très faible toxicité, voire non toxicité de la nisine ainsi que l'absence de propriétés allergéniques de la nisine. Ceci s'explique par le fait que la nisine soit sensible aux enzymes protéolytiques telles que l'alpha-chymotrypsine ou la pancréatine. Cette sensibilité à ces enzymes protéolytiques, retrouvées dans le tractus digestif de l'homme, permet d'expliquer l'innocuité avérée de la nisine, celle-ci étant dégradée après ingestion. Elle n'est cependant pas sensible aux enzymes que sont la trypsine, la pepsine ou la carboxypeptidase [10].

Actuellement, la nisine, produite par la bactérie *Lactococcus lactis*, est l'unique bactériocine reconnue comme GRAS et la seule à pouvoir être utilisée comme conservateur en agroalimentaire. La nisine, et plus généralement les bactériocines, est donc reconnue comme sûre du fait de leur sensibilité aux protéases digestives ainsi que leur non-toxicité pour les cellules eucaryotes [29]. C'est sur la base de ce faible niveau de toxicité avéré de la nisine que l'OMS a établi une dose journalière acceptable de 0.825 mg/kg (masse corporelle). Cependant, selon le pays, les seuils de nisine tolérés en tant qu'additif varient fortement, voire ne sont pas limités par la législation [38].

1.3 Contexte scientifique et industriel de l'utilisation de la nisine

La nisine est un conservateur naturel présentant d'importants atouts pour l'industrie agroalimentaire. En effet, la nisine n'est pas toxique, agit à faible dose et n'altère ni le goût, ni la texture, ni la couleur des aliments. Bien qu'employée depuis les années 1950 en tant que conservateur, notamment dans les produits laitiers et les produits fermentés, elle présente aussi un intérêt grandissant dans l'industrie pharmaceutique du fait d'applications contre certaines infections bactériennes, notamment celles résistantes aux antibiotiques. Malgré ses applications et son grand intérêt en tant qu'antimicrobien naturel, la nisine pâlit actuellement de faibles rendements de production. Les bactéries lactiques, responsables de sa production, nécessitent des milieux riches et donc coûteux, tout en ne permettant pas une production de nisine assez importante. De plus, l'utilisation de ces milieux complexes rend la purification de la nisine encore plus complexe. La purification de la nisine demandant plusieurs étapes afin d'obtenir un facteur de purification assez important pour ses applications thérapeutiques notamment. Ce sont donc sur ces problématiques liées à sa production et sa purification que portent la plupart des études concernant la nisine.

2 Production de la nisine

2.1 Facteurs influençant la production de la nisine

2.1.1. Influence du milieu de culture

La composition du milieu de culture est probablement un des paramètres les plus importants dans la production de la nisine et des bactériocines en général du fait de la nécessité pour les bactéries lactiques d'utiliser des milieux riches et complexes pour leur culture. En effet, il a été démontré que la production des bactériocines était en lien avec

la croissance des bactéries lactiques productrices, et suit une cinétique de métabolisme primaire bien que la nisine soit considérée comme un métabolite secondaire. La production de la nisine se fait donc lors de la phase exponentielle de la cinétique de croissance de la bactérie lactique productrice et cesse lorsque celle-ci arrive en phase stationnaire de croissance [39,40]. La production de façon importante de la nisine par des souches de type *Lactobacillus* a été démontrée sur milieu de Man Rogosa and Sharpe (MRS), un milieu commerciale riche en peptones de viande, d'extrait de levure et de dextrose, ainsi que sur milieu M17, riche en peptones de viandes et de caséine, ainsi que d'extrait de levure [41]. La forte production de la nisine sur ces différents milieux montre la nécessité pour la souche productrice d'utiliser des milieux très riches, notamment en source d'azote, et donc coûteux pour la production de la nisine. La production des bactériocines semble, de ce fait, dépendante de la production de biomasse de la souche productrice, appuyant l'intérêt du milieu de fermentation dans sa production. Cependant, il a déjà été montré qu'une biomasse importante n'était pas toujours accompagnée d'un haut rendement en nisine dans le milieu de culture comme démontré par Leroy et al (1999) [42]. En effet, Leroy et al expliquent le faible rendement de nisine issu d'une forte production de biomasse du fait de la faible production spécifique de la nisine des bactéries lactiques.

Le principal frein à la production des bactériocines et de la nisine est donc l'utilisation de milieux commerciaux qui rendent leur production peu viable économiquement du fait de leur coût élevé et de la forte concentration en source d'azote qui est de plus non complètement utilisée en fin de fermentation et composée de différents peptides allant de 3 000 à 6000 Da, correspondant à ceux de la plupart des bactériocines dont la nisine, et rendant ainsi les procédés de séparation et purification subséquents plus compliqués [41]. De plus, leur forte concentration comparée à celle de la nisine produite exacerbe encore plus la complexité de la purification après production [28].

Le milieu de fermentation représente donc un point charnière dans la production de la nisine, celui-ci étant estimé par certaines études comme représentant 30% des coûts de production des bactériocines [43].

2.1.2. Influences des conditions de cultures

2.1.2.a pH

Le pH semble jouer un rôle significatif sur la croissance des microorganismes et la production de la nisine du fait que le pH impacte la croissance bactérienne ainsi que la production/excrétion par les bactéries de la nisine [39]. Une forte diminution en pH, induite majoritairement par la production d'acide lactique pour les bactéries lactiques, est généralement accompagnée par une plus faible production de biomasse du fait que les réactions cytoplasmiques dépendent du pH [44,45]. Les bactériocines sont donc produites entre certaines valeurs de pH dépendamment de la souche productrice, mais le pH optimal pouvant être différente de celui de la croissance bactérienne. De plus, il a été montré que le pH, en plus de son influence sur la production des bactériocines, joue aussi un rôle dans leur agrégation et adsorption sur les cellules bactériennes, des pH acides permettant leur désorption et donc leur libération dans le milieu de culture [46,47]. Le pH appliqué à la fermentation peut avoir un impact sur leur rendement, les bactériocines et la nisine étant globalement chargées positivement à pH acide [38], la variation de pH a donc une influence sur leurs propriétés physico-chimique : leur stabilité, leurs interactions électrostatiques et hydrophobes avec les molécules et membranes cellulaires des bactéries,...

Les bactéries lactiques vont donc généralement nécessiter de plus hautes valeurs de pH que celles permettant une stabilité optimale de la nisine, la nisine étant très stable à de faibles valeurs de pH. Plusieurs études ont démontré que la mise en place d'un gradient de pH pourrait permettre une haute densité bactérienne ainsi qu'une forte production de nisine, plus prononcé étant le gradient meilleur étant le rendement en nisine [39,48]. Certaines études ont de leur côté montré l'efficacité de fixer un pH de départ de 6 à 6.5 pour une production optimale de la nisine ainsi qu'un contrôle de se pH durant la fermentation, que cela soit par un pH fixe de départ [49], ou par la description de cycles de ré-alcalisation du milieu de culture permettant la croissance bactérienne et le relargage de la nisine dans le milieu de culture et donc sa récupération [50,51].

2.1.2.b Température

La température appliquée durant la fermentation joue un rôle important dans la production des bactériocines. Comme décrit pour le pH, la température a une influence directe sur le métabolisme des microorganismes et donc de la croissance de la biomasse [52]. Cependant, l'optimisation sur la température pour la production de la nisine a

démontré une différence entre la température optimale pour la croissance et la production de la bactériocine comme démontré par de Vuyst et al (1996) [53] avec une température optimale pour la production de la nisine inférieure à celle pour la croissance bactérienne. Cette observation est aussi supportée par plusieurs autres études [54,55]. Yang et al (2018) [49] ont permis de montrer que l'influence de la température sur la production des bactériocines pourrait être liée à son influence sur la durée de la phase stationnaire de croissance de la biomasse, les bactériocines et plus particulièrement la nisine ayant un mode de production de type métabolites primaires et donc lié à cette phase stationnaire de croissance de la biomasse [48]. La température optimale pour la production de la nisine dépend donc de la souche productrice utilisée et nécessite dès lors d'être étudié expérimentalement.

2.1.2.c Source de carbone et d'azote

La principale voie d'optimisation de la production de la nisine repose sur la détermination de la meilleure source de carbone et d'azote pour la croissance de la bactérie productrice, avec la détermination du pH et de la température optimale [56]. Les bactéries lactiques demandant de grandes sources de carbone et d'azote pour croître mais elles présentent une certaine hétérogénéité concernant la source de carbone de prédilection [40,57], et ce, même pour des souches du même genre comme reporté par Settani et al [58] pour la production d'entérocinés. Costa et Maldvidos (2016) [59] ont, par exemple, étudié la production de la nisine avec la souche *L.lactis* CECT 539 sur lactosérum supplémenté en glucose ou en lactose et démontre une réduction de la croissance lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone. L'inhibition de croissance avec le glucose peut s'expliquer par d'autres études montrant les mêmes résultats lorsque de fortes concentrations de glucose sont utilisées pour la production des entérocinés [60,61]. L'utilisation d'autres sources de carbone (sucrose, xylose, maltose) a été rapportée dans la littérature par plusieurs autres études [57,62]. La recherche de la meilleure source de carbone pour la production de la nisine est donc d'intérêt.

Ces constats concernant la diversité de sources de carbone s'appliquent aussi à la source d'azote nécessaire à la croissance des bactéries lactiques. Différentes sources d'azote ont été étudiées pour la production de la nisine dont l'extrait de levure, l'extrait de viandes et les caséinates généralement retrouvés dans les milieux commerciaux tels que le milieu MRS, communément utilisé dans la production de la nisine, ou encore les

peptones de soja [48,63,64]. L'utilisation d'azote inorganique a aussi été étudiée dans ce cas avec notamment le sulfate d'ammonium ou les nitrates d'ammonium [65]. Liu et al (2005) [66] ont étudié l'utilisation de sources d'azote non conventionnelles que sont les déchets de pomme de terre comparées à l'utilisation d'extrait de levure ou de peptone de soja. L'utilisation de différentes sources d'azote dans un même milieu de culture a aussi permis de montrer une meilleure production de nisine par *L.lactis* A164 lorsque comparée à l'utilisation d'un seul type de source d'azote [61].

La recherche de la meilleure source d'azote et de carbone représente donc un levier important dans la production de la nisine, celles-ci étant dépendantes de la souche productrice utilisée. De plus, comme pour la plupart des productions par fermentation, la recherche du meilleur rapport carbone/azote représente une étape importante dans la production d'une molécule d'intérêt [67].

2.2 Approches pour améliorer la production de la nisine

2.2.1 Souches productrices de nisine

La production de la nisine peut être soutenue par différentes souches de type lactocoque présentant des rendements différents. Ces différences en rendement sont généralement dues à leur expression génique plus ou moins importante ainsi qu'à la souche productrice, les souches productrices possédant un mécanisme de résistance à la production de la nisine. Cette résistance de la souche productrice peut notamment être augmentée par l'introduction de plasmides possédant les gènes responsables de la résistance. Cela a notamment démontré un plus grand rendement en nisine à l'aide de cette technique [68]. La construction de souches productrices plus performantes par modifications génétiques a donc été étudiée pour améliorer la production de la nisine. Ces modifications génétiques ciblant principalement la réduction des effets négatifs qu'est la sensibilité de la souche productrice à la nisine et à l'acide lactique produits, ou encore, à la forte concentration en nisine dans le milieu de culture menant à l'arrêt de la production par « quorum-sensing » [69]. Bien que la modification génétique des souches productrices permet d'augmenter considérablement la production de la nisine, ces techniques sont limitées du point de vue de la législation, du fait de l'intérêt de la nisine en tant qu'antimicrobien naturel et du fait que la nisine et les souches productrices natives soient reconnues comme GRAS [10].

2.2.2 Optimisation des conditions de culture

2.2.2.a Utilisation de co-produits en tant que milieu de culture

Le principal frein à la production des bactériocines et de la nisine est donc l'utilisation de milieux commerciaux qui rend leur production peu viable économiquement du fait de leur coût élevé, représentant jusqu'à 30% à 80% du coût de production des bactériocines [43,70] et de la forte concentration en source d'azote qui est de plus non complètement utilisée en fin de fermentation et composée de différents peptides allant de 3 000 à 6000 Da, correspondant à ceux de la plupart des bactériocines dont la nisine, et rendant ainsi les procédés de séparation et purification plus compliqués [41]. De plus, leur forte concentration comparée à celle de la nisine produite exacerbe encore plus la complexité de la purification [28]. Afin de réduire les coûts liés à la production de la nisine et des bactériocines en général, l'utilisation de co-produits issus de l'industrie alimentaire, principalement de l'industrie laitière, a été fortement étudiée [71]. Différents co-produits ont été étudiés dans le but de produire à moindre coût les bactériocines et sont résumés dans le Tableau 1.2.

Lactosérum et co-produits de l'industrie laitière

Les co-produits de l'industrie laitière représentent une source riche de composés carbonés et azotés du fait de leur composition en sucres comme le lactosérum, mais aussi en protéines et peptides par leur composition en caséine et autres protéines lactières (β -lactoglobuline et α -lactalbumine) qui représentent une source de nutriments pour la croissance des bactéries lactiques et donc la production des bactériocines, dont la nisine [72–74]. Le lactosérum produit durant la fabrication des fromages représente un milieu de culture pour les bactéries lactiques : le lactosérum est composé à 75% de sources de carbone et 5% de protéines [75]. Le lactosérum nécessite donc tout de même d'être supplémenté en facteurs de croissance et de sources d'azote pour la bioproduction de molécules [41,76]. Le lactosérum, un effluent à forte demande en oxygène, représente un problème dans sa gestion et son traitement en tant qu'effluent polluant. Son utilisation en tant que milieu de culture permet donc de revaloriser ce co-produit de l'industrie laitière et d'éviter les problèmes techniques et économiques liés à son traitement et délestage. Son utilisation représente surtout, pour les bactériocines, un moyen de diminuer les coûts de la bioproduction de la nisine du fait de son utilisation à la place des milieux de cultures commerciaux.

L'utilisation du lactosérum pour la production de la nisine a déjà été reportée dans la littérature. Plusieurs études ont rapporté l'utilisation du lactosérum en tant que milieu de culture et ont développé, chacune, un procédé permettant à la fois la croissance de la biomasse bactérienne et la production de la bactériocine à l'aide de ce co-produit [41,59,77]. De plus l'efficacité du lactosérum en tant que milieu de culture est aussi démontrée dans son utilisation pour la production d'autres bactériocines telle la pédiocine, une autre bactériocine d'importance, comme décrit par Guerra et Pastrana [41], ou encore, dans la production de bactériocine avec des souches d'*Enterococcus faecium* en comparaison avec des milieux conventionnel tels que le milieu MRS ou le milieu M17, qui ont démontré pour la première fois l'efficacité du lactosérum comme milieu de culture pour la production d'entérocoque A, d'après les travaux de Mirhosseini et al (2011) [78], montrant de meilleurs rendements en bactériocines, lorsque comparés à un milieu issu de lait écrémé, mais tout de même inférieurs aux rendements obtenus avec le milieu MRS ou M17 [61].

L'utilisation du lactosérum comme milieu de culture a donc été étudiée via différents travaux dans la littérature mettant en avant sa capacité à produire la nisine et d'autres bactériocines issues de bactéries lactiques, mais démontrant aussi la nécessité de compléter ce milieu afin de satisfaire les besoins en nutriments des bactéries productrices. Ce besoin en supplémentation du lactosérum a donc été étudié dans la littérature à travers des travaux cherchant à optimiser le milieu et la fermentation des bactéries lactiques. Desjardins et al (2001) [79] ainsi que Bertrand et al (2001) [50] ont étudié la production de la nisine Z en utilisant la souche productrice *Lactococcus lactis* UL719 immobilisée afin de permettre la production continue de la nisine sur lactosérum supplémenté. Costas et al (2016) ont étudié l'effet de différentes sources de carbone dans la supplémentation du lactosérum pour la production de la nisine ainsi que leur différence d'apport [59].

Co-produits de l'industrie marine

Un des principaux co-produits de l'industrie marine sont les rejets de traitements des crustacés. Guerra et Pastrana (2002) [48] ont étudié la production de la nisine et de la pédiocine à l'aide des eaux de traitement des crustacés et l'influence des différents paramètres appliqués à la fermentation sur ces milieux à l'aide d'une méthodologie de réponse de surface (RSM) dans le but d'optimiser la production des bactériocines. Les eaux de traitement supplémentées en glucose et en sources d'azote ont permis de montrer une production importante des bactériocines, lorsque comparée au même milieu non supplémenté. Les peptones issues d'hydrolysats de déchets de poissons sont aussi

d'autres co-produits de l'industrie marine représentant des milieux d'intérêt pour la production des bactériocines. Vasquez et al (2004) ont étudié l'utilisation de ces peptones issus d'hydrolysats de poisson pour produire la pédiocine [80]. L'amélioration des rendements en production de pédiocine a aussi été démontrée par l'utilisation de résidus de poisson, lorsque comparée aux milieux conventionnels [70].

Autres co-produits

La mélasse de l'industrie sucrière représente une source de carbone hautement fermentescible pour la production des bactériocines. Les mélasses, composées généralement jusqu'à 55% de sucres, contiennent aussi jusqu'à 12% d'autres composés notamment des protéines et des vitamines. De ce fait, les mélasses ont été étudiées en tant que milieu potentiel de culture dans la production des bactériocines, tel que décrit par Fiorentini et al (2001) [81] avec la souche *Lactobacillus acetobutylicum* avec un milieu de mélasse à 3% (p/v) supplémenté ou encore par Todorov (2008) [82], avec *Lactobacillus plantarum* dans un milieu 10% (p/v) de mélasse.

D'autres co-produits alimentaires d'origine végétale ont aussi été étudiés en tant que milieu de culture pour les bactériocines. Le lactosérum de soja représente un co-produit de plus en plus important en terme de volume de production. Il représente une grande source de carbone pour la croissance des bactéries lactiques et a été étudié pour la production de bactériocines issues de la souche *Bacillus sp.P34* et de la souche *Lacobacillus plantarum* YJG [83,84]. L'utilisation des déchets issus de pommes de terre hors calibre et la paille de maïs ont aussi été reportée dans la littérature pour la production de la nisine [66,85,86].

Tableau 1.2 : Différents co-produits issus de l'industrie agroalimentaire pour la production de bactériocines.

Co-produit		Bactériocine	Souches productrices	Sources
Co-produits de l'industrie laitière	Lactosérum	Nisine	<i>Lactococcus diacetyllactis</i> UL719	[50]
			<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CECT 539	[41]
			<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ATCC 11454	[38]

			<i>Lactococcus lactis</i> CECT 539	[87]
			<i>Lactococcus lactis</i> CECT 539	[59]
		Entérocoques	<i>Bacillus licheniformis</i> P40	[72]
	Perméat de lactosérum		<i>Enterococcus faecium</i> SD1, SD2, SD3 and SD4	[61]
		Pédiocine	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B5627	[88]
Déchet de poissons	Traitement des crustacés	Nisine	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CECT 539	[48]
		Pédiocine	<i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL B-5627	[48,80]
	Peptones de poisson	Nisine	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> CECT 539	[80]
		Pédiocine	<i>Pediococcus acidilacti</i>	[80]
Déchets végétaux	Résidus de maïs	Nisine	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ATCC 11454	[85]
			<i>Lactococcus lactis</i> E15	[86]
	Mélasses	Nisine	<i>Lactococcus lactis sub sp. lactis</i> UTMC 106	[91]
		n.d.	<i>Lactobacillus plantarum</i> AMA-K	[82]
			<i>Lactobacillus plantarum</i> BN	[81]
	Pomme de terre hors calibre	Nisine	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ATCC 11454	[66]
Lactosérum de soja	Nisine	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ATCC 17962	[84]	
	n.d.	<i>Lactobacillus plantarum</i> YJG	[83]	

2.2.2.b Production en mode fedbatch

Une autre approche dans la production de la nisine et des bactériocines est l'optimisation de sa fermentation en en mode fedbatch. Le mode fedbatch permet notamment d'influer sur l'apport en carbone et en azote ainsi que de contrôler le pH de la fermentation.

Plusieurs études ont été rapportées dans la littérature sur l'optimisation de la production de la nisine par cette approche. Bertrand et al (2001) [50] ont notamment étudié la production de la nisine Z par cycles répétés en fermenteur permettant la récolte de nisine au cours de la fermentation et palliant de ce fait l'arrêt de la production lié à la forte concentration de nisine dans le milieu. Costas et al (2016) [59] ont montré l'effet de la réalcalisation du milieu de culture ainsi que l'alimentation du milieu en carbone en continu au cours de la fermentation. La mise en place d'un contrôle de pH par fermentation continue a aussi été reportée par Goulhem et al (1999) [90]. La fermentation en mode fedbatch permet donc, par le contrôle de la source de carbone et d'azote ainsi que du pH pendant la fermentation, de plus grands rendements en nisine. Cependant, la fermentation continue permet aussi l'immobilisation de la souche productrice afin de permettre la répétition de cycle de production [50,79].

3. Purification de la nisine

Comme discuté précédemment, une des principales barrières à la purification de la nisine est la complexité du milieu dans lequel celle-ci se trouve après fermentation, du fait de la complexité de milieu de fermentation nécessaire à la croissance des bactéries lactiques [28]. L'hétérogénéité de la structure et des propriétés physico-chimiques des bactériocines rend l'application d'un protocole général difficile et explique la raison pour laquelle peu de bactériocine sont étudiées du point de vue de la purification. La purification des bactériocines, et donc de la nisine, peut être schématiquement divisée en trois étapes : (1) la production d'un surnageant séparé de la biomasse (CFS) après fermentation. (2) une étape de concentration appliquée sur le CFS généralement par précipitation aux sels et applicables sur de grands volumes, et ce, afin d'obtenir un produit semi-purifié [73]. Cette précipitation aux sels est généralement faite à l'aide de sulfate d'ammonium [47], mais peut aussi se faire par adsorption à l'aide de silicate de calcium diatomite comme rapporté par Coventry et al (1996) [92]. (3) La dernière étape correspond à l'utilisation de techniques, généralement successives, visant à obtenir une nisine hautement purifiée en retirant les contaminants restant après l'étape de concentration. Les techniques chromatographiques sont les plus utilisées pour cette étape, notamment la chromatographie par échange d'ions ou la chromatographie par immunoaffinité [93,94].

3.1 Techniques de purification de la nisine

3.1.1 Concentration

Précipitation aux sels

Du fait de la faible production des bactériocines, la première étape pour leur purification est généralement une étape de concentration par réduction du volume. La précipitation aux sels, notamment au sulfate d'ammonium, est un procédé couramment employé pour cette étape. En effet, la précipitation au sulfate d'ammonium a été utilisée pour la purification de plusieurs bactériocines : Stern et al (2006) [95] ont rapporté la purification d'une bactériocine produite par *Lactobacillus salivarius* par précipitation au sulfate d'ammonium en augmentant son activité spécifique de 14 000 AU/mg à 29 000 AU/mg. Tafreshi et al (2020) [96] ont étudié différentes concentrations de sulfate d'ammonium pour la purification de la nisine à partir d'un surnageant de culture. L'étude a permis de démontrer un plus haut facteur de purification lorsqu'une concentration de 40% en saturation de sulfate d'ammonium était utilisée, avec un facteur de purification de 168.8. Cependant, différentes concentrations optimales pour la purification de la nisine ont été reportées dans la littérature avec des concentrations en saturation en sulfate d'ammonium allant de 30 à 80% [97–100], représentant donc une limitation à la mise en place d'un protocole clair pour la purification de la nisine et des bactériocines en général. De plus, cette première reste une étape peu sélective dans la concentration de la nisine, concentrant aussi d'autres protéines et n'étant donc pas suffisante pour produire des fractions purifiées de nisine [101].

Séparation par foisonnement

Le foisonnement est un des procédés utilisés pour permettre la concentration des molécules possédant des propriétés amphiphiles comme la nisine [51,102]. Le foisonnement peut être utilisé à grande échelle et est utilisé dans la production de certaines solutions de nisine commerciale. En effet, la séparation de la nisine du milieu est permise par l'introduction d'un surfactant dans le milieu de culture afin de permettre la formation d'une mousse incluant la nisine du fait de ses propriétés hydrophobes. Une étape de précipitation aux sels est ensuite appliquée avant atomisation pour obtenir une forme commerciale sous forme de poudre contenant la nisine [11,103]. La séparation de la nisine par foisonnement est principalement appliquée après fermentation, mais certaines études ont étudié son application pendant l'étape de fermentation en bioréacteur. L'étude a permis de rapporter une meilleure récupération de la nisine mais

aussi une amélioration des rendements en antibiotiques en comparant à la fermentation classique en mode batch [104].

3.1.2. Purification

Les techniques chromatographiques sont les techniques les plus communément utilisées pour la purification des bactériocines après les étapes de précipitation aux sels afin d'obtenir des taux de purification élevés. Ces techniques se basent sur les propriétés physico-chimiques des bactériocines que sont leur petite taille moléculaire et leur hydrophobicité ainsi que leur caractère cationique. Ces techniques regroupent généralement la chromatographie par exclusion stérique, la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie en phase inverse [105] ou encore la chromatographie par immunoaffinité [93,106] ou encore la chromatographie par adsorption sur lit expansé [93].

La chromatographie par adsorption sur lit expansé est utilisée pour la purification de la nisine, utilisant ses propriétés hydrophobes, et proposant une purification en une étape de la nisine, et ce, directement dans le milieu de culture sans centrifugation pour retirer la biomasse [107]. Cette technique utilise donc les propriétés de la nisine, et des bactériocines en général, favorisant sa biodisponibilité par ajustement du pH du milieu de culture [108,109]. Cette technique a été rapportée pour la purification de la nisine Z provenant de la souche *Lactococcus lactis* par Cheigh et al (2004) [93] à partir d'un milieu de culture non clarifié. Cependant, cette technique est caractérisée par de faibles rendements allant de 30% [108] à 47% [109] en nisine.

La chromatographie par échange d'ions est une technique très utilisée dans la purification des bactériocines du fait que celles-ci ont une charge globale positive à pH neutre [110]. Une méthode à deux étapes a été, par exemple, mise en place dans la purification de la pédiocine par Uteng et al (2002) [111]. La purification rapide de la pédiocine est permise par l'application d'une technique d'échange d'ions à partir du surnageant de culture et suivie d'une étape de purification sur colonne inverse. Cette technique permet d'obtenir une purification à hauteur de 90% de la bactériocine avec un rendement de 80%. La chromatographie d'échange d'ions a aussi été appliquée à la purification de la méésentéricine W3 avec des étapes d'adsorption/désorption à l'aide d'une matrice micro-cel et SDS permettant un rendement en bactériocine de 64% [112], ou encore un rendement de 60% pour la méésentéricine Y105 [113].

La chromatographie par affinité a été étudiée pour la détection de bactériocines, mais aussi pour leur purification. La technique repose sur les interactions entre bactériocines et l'utilisation d'anticorps bactériocine spécifiques pour leur purification. Suárez et al (1997) [94] ont obtenu la purification de la nisine A par cette technique avec des facteurs de purification de 10 et un rendement en activité de 72%. D'autres études portant sur l'utilisation de la technique pour la purification d'entérotoxicines ont démontré des facteurs de purification équivalents de 10 avec des rendements plus faibles comme pour l'entérotoxicine B, avec un rendement de 25% [114], ou encore, l'entérotoxicine P à partir d'un surnageant de culture [115]. La recherche et l'utilisation de cette technique restent tout de même peu rapportées dans la littérature dans le cas des bactériocines du fait de la complexité de produire des anticorps bactériocine spécifiques d'un point de vue économique.

La chromatographie d'exclusion stérique, ou filtration sur gel, est couramment employée pour la purification des bactériocines en tant qu'étape finale, permettant une purification élevée en jouant sur la taille moléculaire spécifique des molécules. De multiples colonnes de gel de filtration sont disponibles pour la purification des bactériocines, du fait de leur diversité en termes de taille moléculaire, et regroupent généralement les gels de type Superdex, Sephadex et Sépharose. [116,117]. La filtration sur gel a par exemple, été appliquée après précipitation au sulfate d'ammonium pour la purification d'une bactériocine produite par *Bacillus sibiricus* R75, résultant en la purification de la bactériocine à hauteur de 22.3 de facteur de purification avec un rendement de 22% [118]. La bactériocine halocine HA1 a aussi été purifiée à l'aide de la filtration sur gel après filtration tangentielle sur membrane de seuil de coupure 10 kDa permettant la purification par un facteur 1.5 de la bactériocine et un rendement de 64% en terme de récupération d'activité [119].

Pour utiliser les différentes techniques chromatographiques il est donc nécessaire de connaître et maîtriser les propriétés du peptide à purifier, les bactériocines étant notamment hydrophobes et chargées positivement, et ceux afin d'optimiser les rendements, les propriétés des bactériocines pouvant avoir un impact sur leur rendements du fait de leur différences d'adsorption sur les colonnes et gels selon les conditions appliquées [113]. De plus, ces techniques chromatographiques nécessitent de larges investissements en termes de matériel et d'utilisation et peuvent aussi poser

problème d'un point de vue législatif en introduisant des composés non désirables dans un produit voué à l'alimentation.

Les procédés membranaires sont des techniques communément employées dans la purification des protéines. L'utilisation de ces procédés membranaires a cependant été peu reportée dans la littérature pour la purification de la nisine. Une étude a, par exemple, rapporté l'utilisation d'un procédé baromembranaire d'ultrafiltration démontrant l'efficacité d'une membrane PES de 10 kDa de seuil de coupure pour la purification de la nisine [120]. Il n'y a cependant aucune étude rapportant l'utilisation de procédés électro-membranaires pour la purification de la nisine.

Tableau 1.3 : Comparaison de différentes techniques employées dans la purification de la nisine.

Technique	Source	Facteur de purification	Rendement (%)	Sources
Précipitations, Sulfate d'ammonium	Surnageant brut	3.80	94	[100]
	Surnageant brut	2.52	62	[99]
	Surnageant brut	5.07	98	[97]
Méthodes chromatographiques				
Chromatographie d'échange d'ions	Surnageant brut	31	20	[96]
Chromatographie par lit expansé IEC	Surnageant brut	31	90	[93]
Chromatographie d'immunoaffinité	Surnageant brut	10	72	[121]
Chromatographie d'interaction hydrophobe	Surnageant brut	10.87	50.84	[99]
Extraction par solvants				
Méthanol	2.5% nisine solution	5.3	91	[122]

	2.5% nisine solution	5.98	52.4	[103]
Éthanol	2.5% nisine solution	5.5	85	[122]
	2.5% nisine solution	1.93	63	[103]
Chloroforme	Surnageant brut	37.43	24	[96,98]
Autres méthodes				
Ultrafiltration	Surnageant brut	4.01	100	[120]

4. Application de la nisine

4.1 Utilisation de la nisine comme conservateur alimentaire

Les bactéries lactiques étant des microorganismes commensaux de certaines denrées alimentaires tels que la viande, les fruits et les légumes, elles sont déjà utilisées en tant que culture de fermentation dans la plupart de ses produits ainsi que dans l'industrie laitière. La plupart de ses bactéries sont dès lors reconnues comme GRAS par la FDA [10]. Les stratégies d'utilisation de la nisine pouvant être considérées sont donc l'inoculation d'aliment par une souche productrice de nisine, qui concernera principalement les produits fermentés, ou d'un produit fermenté contenant une souche productrice de nisine, l'addition de la nisine purifiée ou semi-purifiée en tant que conservateur ou encore l'addition de nisine encapsulée ou immobilisée dans les emballages alimentaires. Ces différentes applications relevant des propriétés extrinsèques et intrinsèques des matrices alimentaires concernées, nous nous concentrons ici sur l'utilisation de la nisine directe dans les aliments en tant que conservateur naturel.

Produits laitiers

L'addition directe de la nisine dans l'alimentation se fait généralement sous forme liquide, permettant une répartition homogène de la nisine dans l'aliment, plutôt que sous forme de poudre. Cette application sous forme liquide permet notamment l'utilisation de la nisine par pulvérisation permettant la décontamination des surfaces. La première utilisation de la nisine remonte à l'addition de la souche productrice de nisine *Lactococcus lactis* dans la production de fromage suisse ainsi que dans des fromages

industriels pasteurisés dans le but de prévenir leur altération par les souches pathogènes *C. butyricum* and *Clostridium tyrobutyricum* [123]. Ces recherches et cette utilisation de la nisine en tant que conservateur ont permis de lancer l'intérêt de développer et produire la nisine en tant que conservateur naturel d'intérêt. Son utilisation en agroalimentaire comme bio conservateur naturel est approuvée depuis les années 1960 par la FAO. La nisine est utilisée dans une cinquantaine de pays dans les produits fermentés comme les fromages ainsi que les produits pasteurisés comme les produits laitiers ou les aliments en conserve [21]. La nisine est très utilisée dans l'industrie laitière, car elle permet l'inhibition de plusieurs bactéries pathogènes des produits laitiers comme *Clostridium botulinum* ainsi que des bactéries pathogènes se développant lors du stockage des produits comme, *Listeria monocytogenes*. La nisine permet donc la conservation ainsi que l'extension de la durée de vie des produits en alimentaire.

Produits carnés

Plus récemment l'utilisation de la nisine comme conservateur est très étudiée dans la conservation de la viande, notamment pour lutter contre les carnobactéries et les *Enterobacteriaceae* [36]. Cependant, son utilisation est de plus en plus étudiée en combinaison avec d'autres molécules antimicrobiennes pour permettre une activité antimicrobienne suffisante. Cette complémentarité est nécessaire du fait de certaines limitations de la nisine dans la conservation de la viande : sa faible solubilité est un premier frein, empêchant la bonne répartition et donc l'efficacité de la nisine à inhiber la croissance de pathogènes dans le produit. Mais son inactivation par les molécules de glutathion présentes dans la viande est une des principales raisons de ces limitations [36]. En effet la présence de l'enzyme GHS S-transférase dans les produits carnés mènerait à la formation d'interaction de la nisine avec le glutathion par interaction des groupements thiols du glutathion avec les résidus d'acides aminés déhydro- [124].

Fruits et légumes

L'utilisation de la nisine dans les produits végétaux porte particulièrement sur la lutte contre les contaminations par *E.coli* et *L.innocua*. Différentes études ont démontré l'efficacité de la nisine contre ces souches pathogènes dans des jus de carotte, et ce, avec une faible quantité de nisine (0.25 mg.L⁻¹) [125]. Xu et al (2007) [126] ont eux aussi démontré l'efficacité de la nisine dans la conservation de légumes prêts à manger contre les pathogènes de type *Salmonella* et *L.monocytogenes*. Ils ont aussi montré l'efficacité de la nisine lorsque son utilisation est couplée à d'autres moyens de conservation comme l'ajout d'acide citrique.

Autres utilisations alimentaires

La nisine trouve aussi un intérêt important dans l'industrie des boissons alcoolisées, notamment la bière et les vins, du fait de son innocuité envers les levures utilisées lors des fermentations alcooliques [10]. Elle permet d'empêcher la croissance des bactéries lactiques, pathogènes responsables de la détérioration de ces produits. Son utilisation permet alors de réduire l'utilisation de sulfate dans l'industrie viticole [127], ou encore, lors de l'introduction des levures, ou « pitching », souvent source de contamination, en nettoyant les levures à l'aide d'une solution de nisine [10].

Tableau 1.4 : Principaux exemples d'utilisation de la nisine en agroalimentaire et autres applications non alimentaires.

Produits	Cibles	Références
Applications alimentaires		
Produits laitiers	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Kocuria rhizophila</i> Spores thermorésistantes	[11,36]
Bières, vins et alcools	Lutte contre bactéries lactiques <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>	[128]
Fruits et légumes	<i>B.cereus</i> <i>E.Coli</i> <i>Salmonella</i>	[128]
Viandes	Lutte contre bactéries lactiques <i>L.monocytogenese</i> <i>S.aureus</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	[36,129]
Applications non alimentaires		
Pharmaceutique	Infection du tract respiratoire	[130,131]
	Dermatologie	[132]
Vétérinaire	Traitement des mastite	[133]

4.2 Autres applications de la nisine

Bien que les principales applications de la nisine soient en agroalimentaire en tant que conservateur, elle a aussi développé un grand intérêt dans le domaine biomédical du fait de la possibilité d'utiliser la nisine, en complément d'autres antimicrobiens, dans la lutte contre plusieurs bactéries pathogènes non alimentaires [134]. Plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité de la nisine en tant que traitement contre certaines maladies inflammatoires de la peau, comme la dermatite atopique [132]. Elle permet aussi de lutter contre certaines infections du tractus respiratoire par *S.aureus* ainsi que des infections du tractus intestinal, d'ulcères de l'estomac, ou encore, de gingivites et caries dentaires [130,131]. D'autres études ont permis de mettre en évidence l'effet synergique de la nisine contre certaines bactéries à Gram négatives, normalement peu sensibles à la nisine, lorsque celle-ci est utilisée avec certains antibiotiques. Le développement de certains variants de la nisine permet même de passer outre l'utilisation d'antibiotiques [135]. D'autres ont mis en évidence des activités anti-carcinogènes [130]. La nisine, ainsi que les autres bactériocines, présente un intérêt grandissant comme agent thérapeutique dans le traitement de certaines pathologies humaines : leur non-toxicité ainsi que leur mode d'action unique permet de diminuer la capacité des bactéries cibles à développer de résistance à l'activité antimicrobienne [130].

5. Procédés membranaires

5.1 Ultrafiltration

Les procédés baromembranaires dont l'ultrafiltration représentent des procédés de fractionnement et de purification de molécule au travers de membranes poreuses via la sélection selon la taille moléculaire sous l'effet de l'application d'une pression. Les procédés baromembranaires pour la purification de molécules d'intérêt sont déjà utilisés à l'échelle industrielle du fait de leur efficacité de séparation, la simplicité de l'opération ainsi que leur grande productivité [136]. Ces procédés présentent aussi comme intérêt des conditions d'opération peu impactantes d'un point de vue écologique et économique : fonctionne à faible température et à de faibles pressions dans le cas de l'ultrafiltration, mais aussi ne nécessite pas l'utilisation de solvants [137]. Aussi, les procédés baromembranaires se présentent comme des procédés beaucoup moins coûteux et applicables à grande échelles lorsque comparés aux procédés chromatographiques pouvant être employés dans la purification de protéines [137]. Dans

la littérature, plusieurs études ont déjà rapporté l'utilisation de l'ultrafiltration pour la purification de différentes bactériocines à partir de surnageant de culture, les bactériocines étant pour la plupart efficacement retenues par les membranes d'UF lors de leur séparation [138,139], dont la nisine comme discuter précédemment [120].

5.2 Électrodialyse

L'électrodialyse est un procédé de séparation basé sur l'électromigration sélective d'espèces chargées à travers des membranes semi-perméables sous l'influence d'un gradient de potentiel [140]. L'ED utilisant des membranes échangeuses d'ions représente le procédé électrodialytique conventionnel. L'ED à membranes échangeuses d'ions consiste en l'empilement de plusieurs membranes échangeuses de cations (MEC) et échangeuses d'anions (MEA). Ces membranes sont séparées des électrodes par une solution d'électrolyte permettant l'application d'un potentiel électrique sur le système. Les membranes échangeuses d'ions sont des membranes constituées d'une matrice sur laquelle sont fixés des groupements ioniques fixes. Les MEC possèdent des charges ioniques fixes anioniques chargées négativement qui sont généralement des groupements sulfoniques ou d'acides carboxyliques). Les MEA sont composées elles de groupements fixes chargés positivement que sont les amines tertiaires et quaternaires [141]. La composition permet donc lorsqu'un courant électrique est appliqué au système de séparer des molécules chargées, les molécules chargées positivement pouvant traverser les MEC pour migrer vers la cathode, et les molécules chargées négativement de traverser les MEA pour se diriger vers l'anode. Cependant, les MEI sont des membranes présentant des seuils de coupure très faibles de 1 à 10 nm, les MEI ayant communément une taille de pore de 1-2 nm [140] ne permettant que le passage de molécules de faible poids moléculaire.

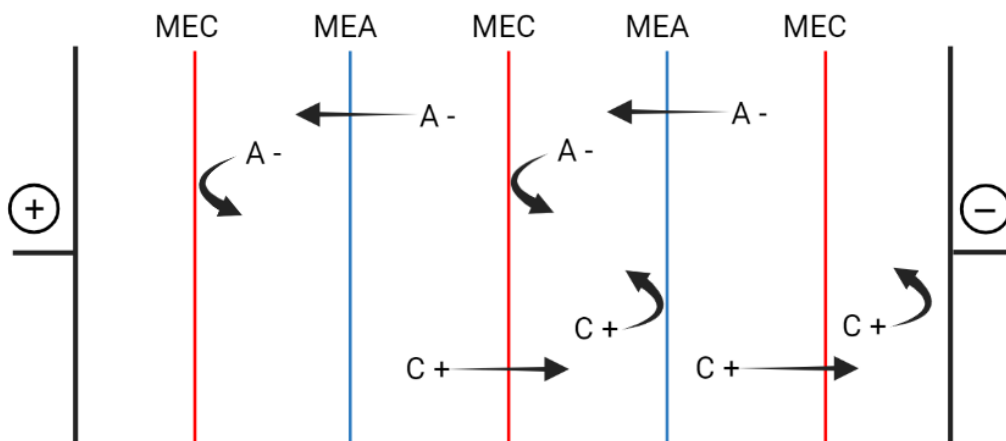


Figure 1.3 : Schéma d'un module d'électrodialyse à membranes échangeuses d'ions. MEC : membrane échange de cation, MEA : membrane échangeuse d'anion. C+ : cation, A- : anion.

Bien que l'ED ait été développée pour la désalinisation de l'eau et le traitement des effluents salins dans ses premières applications, l'ED a aussi plus récemment été étudiée dans la déminéralisation du lactosérum dans l'industrie alimentaire. Les premières applications de l'ED dans l'industrie alimentaire remontent aux années 1960 dans la déminéralisation du lactosérum issu de la production de fromage afin d'être utilisé dans la nourriture pour bébé. L'utilisation de l'ED est aussi impliquée dans l'industrie alimentaire dans le traitement de différents produits alimentaires tels que la déminéralisation de jus de fruits ou de sirops de fruits et de mélasse. Ou encore dans le traitement de lactosérum, de lait et de tofu dans le but d'être revalorisé. L'ED présente aussi comme application la séparation et la production de protéines et de peptides. Elle a notamment été employée dans la séparation de protéine du lactosérum de soja et du lait [142].

5.3. Phénomènes limitants : concentration de polarisation, colmatage et densité de courant limite

Les procédés membranaires bien que démontrant de grandes applications pour la séparation et la purification de protéines vont aussi présenter des limites dans leur utilisation du fait de phénomènes limitants que sont la concentration de polarisation, le colmatage ou encore la densité de courant limite.

La concentration de polarisation est un phénomène pouvant se produire dans n'importe quel type de procédé utilisant des membranes entraînant une perte du flux de perméation à travers la membrane et donc de la performance du procédé de séparation. Dans le cas des procédés baromembranaires, dont l'UF, la concentration de polarisation correspond à l'accumulation du soluté de la solution d'alimentation (la solution traitée) à la surface de la membrane [143]. L'accumulation de solutés à la surface de la membrane au niveau de la couche limite se produit du fait du transfert par convection des solutés à travers la membrane, les solutés mettant donc plus de temps à traverser la membrane que la couche de diffusion à la surface de la membrane.

Dans le cas de l'électrodialyse, la concentration de polarisation se produit du fait d'une diminution de la concentration en solutés à la surface de la membrane, le transport des

solutés à travers la membrane se faisant ici par diffusion plutôt que par convection. La concentration de polarisation résulte donc de l'apparition d'un gradient du transport d'ions entre la membrane et la solution à sa surface. Le nombre de transports d'ion représente la vitesse de déplacement des ions dans un électrolyte lors de l'application d'un champ électrique. Lors d'un phénomène de concentration de polarisation, ce nombre de transports d'ion vient donc à devenir différent entre les ions présents dans la solution à déminéraliser et ceux dans la solution au contact de la membrane : la concentration d'ions de la solution augmente et devient plus importante que la concentration d'ion à la surface de la membrane (couche limite laminaire). Cette diminution d'électrolytes à la surface de la membrane peut alors diminuer la conductivité de la solution à la surface de la membrane et donc diminuer la performance de la membrane à faire passer les contre-ions. La concentration de polarisation mène donc à la diminution de la concentration en ions à la surface de la membrane au contact du compartiment de déminéralisation et à l'accumulation d'ions sur la surface de la membrane faisant face à la solution de récupération (ou concentration) créant ainsi un gradient de concentration [141]. L'effet de polarisation crée donc une densité de courant limite qui fait tendre la concentration d'ions à la surface de la membrane du côté de la déminéralisation vers 0. Lorsque cette densité de courant limite est atteinte, la résistance de la membrane échangeuse d'ion augmente drastiquement au niveau de sa couche limite laminaire où s'est produit la déplétion en ions amenant à une valeur maximale de densité de courant pouvant traverser la membrane. Au-dessus de cette valeur, la membrane ne permet donc plus un transport d'ions efficace [144].

Le colmatage des membranes est lui défini comme le dépôt réversible ou non de molécules ou particules à la surface ou dans la membrane. Différents types de colmatages ont été décrits selon le dépôt retenu avec par exemple le colmatage colloïdal dans le cas du dépôt de particules ou encore le colmatage inorganique dans le cas du dépôt de sels ou de minéraux. La principale différence du phénomène de colmatage avec le phénomène de concentration de polarisation est que le phénomène de colmatage représente un état stable atteint par le système contrairement à la concentration de polarisation. Le colmatage sur ou dans les membranes entraîne alors une diminution du flux de perméat des solutés à travers les membranes. Le colmatage représente le principal frein dans l'utilisation des procédés baromembranaire. Pour l'ED le colmatage provoque aussi une augmentation de la résistance et de la consommation d'énergie du module d'ED. Le colmatage dans les procédés membranaires représente donc une importante limitation dans leur utilisation, celui-ci rendant nécessaire la mise

en place de protocole de nettoyage afin de retrouver les caractéristiques initiales des membranes en termes d'efficacité de séparation et de flux de perméat [143].

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Réactifs, matières premières, souches bactériennes et milieux de culture

1.1. Réactifs

Une poudre commerciale de nisine, Taistar, a été utilisée pour les études de purification par électrodialyse. (Bake Biotechnology Co, Ltd, Hangzhou, Chine). Selon le fournisseur, ce produit contient 2,5% (p/V) de nisine.

Na₂SO₄ et le KCl ont été achetés auprès de BDH (VWR International Inc., Mississauga, ON, Canada)

Le HCl, le NaOH et le (NH₄)₂SO₄ ont été achetés auprès de Fischer Scientific (Montréal, QC, Canada).

Le kit de réactif pour mesure de protéine Pierce® BCA Protein Assay Kit a aussi été acheté auprès de Fischer Scientific (Montréal, QC, Canada).

L'extrait de levure a été acheté auprès de Difco Laboratories (Sparks, MD, USA)

1.2. Souches bactériennes

Deux souches productrices de nisine ont été utilisées au cours de ce projet de thèse :

- Une souche commerciale, *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454, (DSMZ, Braunschweig, Germany)
- Une souche isolée de lait de chèvre cru [145], *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* UL719 (*L. diacetylactis* UL719) a été obtenue auprès du Dairy Research Center (STELA, Université Laval).

Listeria innocua CIP 80.11 (Institut Pasteur, Lille, France) et *Listeria ivanovii* HPB28 (Health Protection Branch, Health and Welfare, Ottawa, ON, Canada) ont été utilisées

en tant que souches sensibles à la nisine pour la détermination de l'activité antimicrobienne de la nisine.

1.3. Milieux de fermentation

1.3.1. Milieu de culture

Pour le stockage, la préculture et la culture sur milieu commerciale, un milieu MRS (Man Rogosa et Sharp) a été utilisé pour les souches productrices *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454 et *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* UL719.

Pour le stockage et la préculture des souches sensibles à la nisine *Listeria innocua* CIP 80.11 et *Listeria ivanovii* HPB28 un milieu BHI (Brain Heart Infusion) et TSB (Tryptic Soy Broth) ont été utilisés respectivement pour les deux souches.

1.3.2. Co-produits :

Neuf co-produits de l'industrie agroalimentaire ont été sélectionnés pour les protocoles de production :

- 4 peptones issues d'hydrolysats de protéines végétales (peptone de pomme de terre (PdT), de papaïne de soja (PS), de pois et de soja (SF)) fournies par l'entreprise Solabia (Solabia S.A.S., Pantin, France).
- 4 peptones issues d'hydrolysats de protéines de poissons (dénommés Nutripeptin (NP), Protensin (ProS), Protizen (PZ) et Prolys (PY)) fournies par l'entreprise Copalis (Copalis, Boulogne Sur Mer, France).
- Un perméat de lactosérum (PL), sous forme de poudre, fourni par Agropur (Québec, Qc, Canada).

Tableau 2.1 : Composition (% base sèche) en azote et en carbone des différents co-produits et extraits de levure utilisés pour la composition des milieux de culture.

	YE	PL	PdT	PS	SF	Pois	NP	PY	PROS	PZ
Protéine		3.42 g.L ⁻¹								
Azote total	4,5%		11,5%	10,1%	10,0%	12,4%	12,8%	13,6%	12,8%	12,8%
Cendres sulfuriques	15%		8,5%	14,0%	13,0%	15,0%	13,5%	11,1%	13,2%	9,1%

Carbone total	2,72%	15,0%	15,0%	4,30%
NaCl	0,82%	0,2%	2,0%	1,3%

L'azote a été dosé par méthode BCA au laboratoire quand le carbone provient des données fournies par le fournisseur. Aucune donnée pour le carbone des hydrolysats de peptones de poissons n'a pu être obtenue.

2. Protocole de production

2.1. Préparation des milieux de cultures

Pour permettre la comparaison des différents co-produits en tant que milieu de culture, leur composition en azote a été quantifiée Tableau 2.1 afin d'homogénéiser l'apport en azote de chaque co-produit avec comme référence la quantité d'azote apportée par le milieu de culture commerciale MRS utilisé comme standard de comparaison.

Une fois les concentrations en co-produits ainsi qu'en supplémentation d'extrait de levure, les milieux ont été préparés en solubilisant les différents co-produits dans de l'eau distillée et ont été supplémentés en extrait de levure (4 g.L⁻¹). Le pH de chaque solution a été ajusté à pH 6.8 à l'aide de solution de NaOH 4M. Les solutions ont ensuite été stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 15min. La solution de glucose supplémenté en tween 80 (concentration finale 0.1 % (v/v) à elle été préparée et stérilisée parallèlement.

Pour le perméat de lactosérum, le milieu a été préparé en solubilisant la poudre de lactosérum dans l'eau distillée et le pH a été ajusté à pH 2.5 avant d'être stérilisé. Une fois stérile, le milieu a été supplémenté en extrait de levure, stérilisé parallèlement au perméat de lactosérum, et le pH ajusté à pH 6.8 à l'aide de NaOH 4M stérile. Le milieu n'a pas été supplémenté en glucose.

2.2. Conditions de fermentation pour comparaison des différents co-produits

Les différents milieux ont été disposés dans des erlenmeyers de 50 mL et ont été supplémentés en solution de glucose avec tween 80. Le volume final de fermentation est de 25 mL. Une préculture de 18 h (durant la nuit) de la souche productrice a été réalisée sur le milieu MRS. Chaque milieu de culture a été ensuite inoculé à 1% (v/v) par

la pré-culture. Les milieux inoculés ont ensuite été mis à incuber à 30°C sous agitation (70rpm) pendant 24 h. Après fermentation les milieux ont été repris et centrifugés à 3400 x g pendant 15 min afin de retirer la biomasse bactérienne. Les surnageants produits ont été ensuite chauffés à 80°C pendant 5min afin de neutraliser les possibles protéases présentes dans le milieu.

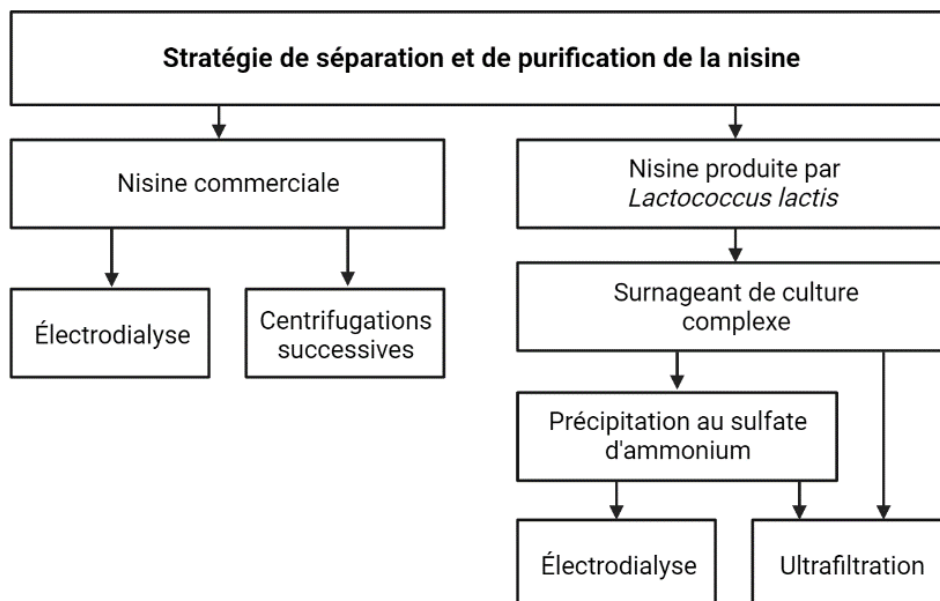
Les différents surnageants produits ont donc été testés en termes d'activité antimicrobienne et en masse sèche cellulaire afin de comparer la nisine et la biomasse produite afin de caractériser l'efficacité des différents co-produits pour la production de la nisine.

2.3. Production de la nisine sur un milieu à base de perméat de lactosérum

Pour les essais de séparation de la nisine par électrodialyse et ultrafiltration, la production a été réalisée avec la souche *L.lactis* UL 719 sur un milieu à base de perméat de lactosérum (8% p/v) supplémenté en extrait de levure (4 g.L⁻¹) et en tween 80 (0,1 % v/v). Une fermentation de 2 L en erlenmeyer durant 24 h a été réalisée en amont des essais de séparation. Après fermentation, la biomasse bactérienne a été retirée par centrifugation à 3500 x g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant de culture complexe produit est alors dénommé CFS (cell-free supernatant).

3. Procédés de séparation et de purification de la nisine

La stratégie de séparation et de purification de la nisine adoptée dans cette étude met en œuvre des procédés membranaires (électrodialyse (ED) et ultrafiltration (UF)) mais



aussi des techniques plus couramment utilisés (centrifugations successives et précipitation au sulfate d'ammonium) dans la purification de la nisine. La figure ci-dessous décrit la démarche générale.

Figure 2.1: Démarche mise en place pour la purification de la nisine selon les différentes techniques étudiées.

3.1. Purification de la nisine par centrifugations successives

Afin de comparer la purification de la solution de nisine commerciale par ED à un procédé connu, une méthode de purification par centrifugations successives a été mise en place en parallèle de l'ED. Pour cela la solution de nisine commerciale a été préparée en solubilisant la poudre commerciale dans l'eau distillée, et ce à deux concentrations différentes: 2% (p/V) correspondant à la concentration testée dans le procédé d'ED, et 27% (p/V) correspondant à la concentration employée dans le protocole publié par Gough et al (2017) sur lequel se base ce protocole [146]. Chaque solution a été mise à solubiliser toute une nuit à 4°C dans un volume de 50 mL, le pH préalablement ajusté à 3,8. Les solutions ont été ensuite centrifugés à trois reprises, en reprenant les culots produits dans 50mL d'eau distillée. Les trois centrifugations ont été réalisées à 16800 g et à 4°C pendant 15 min (

Figure 2.2). Selon Gough et al. [146], la fraction d'intérêt est contenue dans le culot final (fraction C3), les autres fractions produites étant écartées. Chaque fraction liquide (S1, S2, S3 et C3) a été testée en termes de pH, conductivité et activité antimicrobienne. Elles ont ensuite été lyophilisées pour être analysées par UPLC-MS.

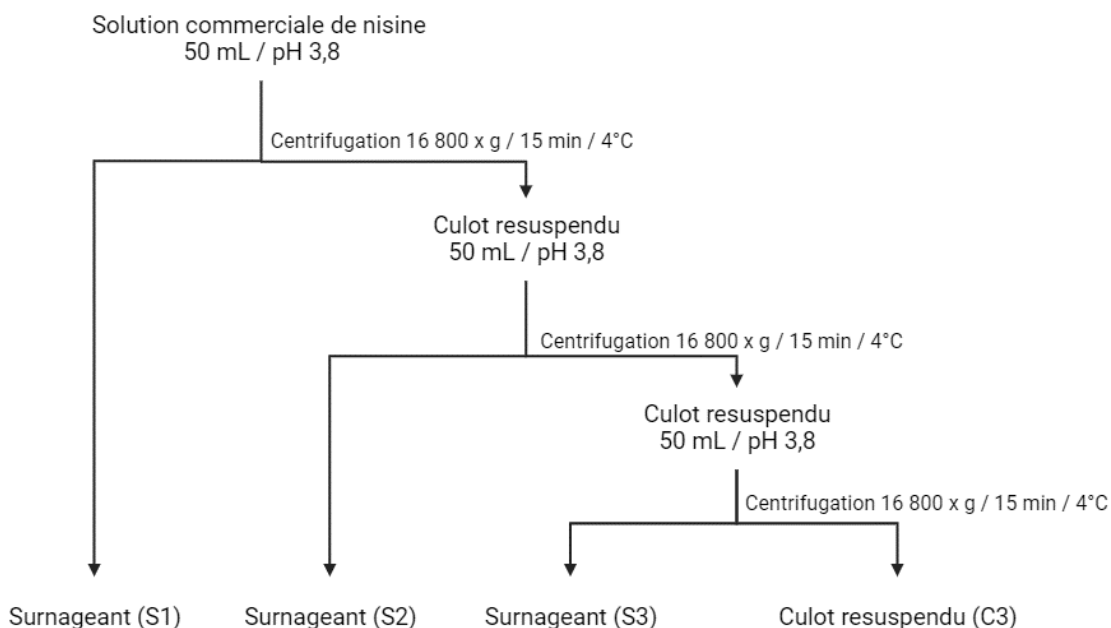


Figure 2.2: Organigramme de la purification de la nisine par centrifugations successives de la solution commerciale de nisine

3.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Une étape de précipitation au sulfate d'ammonium a été faite sur le CFS produit après production de la nisine par *Lactococcus lactis* UL 719 sur perméat de lactosérum. Pour cela un premier protocole de détermination de la concentration en sulfate d'ammonium a d'abord été fait.

3.2.1. Détermination de la saturation en sels de sulfate d'ammonium

Afin de déterminer la concentration optimale en sels pour récupérer la nisine du CFS, un protocole de précipitation au sulfate d'ammonium a été réalisé avec trois niveaux différents de saturation en sels habituellement utilisés en littérature [96,98,99] : 20, 40, et 60% de saturation en sulfate d'ammonium. Ces trois niveaux de saturation ont été testés sur des volumes de 200 mL de CFS. La précipitation a été faite pendant 3 h à 4°C et à faible agitation. Les solutions ont été ensuite centrifugées à 9000 x g pendant 60min à 4°C. Les culots ont été ensuite récupérés et resolubilisés dans 50 mL d'eau distillée, le pH ajusté à 3,8. Les solutions obtenues ont été ensuite testées en activité antimicrobiennes et en teneur en protéine. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

3.2.2. Production de fractions prépurifiées par précipitation au sulfate d'ammonium

Après détermination du niveau de saturation optimal en sulfate d'ammonium, une étape de précipitation au sulfate d'ammonium à 40% de saturation en sels a été appliquée à 4°C pendant 3 h et sous faible agitation sur un CFS de 2 L. La solution a été ensuite centrifugée à 9000 x g pendant 60min à 4°C. Le culot a ensuite été récupéré et resolubilité, le pH ayant été ajusté à 3,8. Pour le protocole d'ED, le culot a été resolubilité pendant la nuit à 4°C dans 350 mL d'eau distillée. Dans le cas du protocole d'UF, le culot a été resolubilité dans 500 mL d'eau distillée.

3.3. Séparation de la nisine par électrodialyse (ED)

3.3.1. Équipement d'électrodialyse

Le module d'électrodialyse utilisé consiste une cellule MP (ElectroCell AB, Täby, Sweden) développant une surface membranaire effective de 100 cm². Elle est composée de trois membranes échangeuse de cations (Neospeta CMX-fg) et de deux membranes échangeuse d'anions (Neosepta, AMX-fg), toutes étant de grade alimentaire (Astom, Tokyo, Japan). Les électrodes utilisées sont une électrode en acier inoxydable pour la cathode et une électrode stable (DSA-O₂) pour l'anode. La circulation des trois solutions (alimentation, récupération et électrolytes) est assurée par deux pompes centrifuges reliées à deux manomètres pour contrôler le débit, ainsi qu'une pompe péristaltique pour la solution d'alimentation. Le système a été monté en boucle pour permettre la recirculation des solutions.

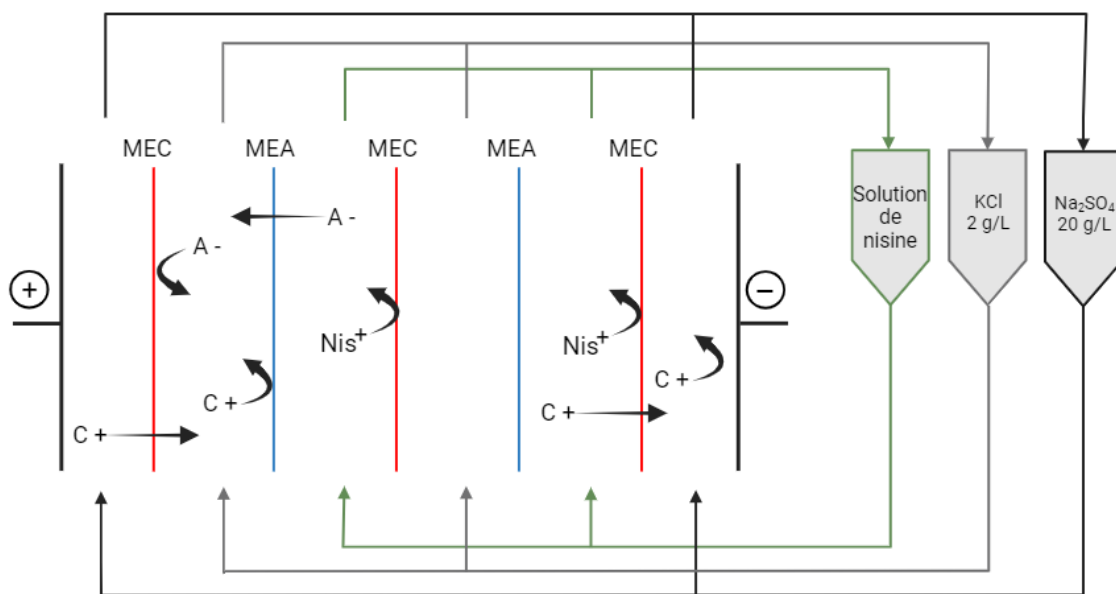


Figure 2.3 : Schéma du pilote d'électrodialyse utilisé pour le protocole. CEM : membrane échangeuse de cations ; AEM : membrane échangeuse d'anion

3.3.2. Purification d'une solution commerciale de nisine

La déminéralisation de la nisine par ED n'ayant pas été rapportée dans la littérature à notre connaissance, des tests préliminaires ont été mis en place afin de déterminer la faisabilité et les conditions nécessaires pour la purification d'une solution commerciale de nisine solubilisée à 2% (p/V). La solution commerciale a été préparée en solubilisant 7g de poudre commerciale dans 350mL d'eau distillée, le pH ajusté à 3,8 et a ensuite été mise à solubiliser toute une nuit à 4°C. Durant le procédé d'ED, le voltage a été maintenu constant à 10V (équivalent à $0,76 \pm 0,0$ A) durant le procédé, 10 V étant le voltage généralement appliqué pour un module de cette taille.

À la suite des tests de densité de courant limite ont été mis en place sur le module d'ED avec la méthode de Cowan et Brown [147]. La densité de courant limite correspond à la valeur de courant limite à laquelle la dissociation de l'eau apparaît lorsque l'intensité du courant augmente au-delà. Pour cela, le pilote d'ED a été testé avec la solution de nisine commerciale en circulation, ainsi que les solutions de KCl et de Na₂SO₄, en augmentant graduellement le voltage de 0,5 en 0,5 V et ce de 0 à 30 V. La mesure de l'intensité du courant au cours de l'augmentation graduelle du voltage permet de produire une courbe de la résistance du système (voltage/intensité) en fonction de la réciproque de l'intensité du courant (1/I). L'intersection de droites tangentielles extrapolées sur les plateaux ohmiques de la droite produite permet de déterminer la condition de courant limite [148].

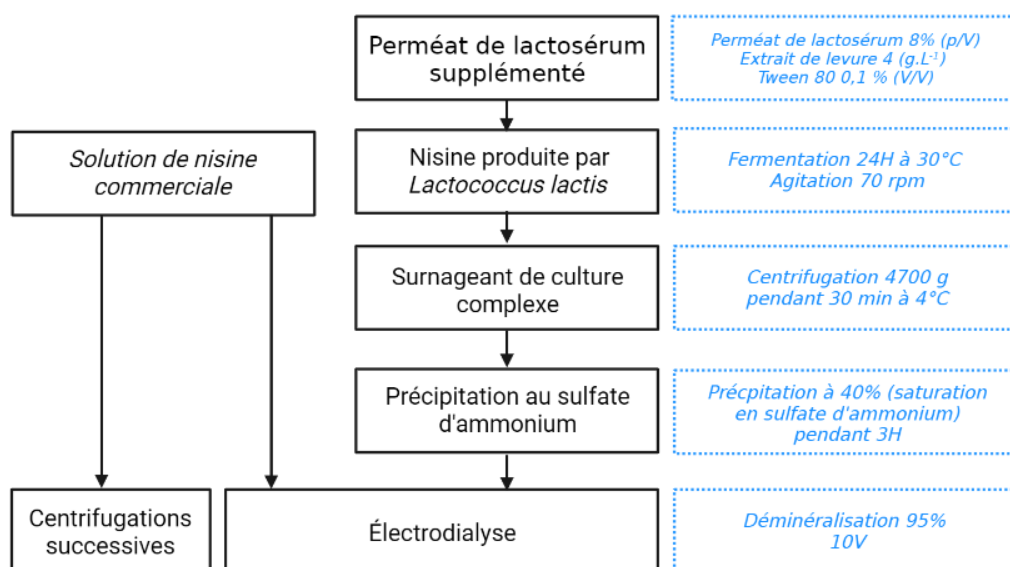
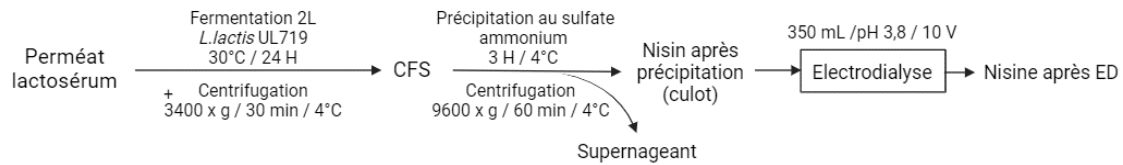


Figure 2.4 : Organigramme des protocoles mis en place pour la séparation de la nisine par ED et par centrifugations successives.

À la suite des résultats du test préliminaire, la purification de la solution commerciale de nisine a été mise en place dans les mêmes conditions, mais avec un contrôle du pH de la solution de nisine à pH 3,8, à l'aide d'une solution d'HCl à 1 M. Un échantillon de la solution de nisine commerciale a été pris toutes les 15min durant le procédé d'ED, la conductivité et le pH ont été mesurés tout le temps du procédé et ce jusqu'à atteindre 95% de taux de déminéralisation de la solution de nisine. La solution finale de nisine obtenue après ED a été lyophilisée afin de permettre la mesure de la teneur en protéine ainsi que l'analyse par UPLC-MS.

3.3.3. Purification par ED d'un surnageant de culture complexe

La séparation par ED s'est faite sur le culot resolubilisé dans les mêmes conditions décrites précédemment pour la purification de la solution commerciale : déminéralisation jusque 95% sous un voltage de 10 V et avec contrôle de pH à 3,8. La conductivité, le pH



et la prise d'échantillon pour l'activité antimicrobienne se sont aussi fait toutes les 15 min. À l'issue de la déminéralisation, la solution de nisine purifiée a été lyophilisée pour analyse chromatographique.

Figure 2.5: Organigramme de la purification de la nisine à partir d'un CFS par ED avec étape de précipitation au sulfate d'ammonium

3.4. Séparation par ultrafiltration

3.4.1. Équipement d'ultrafiltration

L'unité de filtration utilisée est un équipement de laboratoire LABCELL CF-1 (Koch Membrane Systems, Stafford, United Kingdom). Le système consiste en une cellule plane de 75mm développant une surface de membrane de 28 cm². Il est également constitué d'un réservoir à double paroi d'une capacité de 500 mL, d'un manomètre (1-10 bars), d'une vanne et d'une pompe centrifuge, ainsi que d'une arrivée d'eau dans la double paroi afin de contrôler la température de la cuve d'alimentation.

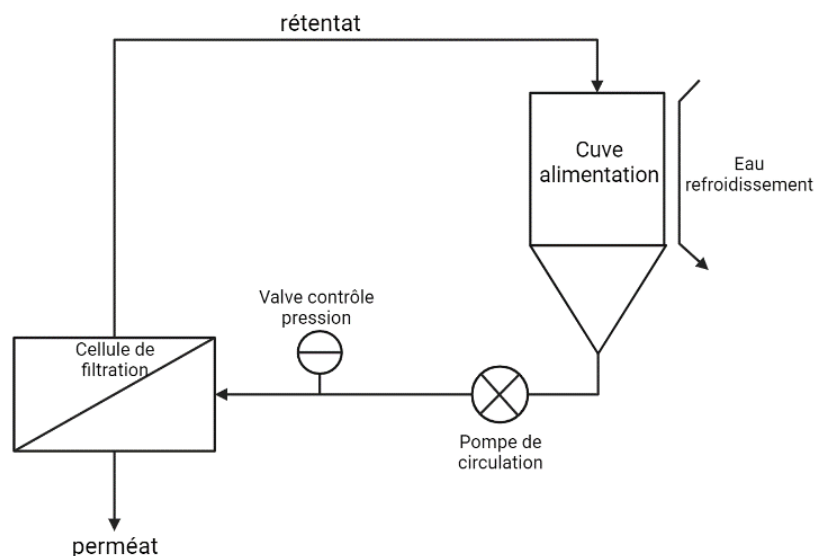


Figure 2.6: Schéma de l'équipement d'ultrafiltration.

Pour toutes les expériences d'ultrafiltration, une membrane HyStream TangenX de REPLIGEN (Waltham, Massachusetts, USA) d'un seuil de coupure de 10 kDa a été utilisée. Cette membrane a été sélectionnée pour ses performances reconnues pour la séparation des protéines tels que décrit dans la littérature [149]. Le tableau donne les caractéristiques données par le fournisseur.

Tableau 2.2: Propriétés et caractéristiques de la membrane HyStream TangenX utilisée en ultrafiltration

Caractéristiques	Description
Composition du substrat	Polypropylène
Composition de la membrane	PES modifiées – 70µm
Épaisseur	160 µm
Angle de contact	4 degrés
Charge de la membrane	Neutre
Surface de filtration	28cm ²
Pression maximale applicable	7 bar
Gamme de pH	1-14

3.4.2. Détermination de la pression de travail

La détermination de pression transmembranaire a été déterminée par une ultrafiltration avec recirculation du perméat et du rétentat à différentes PTM allant de 1 à 5 bars par augmentation de 0,5 bars. La courbe obtenue des flux de perméat en fonction de la PTM permet de déterminer graphiquement une valeur de PTM critique, la pression de travail choisi correspondant à <80% de cette valeur.

3.4.3. Séparation à partir d'un surnageant de culture complexe

La purification de la nisine à partir d'un surnageant de culture s'est faite après production de la nisine sur perméat de lactosérum supplémenté comme décrit précédemment. La purification par UF s'est faite sur deux CFS : un CFS produit comme décrit précédemment est soumis à une étape de précipitation aux sulfates d'ammonium et un CFS sans traitement préalable.

Le procédé d'UF s'est fait sur 500mL de solution de nisine (CFS avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium). (1) La solution a d'abord été concentrée sur membrane PES 10 kDa par application d'une pression de 2bar. La mesure du flux de

perméat et de la conductivité du rétentat a été faite tous les 30 mL de perméat atteints. La température du système a été contrôlée entre 18-20°C le temps du procédé. La concentration s'est fait jusqu'à atteindre un facteur de réduction volumique (FRV) de 5,0. (2) Une deuxième étape de diafiltration a été faite par resolubilisation du premier rétentat jusque 500mL de volume. La concentration s'est de nouveau fait jusqu'à atteindre un FRV de 5,0 avec une mesure du flux de perméat et de la conductivité du rétentat tous les 30 mL.

Un échantillon du CFS, des perméats produits et des rétentats produits ont été pris afin de permettre la mesure de l'activité antimicrobienne et de la quantité en protéine à chaque instant du procédé.

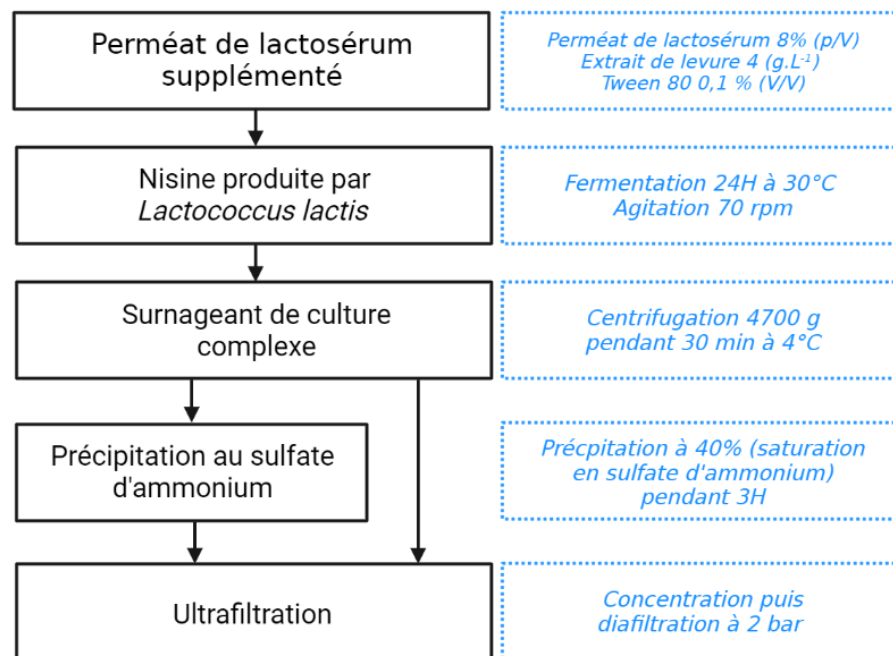


Figure 2.7 : Organigramme des protocoles mis en place pour la séparation de la nisine par ultrafiltration avec ou sans étape de précipitation au sulfate d'ammonium.

4. Analyses

4.1. Analyses globales

4.1.1. Mesure de la biomasse bactérienne

La croissance de biomasse après fermentation pour le protocole de production a été déterminée par mesure de la masse sèche cellulaire (CDW). Pour cela des échantillons de 2mL des milieux de culture après fermentation ont été pris et disposés dans des tubes

à Eppendorf. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 3400 x g pendant 30 min afin de culoter les cellules bactériennes. Les culots sont ensuite repris après élimination du surnageant et sont lavés par ajout de 1mL d'eau distillée suivi du mélange par vortex du culot resolubilisé. Les culots solubilisés sont ensuite recentrifugés afin d'être récoltés après élimination du surnageant d'eau distillée. L'étape de lavage est répétée une seconde fois. Après lavage des culots, ceux-ci sont mis à l'étuve à 100°C jusqu'à la stabilisation de la masse du tube. La masse finale pesée correspondant donc à la masse sèche cellulaire. La mesure de la CDW a été faite en duplicat pour chaque répliqua.

4.1.2. Quantification en protéines

La quantité de protéine a été déterminée avec la méthode de micro-BCA à l'aide d'un kit de quantification protéique Thermo Fischer scientifique (Pierce® BCA Protein Assay Kit). Les courbes standard ont été faites à l'aide de sérum-albumine (BSA) dans une gamme allant de 25 à 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Les tests de quantification ont été faits dans des microplaques de 96 puits selon le protocole fourni par le fournisseur du kit [150]. L'absorbance des puits a été mesurée à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque (Agilent BioTek PowerWave HT).

4.1.3. Activités antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne de la nisine a été déterminée par dilution critique en microplaque selon Meghrous et al [145]. Une dilution au demi de chaque échantillon a été faite dans 125 μL de milieu TSB (Tryptic Soy broth) sur une microplaque de 96 puits. Les puits ont ensuite été inoculés avec 50 μL d'un inoculum de souche sensible préparée « overnight » sur milieu TSB et dilué au 1/100. Les microplaques ont ensuite été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. L'activité de la nisine (en unité arbitraire AU.mL^{-1}) a été déterminée selon l'équation suivante :

Équation 1
$$\text{AU.mL}^{-1} = \frac{1000}{125} \times \frac{1}{d}$$

Où d est la plus grande dilution permettant une inhibition totale de la croissance de la souche sensible après incubation.

L'activité de la nisine a aussi été testée par diffusion sur gélose molle. Une gélose molle a été préparée par dépôt de 15 mL de solution de TSB à 1% d'Agar préalablement inoculé par 150 μL de pré-culture de souche sensible sur TSB. Une fois la gélose formée, des puits ont été formés à l'aide d'une pipette stérile de 5mL. 50 μL d'échantillons ont

été déposés dans les puits formés. Les boîtes de gélose ont ensuite été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. Les halos d'inhibition ont ensuite été pris en photo.

4.1.4. Détermination de l'activité spécifique

L'activité spécifique de la nisine a été caractérisée à l'aide de l'activité antimicrobienne totale et la quantité de protéine totale dans chaque échantillon.

L'activité totale de la nisine a d'abord permis de caractériser le rendement en activité antimicrobienne de la nisine par l'équation suivante :

$$\text{Équation 2} \quad \text{Rendement en activité de nisine (\%)} = \frac{\text{Activité totale (AU) de l'échantillon}}{\text{Activité totale (AU) initiale}}$$

L'activité spécifique a été caractérisée dans les protocoles de précipitations au sulfate d'ammonium, la purification par électrodialyse et la purification par ultrafiltration. L'activité spécifique a été déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Équation 3} \quad \text{Activité spécifique (AU.mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Activité totale (AU)}}{\text{Protéine totale (mg)}}$$

La détermination de l'activité spécifique a permis ensuite la caractérisation du facteur de purification selon l'équation suivante :

$$\text{Équation 4} \quad \text{Facteur de purification} = \frac{\text{Activité spécifique (AU/mg de protéine) au temps } x}{\text{Activité spécifique (AU/mg de protéine) au temps } 0}$$

4.2. Analyses liées aux protocoles d'électrodialyse

4.2.1. Caractérisation des membranes échangeuses d'ions

L'épaisseur et la conductivité des membranes échangeuse d'ions ont été mesurées sur chaque membrane d'ED avant et après purification de la nisine, et ceux afin d'identifier de possible colmatage sur les membranes. Les analyses ont été faites après avoir laissé les membranes dans une solution de NaCl à 0,5 M pendant 30 min.

La mesure de l'épaisseur a été faite à 6 différents endroits de la membrane en utilisant un micromètre électronique digital avec un point de contact plat de 10 mm de diamètre (Marathon watch company LTD, Richmond Hill, ON, Canada).

La conductance de la membrane a été déterminée à l'aide d'un conductimètre YSI de modèle 3100 Yellow Springs Instruments Co. (Yellow Springs, OH, USA) équipé d'une pince spécialement créée par le Laboratoire des Matériaux Échangeurs d'Ions (Université de Paris XII, Créteil, Val de Marne, France). La conductance de la membrane dans la solution de référence a été prise sur la surface effective de la membrane en 6 points différents. Comme décrit par Lebrun et al (2003) et Lteif et al (1999) [151,152], la résistance électrique de la membrane a été calculée selon l'équation (4) :

Équation 5
$$R_m = \frac{1}{G_m} = \frac{1}{G_{m+s}} - \frac{1}{G_s} = R_{m+s} - R_s$$

Où R_m et G_m sont respectivement la résistance électrique transverse (Ω) et la conductance (S) de la membrane. R_s et G_s sont respectivement la résistance (Ω) et la conductance (S) de la solution de référence alors que R_{m+s} et G_{m+s} sont respectivement la résistance (Ω) et la conductance (S) de la membrane et de la solution de référence.

La conductivité de la membrane a ainsi été calculée selon l'équation (5) :

Équation 6
$$\kappa = \frac{L}{R_m A}$$

Où κ est la conductivité de la membrane (S/cm), L l'épaisseur de la membrane (cm) et A la surface de l'électrode (1 cm²).

4.2.2. Mesure de la conductivité

La conductivité des solutions a été mesurée durant les protocoles de séparation et notamment le protocole de purification par ED afin de déterminer le taux de déminéralisation de la solution testée. La conductivité a été suivie à l'aide d'un conductimètre YSI model 3100 (constante de la cellule $k=1\text{cm}^{-1}$) de Yellow Springs Instruments Co. (Yellow Springs, OH, USA). La conductivité a ensuite été utilisée pour déterminer le taux de déminéralisation selon l'équation suivant :

Équation 7
$$\text{taux de déminéralisation (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Conductivité au temps } x}{\text{Conductivité initiale}}\right) \times 100$$

4.2.3. Analyses par UPLC-MS

Pour les protocoles de séparation avec le pilote d'ED, le facteur de concentration de la nisine a été déterminé sur les échantillons à 1% (p/v) après lyophilisation. La nisine a

été séparée et identifiée par chromatographie liquide ultra-haute performance (UPLC 1290 Infinity II, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) couplée à un spectromètre de masse de type quadrupole-temps de vol (Q-TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Un volume de 20 µL d'échantillon a été chargé sur une colonne Poroshell 120 EC-C18 (2,1 x 100 mm i.d., 2,7 µm, Agilent, Santa Clara, USA) à un débit de 400µL.min⁻¹. L'élution a été réalisée à 45°C à l'aide d'un gradient en acétonitrile (ACN) en utilisant un solvant A (H₂O + 0,1% d'acide formique) et un solvant B (ACN + 0,1% acide formique) comme suit : de 3% à 22% de solvant B en 15min, de 22% à 28% de solvant B en 5 min, de 28% à 45% de solvant B en 5 min suivi des étapes de lavage et d'équilibration de la phase stationnaire avec respectivement 95% et 3% de solvant B pendant 3 minutes. L'élution des molécules a été suivie par mesure de l'absorbance à 214 nm et par spectrométrie de masse. Les molécules éluées ont été désolvatées avec de l'azote (13,0 L.min⁻¹, 150°C) utilisé comme gaz nébuliseur (30 psi). Les différents voltages ont été définis à 400 V pour la fragmentation, 300 V pour l'aiguille et 3500 V pour le capillaire. Les analyses ont été faites en mode positive à 2 Ghz et détection des signaux jusqu'à 3200 m/z. L'acquisition des données et l'analyse ont été faites via l'ensemble logiciel Agilent Mass Hunter (LC/MS Data Acquisition, Version B.09.00 and Qualitative Analysis for IM-MS, Version B.07.00 Service Pack 2 with BioConfirm Software).

4.3. Analyses liées aux protocoles d'ultrafiltration

4.3.1. Caractérisation des flux de perméat des membranes

4.3.1.a Flux de perméat à l'eau pure

Avant et après chaque traitement, le flux de perméat à l'eau (J_{w0}) a été mesuré pour chaque membrane à différentes pressions transmembranaires. La perméabilité à l'eau (L_{p0}) pour chaque membrane a été obtenue après via la droite de régression obtenue par la courbe de calibration de flux de perméat en fonction de la pression et selon :

$$\text{Équation 8} \quad J_{w0} = L_{p0} \times \Delta P = \frac{\Delta P}{\mu R_m}$$

Où J_{w0} est le flux de perméat de l'eau en m³.m⁻².s⁻¹, L_{p0} la perméabilité de l'eau en .s⁻¹.Pa⁻¹, μ la viscosité de l'eau (Pa.s), ΔP est la pression transmembranaire (Pa) et R_m la résistance intrinsèque de la membrane (m⁻¹).

4.3.1.b Flux de perméat au cours du procédé

Le flux de perméat (J_p) au cours du procédé de séparation par ultrafiltration a été mesurée par la prise du volume de perméat, à un temps donné de la séparation, au travers la surface membranaire tel que :

Équation 9
$$J_p = \frac{V_p}{A \times t}$$

Où J_p représente le flux de perméat ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), V_p le volume de perméat (m^3) prélevé sur un temps t (s) et A l'aire de la surface de la membrane (m^2).

4.3.2. Caractérisation de l'efficacité du lavage et de l'indice de colmatage

A la fin de la filtration une étape de rinçage à l'eau suivie d'une étape de lavage ont été appliquées. L'étape de rinçage a été faite après avoir vidée la cuve d'alimentation et après avoir rincer la membrane avec l'eau pendant 10min, et ce afin de retirer les dépôts réversibles. Après rinçage, le flux de perméat à l'eau de la membrane a été mesuré (L_{p1}). La membrane a ensuite été soumise à une étape de nettoyage chimique. Pour cela une solution de 500 mL de NaOH 0,02 M avec 3 mL de solution de NaClO à 3,6% a été mise en recirculation dans le système pendant 90min. Une étape finale de rinçage à l'eau mise en recirculation a été faite jusqu'à obtenir un pH neutre. A la fin de l'étape de nettoyage le flux de perméat à l'eau de la membrane a de nouveau été mesuré (L_{p2}) et l'efficacité du nettoyage (EN) a pu être évaluée selon Conidi et al [153] :

Équation 10
$$EN = \left(\frac{L_{p2}}{L_{p0}} \right) \times 100$$

Où L_{p2} est la perméabilité à l'eau de la membrane après nettoyage ($\text{m} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et L_{p0} la perméabilité à l'eau de la membrane neuve avant traitement ($\text{m} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

La mesure des flux de perméat de la membrane à différent moment de la filtration a aussi permis de caractériser l'indice de colmatage (IC) de la membrane en comparant le flux de perméat à l'eau de la membrane avant et après ultrafiltration comme décrit par Romero-Dondiz et al [154] :

Équation 11
$$IC = \left(1 - \frac{L_{p1}}{L_{p0}} \right) \times 100$$

Où L_{p1} est la perméabilité à l'eau de la membrane après rinçage à l'eau ($m.Pa^{-1}.s^{-1}$) et L_{p0} la perméabilité à l'eau de la membrane neuve avant traitement ($m.Pa^{-1}.s^{-1}$).

4.3.3. Caractérisation de la résistance en série

Un modèle de résistance en série a été appliqué sur afin de caractériser le colmatage de la membrane d'ultrafiltration. Selon ce modèle, un déclin du flux de perméat peut se caractériser par la résistance totale de filtration (R_m) et la résistance due au colmatage (R_{fc}), laquelle peut être divisée entre résistance réversible (R_{rev}) et résistance irréversible (R_{irr}), tel que :

$$\text{Équation 12} \quad J_p = \frac{\Delta P}{\mu R_m} = \frac{\Delta P}{\mu (R_m + R_{fc})} = \frac{\Delta P}{\mu (R_m + R_{irr} + R_{rev})}$$

Où J_p représente le flux de perméat ($m^3.m^{-2}.s^{-1}$), ΔP est la pression transmembranaire (Pa) et μ la viscosité du perméat (Pa.s). Toutes les résistances R_t , R_{fc} , R_{irr} et R_{rev} sont exprimées en m^{-1} . R_m a été dérivé à partir du flux d'eau distillée, J_w , selon Équation 8. R_t a été déterminé à l'aide du flux de perméat à l'état stable, J_s . R_{irr} a été obtenu à partir des mesures de flux de perméat après l'étape de rinçage. Enfin R_{rev} a été obtenu en faisant la différence entre R_t et la somme des R_m et R_{irr} .

4.3.4. Bilan de matière

Le bilan de matière en termes de protéine et de matière sèche a été déterminé pour les différents rétentat et perméat issus des protocoles d'ultrafiltration. La teneur en protéine a été mesurée comme décrit dans la section 4.1.2. La matière sèche a été mesurée par séchage des échantillons des différentes fractions à 105°C à l'aide d'un analyseur d'humidité à infrarouge Precisa XM60 (Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Switzerland). La teneur en matière sèche est alors estimée en pourcentage.

La mesure de la quantité en protéine et en matière sèche dans le CFS, la solution prépurifiée au sulfate d'ammonium, ainsi que dans les différentes fractions issues de leur ultrafiltration (R1, P1, R2 et P2) permet alors de déterminer le bilan de matière des procédés telle que :

$$\text{Équation 13} \quad \text{Bilan de masse (\%)} = \frac{C_p V_p + C_R V_R}{C_0 V_0}$$

Où C_p et C_R correspondent à la concentration en protéine ou en matière sèche du perméat et du rétentat respectivement. V_p et V_R correspondent au volume du perméat et du rétentat. C_0 et V_0 correspondent à la concentration en protéine ou en matière sèche et au volume de la solution initial (CFS ou solution prépurifiée).

Chapitre III : Production de la nisine à l'aide de co-produits

1. Introduction

L'objectif de ce chapitre concernant la production de la nisine a été de rechercher des milieux alternatifs à l'utilisation du milieu commerciale MRS. Différents co-produits issus de l'industrie agroalimentaire ont été testés : quatre hydrolysats de peptones végétales (papaïne de soja (PS), pomme de terre (PdT), soja F (SF) et de pois) ont été fournis par l'entreprise SOLABIA. Quatre autres hydrolysats de peptones de poissons ont été fournis par l'entreprise Copalis. Ces hydrolysats de poissons ont été produits à partir de déchets de l'industrie poissonnière et diffèrent selon les parties de poissons utilisés pour l'hydrolyse des protéines : les quatre hydrolysats ont été dénommés par l'entreprise par Nutripeptin (NP), Protensin (PROS), Prolys (PY) et Protenzin (PZ). Ces co-produits représentent des milieux de culture innovants, l'utilisation d'hydrolysats de poissons étant peu reportée dans la littérature pour la production de la nisine et des bactériocines en général. Les hydrolysats de protéines végétales représentent eux aussi des co-produits d'intérêts, notamment les peptones de pois et de pomme de terre, du fait de leur origine végétale plus acceptable d'un point de vue législative du fait des applications agroalimentaires de la nisine (allergénicité, non-origine animale ...). Les différents milieux ont été testés pour la production de la nisine avec deux souches productrices différentes du genre *lactococcus lactis*. Les milieux ont été comparés sur une même base d'apport d'azote et par la mesure de la biomasse produite et de l'activité antimicrobienne mesurée après fermentation. Pour optimiser la mesure de l'activité antimicrobienne, deux souches sensibles ont aussi été testées.

2. Résultats et discussion

2.1. Détermination de l'apport en co-produit

Afin de permettre la comparaison de la production de la nisine sur les différents co-produits testés, la quantification de leur azote total a été faite (Tableau 2.1) et ce afin d'homogénéiser la quantité d'azote apporté par chaque co-produit. La quantité d'azote à apporter a été déterminée selon la quantité apportée par le milieu MRS utilisé comme milieu standard, permettant selon la littérature le plus grand rendement en nisine en termes d'activité antimicrobienne. La quantité pour chaque poudre d'hydrolysats issus

de co-produits a été répertoriée dans le Tableau 3.1. Le choix de la supplémentation en

Composition g/L	MRS	PL	PdT	Papaïne soja	Soja	Pois	NP	PY	PROS	PZ
Glucose	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Extrait de levure	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Extrait de viande	8,0									
Peptone	10,0									
Poudre de peptone (co-produit)			10,8	12,6	12,1	12,9	9,8	9,3	13,1	10,1
K ₂ HPO ₄	2,00									
MgSO ₄	0,20									
Acétate de sodium	2,00									
Tween 80 % (v/v)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

glucose comme source de carbone est justifié par sa présence dans le milieu MRS, mais aussi par la littérature où diverses études ont démontré de meilleur rendement en bactériocines lorsque le glucose était utilisé pour la fermentation des bactéries lactiques comparées aux autres monosaccharides [155].

Tableau 3.1 : Supplémentation des milieux de culture en fonction du milieu commercial MRS

2.2. Comparaison des co-produits pour la production de la nisine

2.2.1. Production de biomasse

La quantification de la biomasse produite par mesure de la masse sèche cellulaire pour chaque milieu de culture est présentée sur la Figure 3.1. La mesure de la masse sèche cellulaire n'a pas permis de montrer de différence significative ($p > 0,05$) entre les différents co-produits qu'ils soient de source végétale ou animal avec des CDW allant de $26,00 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ pour le milieu PdT avec la souche *L.lactis* ATCC 11454 jusque $35,15 \pm 6,5 \text{ g.L}^{-1}$ pour le milieu PdT avec la souche *L.lactis* UL719, Les milieux Pdt (avec UL 719) et PY (avec ATCC 11454) sont cependant caractérisés par des écarts types élevés comparés aux autres CDW. Les CDW mesurées sur les milieux issus des co-produits sont significativement plus faibles que celles mesurées pour le milieu MRS et perméat de lactosérum avec une CDW la plus élevée pour le perméat de lactosérum peu importe

la source productrice avec des valeurs de $80,5 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ et $83,2 \pm 2,0 \text{ g.L}^{-1}$ pour *L.lactis* ATCC 11454 et *L.lactis* UL 719 respectivement.

Figure 3.1 : Quantification de la biomasse produite après fermentation sur co-produits par mesure de la masse sèche cellulaire (CDW) en g.L^{-1}).

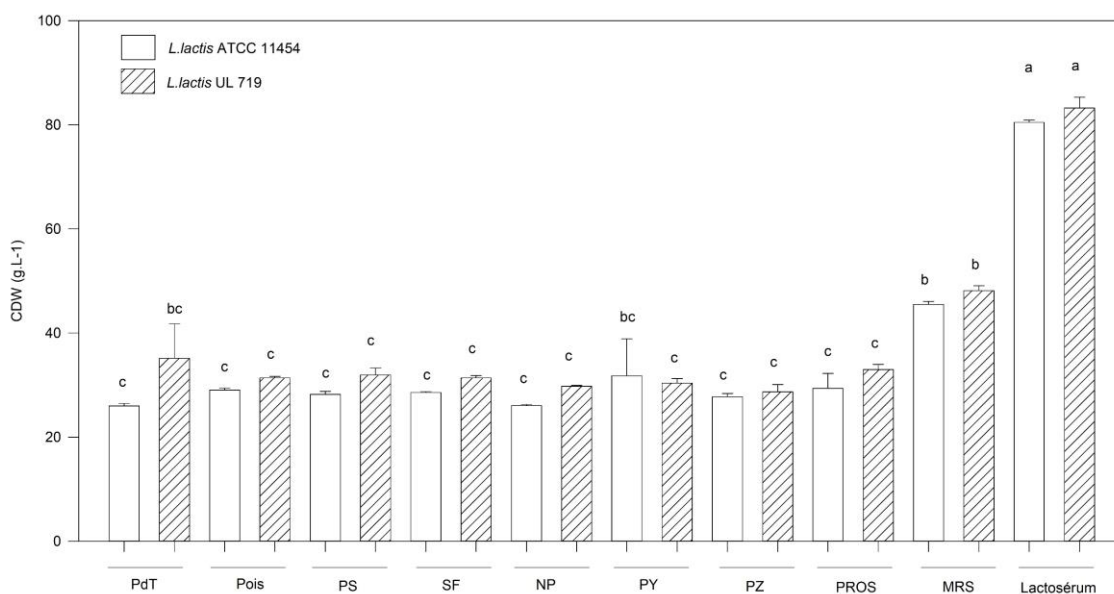


Figure 3.2 : Quantification de la biomasse produite après fermentation sur co-produits par mesure de la masse sèche cellulaire (CDW) en g.L^{-1}).

2.2.2. Mesure de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de la nisine produite par les deux souches productrices *L.lactis* UL 719 et *L.lactis* ATCC 11454 a été mesurée sur les différents milieux après fermentation ainsi que sur deux souches sensibles *L.innocua* CIP 80.11 et *L.ivanovii* HPB28. Les résultats sont présentés sur les Figure 3.3 pour l'activité testée sur *L.innocua* CIP 80.11 et la Figure 3.4 pour l'activité testée sur *L.ivanovii* HPB28.

Sur la Figure 3.3 nous pouvons observer de plus fortes activités antimicrobiennes sur l'ensemble des milieux de fermentation avec la souche *L.lactis* UL 719 (Figure 3.3a) comparé à la souche commerciale *L.lactis* ATCC 11454 (Figure 3.3b). Les peptones végétales de pois, PS et SF ainsi que les peptones de poissons PROS donnent les plus grandes activités antimicrobiennes de 128 AU.mL^{-1} , comparable à celle trouvée dans le milieu MRS et ce pour la souche productrice UL 719 (Figure 3.3a). Cependant

différentes activités sont observées avec la souche ATCC 11454 avec de meilleures activités pour les peptones de poissons PY avec une activité mesurée de 64 AU.mL⁻¹ (Figure 3.3b), moindre que l'activité mesurée sur le milieu MRS à 12 AU.mL⁻¹ et comparable à celle observée pour la souche UL 719. Les activités mesurées après fermentation de la souche *L.lactis* ATCC 11454 sont donc dans leur ensemble inférieur à celles mesurées après fermentation de la souche *L.lactis* UL 719.

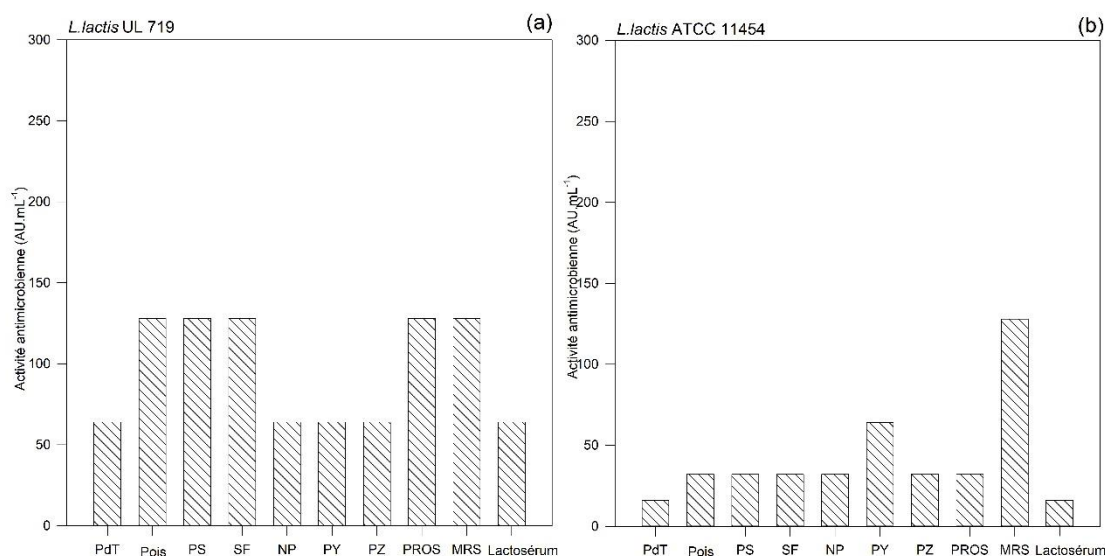


Figure 3.3 : Activités antimicrobiennes issues de la fermentation des deux souches *L.lactis* UL 719 (a) et *L.lactis* ATCC 11454 (b) sur les différents co-produits testés sur la souche sensible *L.innocua* CIP 80.11.

Les mêmes observations sont faites concernant les activités antimicrobiennes mesurées pour les deux souches après fermentation lorsque les activités sont testées sur la souche sensible *L.ivanovii* HPB 28 (Figure 3.4). Les activités antimicrobiennes sont dans leur ensemble plus élevées après fermentation de la souche UL 719 (Figure 3.4a) sur les différents milieux comparées à celles mesurées après fermentation de la souche ATCC 11454 (Figure 3.4b) avec des activités allant de 64 à 256 AU.mL⁻¹ pour la souche UL 719 et de 32 à 128 AU.mL⁻¹ pour la souche ATCC 11454. Cependant, des résultats différents sont observés concernant l'activité mesurée selon les milieux de culture : les hydrolysats de peptones végétales de pois et de poisson PROS donnent les meilleures activités antimicrobiennes avec la souche UL 719 avec des activités de 128 AU.mL⁻¹, égales à l'activité mesurée sur le milieu MRS. Les activités mesurées après fermentation de la souche ATCC 11454 ne permettent pas de différencier de milieux de culture plus efficace que les autres avec des activités allant de 32 à 64 AU.mL⁻¹, les plus grandes activités étant mesurées sur le milieu PY.

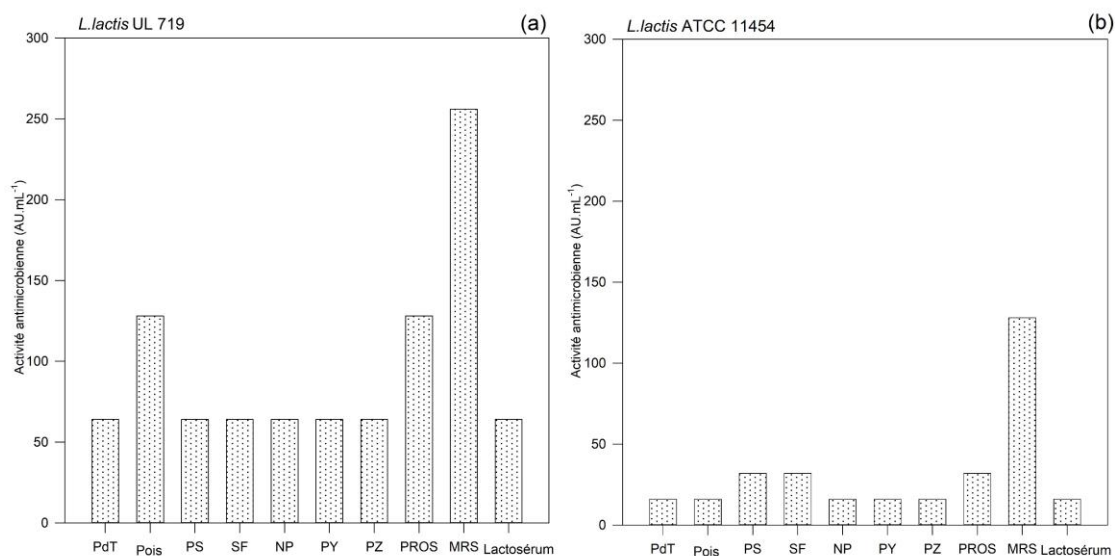


Figure 3.4: Activités antimicrobiennes issues de la fermentation des deux souches *L.lactis* UL 719 (a) et *L.lactis* ATCC 11454 (b) sur les différents co-produits testés sur la souche sensible *L.ivanovii* HPB 28.

Ces résultats permettent de confirmer que la souche productrice *L.lactis* UL 719 permet une plus grande production de nisine comparée à la souche *L.lactis* ATCC 11454 lorsque les activités sont testées sur les deux souches sensibles à la nisine. Ces résultats permettent aussi aux peptones de pois et les peptones de poisson PROS de se démarquer avec les activités les plus élevées avec *L.lactis* UL 719 avec des activités de 128 AU.mL⁻¹ sur les deux souches sensibles. Les hydrolysats PS et SF donnent eux aussi une activité de 128 AU.mL⁻¹ lorsque l'activité de la nisine est testée sur la souche sensible *L.innocua* CIP 80.11. Ces activités sont comparables à celles mesurées pour le milieu MRS avec la même activité mesurée sur ces co-produits lorsque l'activité est testée sur la souche *L.innocua* CIP 80.11, mais inférieure à celle retrouvée pour le MRS lorsque testé sur la souche *L.ivanovii* HPB 28 avec une activité de 256 AU.mL⁻¹. Ces activités mises en parallèle des CDW mesurées après fermentation (Figure 3.1) permettent de montrer une différence entre croissance bactérienne et production de nisine. Bien que les CDW mesurées ne soient pas significativement différentes ($p > 0,05$) pour l'ensemble des co-produits testés (CDW allant de 26,0 à 35,15 g.L⁻¹), l'activité de la nisine diffère. Cette différence de production entre la biomasse et la nisine est particulièrement explicite pour le lactosérum permettant la plus forte croissance de biomasse ($83,25 \pm 2,05$ et $80,5 \pm 0,42$ pour *L.lactis* UL 791 et *L.lactis* ATCC 11454 respectivement) tout en démontrant la plus faible production de nisine en termes de mesure d'activité antimicrobienne avec une activité de 16 AU.mL⁻¹ avec la souche *L.lactis* ATCC 11454 et une activité de 64 AU.mL⁻¹ avec la souche *L.lactis* UL 719.

Ces observations sont à mettre en contraste avec ce qui a pu être rapporté dans la littérature concernant le lien entre production de biomasse et de nisine. La production des bactériocines et donc de la nisine semble dépendante de la production de la biomasse, la nisine étant produite en fin de phase de croissance exponentielle de la biomasse et s'estompant en phase stationnaire [29,39,40,156]. Différentes études ont pu mettre en relation une plus grande production de nisine lorsque la concentration en biomasse était plus importante [157,158], plusieurs études ont pu mettre en évidence le fait qu'une forte production de biomasse n'était pas synonyme de fort rendement en nisine. Leroy et al (1999) ont par exemple démontré le faible rendement de nisine issu d'une fermentation par la faible production spécifique de la nisine par la souche productrice [42]. Jozala et al (2007) [77] ont eux aussi montré que la production maximale de nisine n'était pas retrouvée dans le milieu ayant démontré la plus forte production de biomasse.

Ces différences peuvent s'expliquer par la différence de composition des milieux notamment en source de carbone, celle-ci étant fortement différente selon le milieu (Tableau 2.1). Bien que l'apport en source de carbone se fasse majoritairement via la supplémentation en glucose (20 g.L^{-1}), sauf pour le perméat de lactosérum, les co-produits présentent des concentrations en carbone différentes avec les hydrolysats de pois et de pomme de terre avec les plus faibles concentrations (4,3 et 2,72 % respectivement) contrairement aux hydrolysats de papâines de soja et de soja F (15%). Différentes études ont démontré que le rendement en nisine était dépendant de la concentration de la source de carbone du milieu de culture [156]. La source de carbone semble donc jouer un rôle important dans la régulation de la production de la nisine. Ceci est supporté dans la littérature par différentes études démontrant notamment un lien entre la concentration en source de carbone fermentescible et la biosynthèse de la nisine [159,160]. Le couple C/N est un indice important dans la compréhension de la production de la biomasse et de la nisine. Penna et al (2002) ont par exemple démontré un ratio C/N de 0,17 pour une production optimale de la nisine sur milieu MRS supplémenté [156]. Guerra et al (2002) décrivent eux un ratio C/N optimal pour la production des bactériocines entre 1,66 et 1,99 [48] démontrant une plus faible production de biomasse lorsque la concentration de la source de carbone est trop élevée. Cependant, les différents ratio C/N observés pour les co-produits, 0,23, 0,34, 1,48 et 1,5 pour les hydrolysats de pomme de terre, de pois, de papâine de soja et de soja F respectivement, ne permettent pas de confirmer les observations faites dans la littérature concernant un ratio optimal pour la production de nisine. Selon le ratio optimal observé par Guerra et al

(2002), les hydrolysats de papaïne de soja et de soja F devraient donner les plus grandes activités antimicrobiennes [48]. Un plus faible ratio C/N pour les hydrolysats de pois et de pomme de terre ne permettant pas non plus, comme décrit par Penna et al (2002) [156], une plus forte production, bien que l'hydrolysate de protéine de pois donne la plus grande activité antimicrobienne avec la souche UL 719 (Figure 3.4a).

L'apport d'autres nutriments par les co-produits peut aussi permettre de comprendre les différences observées en termes d'activité. De Vuyst et al (1995) [67] ont montré que les acides aminés de sérine, de thréonine et de cystéine avaient un fort pouvoir stimulant sur la production de la nisine et ce sans affecter le rendement en biomasse de la souche productrice. L'influence de ces AA démontre leur rôle important comme précurseur à la production de la nisine. De plus, l'ajout de ces AA a permis de montrer que la cystéine a une plus grande influence comparée à la thréonine et la sérine sur la production de la nisine. La composition de la nisine en cystéine et en AA sulfurés permet aussi d'expliquer l'influence de la cystéine dans la production de la nisine. Le fait que la cystéine ne soit pas un AA essentiel pour la croissance des souches de *L.lactis* permet d'expliquer la plus forte production de nisine malgré la plus faible quantité de biomasses produite à la fin de la fermentation comme c'est le cas des milieux issus des co-produits lorsque ceux-ci sont comparés au perméat de lactosérum notamment (Figure 3.1) [161]. La présence d'autres composés sulfurés pourrait donc aussi induire la production de la nisine la souche *L.lactis* pouvant assimiler le sulfate qu'il soit sous forme organique ou inorganique [67]. La composition en cendres sulfuriques des milieux testés pourrait donc aussi influencer sur la production de nisine par l'apport de différents minéraux, l'hydrolysate de protéine de pomme de terre étant par exemple plus pauvre en minéraux (8,3%) que les 3 autres hydrolysats végétaux (de 13 à 15%).

3. Conclusion

Les bactéries lactiques représentent des souches bactériennes exigeantes nécessitant des milieux riches en nutriment pour soutenir leur croissance. L'utilisation de milieux de culture commerciaux permet de produire la nisine en grande quantité, comme démontré ici avec le milieu MRS donnant les plus grandes activités antimicrobiennes peu importe la souche (128 à 256 AU.mL⁻¹) en accord avec la littérature [77,162]. Les résultats obtenus avec les différents co-produits en termes d'activité permettent d'envisager leur utilisation comme milieu de culture moins cher et moins riche en nutriment (comparé au MRS). Les hydrolysats de peptones de pois et de poisson PROS montrant notamment

les meilleures activités antimicrobiennes, avec la souche la plus productive *L.lactis* UL 719, de 128 AU.mL^{-1} , soit une activité correspondant à la moitié de celle mesurée sur milieu MRS avec une production de biomasse plus faible. Ces résultats ont aussi permis de montrer que la production de biomasse n'était pas nécessairement liée à la production de nisine. La biomasse obtenue après fermentation sur perméat de lactosérum est deux fois plus élevée ($83,25 \pm 2,05$ et $80,5 \pm 0,42 \text{ g.L}^{-1}$ pour les souches ATCC 11454 et UL 719 respectivement) que pour le milieu MRS ($48,15 \pm 0,91$ et $45,5 \pm 0,56 \text{ g.L}^{-1}$ pour les souches ATCC 11454 et UL 719 respectivement) alors que le perméat de lactosérum présente l'activité antimicrobienne la plus faible peu importe la souche productrice.

L'utilisation de co-produits représente donc un intérêt particulier pour la production de la nisine, d'une part afin de réduire ses coûts de production et donc son rendement, mais aussi pour permettre de produire la nisine dans un milieu de culture moins complexe facilitant les procédés de purification suivant la production. L'optimisation de leur supplémentation ou de leur ration C/N permettrait d'améliorer la production de nisine à partir de ces milieux alternatifs, notamment le mode d'apport en glucose qui est un point clef à l'amélioration de la production de la nisine, la littérature reportant une préférence par les souches *L.lactis* à l'utilisation du glucose comme source de carbone. Elle rapporte aussi l'importance de son mode d'apport avec certaines études démontrant l'amélioration de la production de la nisine lorsque le glucose est apporté sous forme d'alimentation continue, à une concentration fixe, durant la fermentation [60,158]. Une des principales limites à la production de la nisine est l'arrêt de la croissance bactérienne et de la production de la nisine sur fait de la concentration en acide lactique produit durant la fermentation, différentes études ayant démontré l'efficacité de réguler le pH et la production d'acide lactique pour la production de la nisine [59,163]. L'amélioration de la production de la nisine sur ces différents co-produits passe donc par le contrôle de l'apport en source de carbone et des différents paramètres de fermentation.

**Chapitre IV : Séparation de la nisine par
électrodialyse – Étude de sa purification à
partir d'une solution commerciale**

1. Introduction

Comme décrit dans les chapitres précédents, l'utilisation de la nisine est actuellement limitée du fait de faible rendement de production, mais aussi par la complexité de sa purification. Une des principales méthodes utilisées actuellement étant la précipitation au sel, notamment au sulfate d'ammonium ou au chlorure de sodium. La nisine se présente donc actuellement sous la forme de poudre commerciale riche en sels et ne contenant que de 0,5 à 5% de nisine [12]. Cependant, ces techniques se caractérisent par la production importante d'effluent salin dont le traitement et le rejet représentent des problèmes environnementaux et économiques [164]. C'est donc dans ce contexte que nous nous intéressons ici à l'utilisation de l'ED dans la déminéralisation et la purification de la nisine à partir d'une solution commerciale riche en sels. En effet, l'ED étant communément employée dans le dessalement et la séparation de différentes molécules chargées et protéines via l'application d'un gradient de potentiel électrique [165]. Elle est notamment appliquée dans le traitement de l'eau et des eaux de rejet et se caractérise par une faible consommation énergétique, lorsque comparée aux autres méthodes thermiques notamment [166]. Elle est aussi notamment appliquée dans l'industrie agroalimentaire pour la déminéralisation du lactosérum et du lait [144,167], mais aussi dans la récupération et la séparation de protéines comme les protéines de soja ou de lactosérum [142]. L'ED se présente donc comme un procédé éco-efficient et donc d'intérêt dans la purification de la nisine. À notre connaissance, aucune étude n'a été rapportée dans la littérature concernant l'utilisation de l'ED pour la purification de la nisine. L'objectif de ce chapitre est donc de démontrer la faisabilité de la purification de la nisine par ED en comparant la purification à partir d'une solution de nisine commerciale par ED à une méthode de centrifugations successives communément utilisée et employée dans la littérature [146].

2. Purification par électrodialyse

2.1. Test préliminaire de déminéralisation et phénomène de colmatage induit

2.1.1 Évolution du taux de déminéralisation, du pH et de l'activité antimicrobienne

La solution de nisine commerciale a été traitée par ED jusqu'à atteindre un taux de déminéralisation de 91,3%, et ce sans contrôle de pH ou de conductivité afin d'observer le comportement des différents paramètres et leur impact sur l'efficacité du procédé. La mesure du pH de la solution de nisine commerciale et de la solution de KCl a permis d'observer un changement dans l'évolution du pH de la solution de nisine commerciale

(Figure 4.1a). Le pH de la solution de KCl a, lui, diminué pendant les 60 premières minutes de traitement jusqu'à atteindre un pH de 2,93 pour ensuite augmenter pour atteindre un pH final de 4,68 (Figure 4.1a). Dans le même temps, le pH de la solution de nisine a augmenté rapidement après 45min de traitement, allant de pH 5,25 à 10,62 en moins de 15min de traitement.

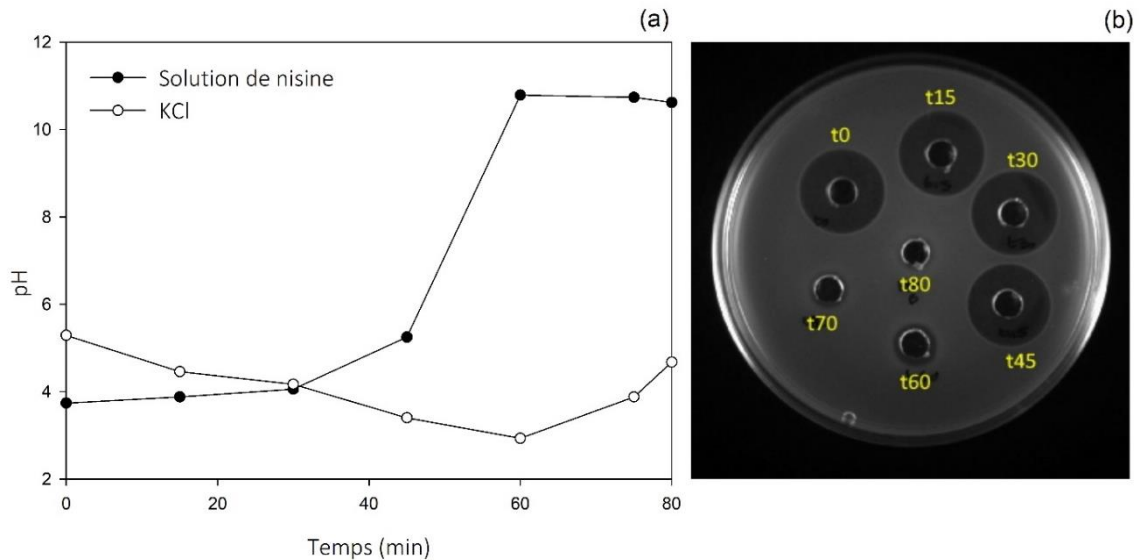


Figure 4.1: Évolutions des paramètres durant la purification par ED de la solution commerciale de nisine (a) évolution du pH pendant le procédé de déminéralisation à 10V. (●) représente le pH de la solution de nisine commerciale et (○) le pH de la solution de KCl. (b) Évolution de l'activité antimicrobienne de la nisine pendant le procédé d'ED.

La mesure de l'activité antimicrobienne de nisine grâce à la prise d'échantillons toutes les 15min pendant le procédé d'ED a permis d'observer une perte de l'activité antimicrobienne passant de 1024 à 16 AU.mL⁻¹ après 45 min de traitement comme présenté sur la Figure 4.1b, avec la disparition du halo d'inhibition des échantillons prélevés à 60, 70 et 80min. L'acidification de la solution après ED à pH 3,8, le pH optimal pour l'expression antimicrobienne de la nisine, n'a pas permis de retrouver l'activité antimicrobienne initiale. La diminution de l'activité antimicrobienne peut s'expliquer par la perte irréversible de la structure de la nisine du fait de l'augmentation du pH à des valeurs supérieures à 7,0, modifiant les propriétés physico-chimiques de la nisine telles que son activité et sa solubilité [29] Liu et Hansen (1990) [17] ont notamment reporté dans la littérature la modification structurale des molécules de nisine lorsque le pH de la solution est supérieur à son point isoélectrique (pHi autour de 8,0). Les modifications induites dans la structure de la nisine peuvent induire aussi des interactions intermoléculaires entre les molécules de nisine formant donc des multimères et pouvant aussi être à l'origine de la diminution de l'activité [17]. L'interaction non spécifique de la

nisine avec les membranes d'ED peut aussi être une raison de la diminution de l'activité antimicrobienne du fait que la nisine puisse interagir du fait de son caractère hydrophobe et cationique et donc non recouvert dans la solution finale.

2.1.2. Caractérisation des membranes échangeuses d'ions (MEI)

L'épaisseur et la conductivité des MEI ont été caractérisées avant et après ED afin d'évaluer leur intégrité et la présence d'un possible colmatage [168]. L'épaisseur des membranes est restée la même avant et après déminéralisation ($p > 0,05$; Tableau 4.1), excepté pour la membrane MEC 2 pour laquelle une différence significative a été trouvée après ED avec une épaisseur plus faible. Ces valeurs restent cependant dans la plage des valeurs reportées dans la littérature pour un tel type de membrane entre 0,14 et 0,2 mm [169,170]. Une différence significative a aussi été démontrée pour la membrane MEA 2 avec une conductivité plus élevée après traitement ($p < 0,05$). L'absence de différence sur la plupart des membranes, et la plus faible épaisseur de la MEC 2, ne permettent pas d'indiquer la présence de colmatage sur les membranes. Les phénomènes de colmatages mènent généralement à une diminution de la conductivité d'une membrane due 1) à l'augmentation de la résistance de la membrane par la formation à sa surface ou dans la membrane d'une couche d'encrassement et 2) de dépôt d'un agent colmatant sur les groupements ioniques de la MEI [168,171].

Tableau 4.1 : Épaisseur et conductivité des MEI avant et après le test de déminéralisation par ED.

Membrane	Épaisseur (mm)		Conductivité (mS.cm ⁻¹)	
	Avant	Après	Avant	Après
MEC 1	0,145 ± 0,004 ^a	0,148 ± 0,001 ^a	8,164 ± 0,248 ^a	8,507 ± 0,314 ^a
MEC 2	0,158 ± 0,004 ^a	0,151 ± 0,003 ^b	8,074 ± 0,507 ^a	7,885 ± 0,289 ^a
MEC 3	0,159 ± 0,006 ^a	0,157 ± 0,003 ^a	8,355 ± 0,350 ^a	8,317 ± 0,380 ^a
MEA 1	0,143 ± 0,003 ^a	0,140 ± 0,003 ^a	5,163 ± 0,213 ^a	5,190 ± 0,281 ^a
MEA 2	0,137 ± 0,007 ^a	0,140 ± 0,004 ^a	4,563 ± 0,184 ^a	4,908 ± 0,184 ^b

Moyenne ± écart-type. Les données avec les mêmes lettres sur une même ligne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$ (t-test)).

2.1.3. Courbe de courant-voltage

Les similarités en termes d'épaisseur et de conductivité des membranes avant et après déminéralisation par ED de la solution commerciale de nisine n'a pas permis de corrélérer l'augmentation du pH dans le compartiment de nisine à un quelconque phénomène de

colmatage de la nisine ou de protéine sur les MEI, ce qui aurait pu permettre d'expliquer la diminution d'activité antimicrobienne observée (Figure 4.1b). De plus, les valeurs de conductivité de la solution de nisine déminéralisée et de la solution de KCl ($10.93 \pm 0.81 \text{ mS.cm}^{-1}$ et $10.40 \pm 0.53 \text{ mS.cm}^{-1}$ respectivement) à 45min de traitement ne permettent pas d'envisager de phénomène de concentration de polarisation ou de courant limite qui serait dû à une conductivité trop faible de l'une des deux solutions [172,173].

Une autre méthode pour caractériser la présence de colmatage ou de phénomènes de concentration de polarisation durant l'ED est la détermination du courant limite du procédé [147,174]. Le test de courant limite a donc été fait avant et après 45 min déminéralisation de la solution de nisine commerciale, basée sur le moment où le pH de la solution de nisine augmente (Figure 4.1a), en utilisant la méthode de Cowan et Brown [147]. Lorsque le test a été fait sur la solution avant traitement (courbe blanche sur la Figure 4.2), aucun courant limite n'a pu être déterminé, la courbe restant linéaire lors de l'application du voltage. Cependant, la courbe courant-voltage obtenue après sur la solution de nisine après 45 min de déminéralisation diffère de la courbe faite avant traitement (courbe noire, Figure 4.2). L'inflexion observée sur la courbe permet de mettre en évidence l'apparition d'un courant limite après 45min de traitement. L'intersection des droites tangentiels extrapolées des plateaux sur la courbe noire permet de déterminer une valeur de courant limite de 0,9A correspondant à un voltage de 7,4 V [148]. La densité de courant limite de module d'ED a donc été atteinte et dépassée après 45min de traitement à 10 V, menant au phénomène de dissociation de l'eau à l'interface de certaines MEI et par conséquent à l'augmentation du pH de la solution de nisine.

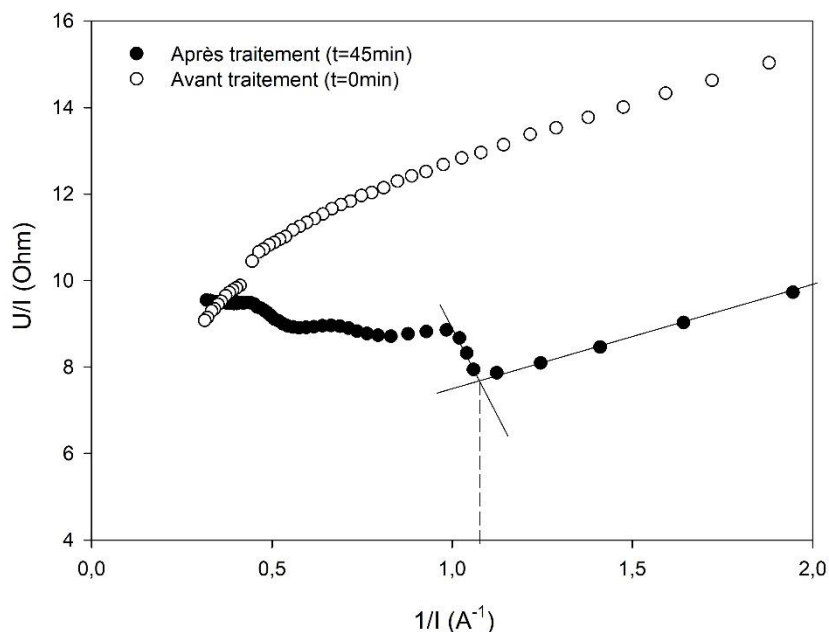


Figure 4.2 : Courant limite avant et après traitement de la solution de nisine commerciale. (○) courant limite avant déminéralisation ; (●) courant limite après 45min de déminéralisation. Le trait bleu représente le moment où la valeur de 10 V est atteinte pendant le test de courant limite.

2.1.4. Mécanisme de colmatage de la nisine avec les membranes échangeuses de cations (MEC)

Afin d'expliquer le phénomène apparaissant après 45min, correspondant à la perte de l'activité antimicrobienne et l'augmentation du pH (Figure 4.1a et Figure 4.1b), il est intéressant de comprendre les propriétés physico-chimiques de la nisine et la structure des MEI. La nisine est un peptide composé de 34 AA dont trois résidus de lysine et deux d'histidine chargés positivement, conférant à la nisine une charge positive globale à la nisine à pH basique (pH<8.3) [175,176]. Lorsque le courant est appliqué lors de la déminéralisation, la charge positive globale de la nisine lui permet de migrer vers la cathode dans la cellule d'ED, comme illustré sur la

Figure 4.3a. Les espèces ioniques de faible taille moléculaire comme le Na^+ et le Cl^- issus des sels composant la solution de nisine commerciale migrent selon leur charge respective au travers des MEI (MEC pour les ions Na^+ et MEA pour les ions Cl^-) résultant en la déminéralisation globale de la solution de nisine commerciale. Cependant la nisine ne peut pas traverser les MEC du fait de sa forte taille moléculaire (3 500Da). La nisine

chargée positivement vient donc interagir avec les MEC par interaction électrostatiques (

Figure 4.3b). Les MEC utilisées ici sont des membranes CMX-fg. Ces MEC sont chargées à leur surface par la fixation de groupe sulfonique SO_3^- [177]. Comme illustré sur la

Figure 4.3b, les charges négatives fixées sur la matrice de la MEC et à l'interface de la membrane sont capables de réagir avec les molécules de nisine au travers d'interaction électrostatique, ceci en accord avec ce qui a pu être rapporté dans la littérature concernant l'interaction de molécules chargées positivement avec les MEC par Langevin et Bazinet [178], Persico et al (2017) [177] et Persico et Bazinet [179] pour les peptides ou par Pismenskaya et al. [180] et Eliseeva et al. [181] pour les acides aminés. Plus précisément, Persico et al. et Persico and Bazinet [177,179] ont reporté de telles interactions entre les CEM et des peptides dans une cellule d'ED ainsi qu'un mécanisme de colmatage à double couche avec une première couche de peptides chargés positivement réagissant avec la surface membranaire par interactions électrostatiques, ainsi que d'une seconde couche entre peptides par interactions hydrophobes.

Dans la présente étude, des phénomènes d'interaction de la nisine avec les groupes négatifs SO_3^- via les résidus de lysine et d'histidine, responsables de la charge globale positive de la nisine [13], ont été proposés. L'interaction électrostatique de peptides chargés avec les membranes ioniques de charge opposée a notamment été rapportée dans la littérature [182]. Les résidus hydrophobes, présents sur la région terminale N de la nisine, peuvent aussi permettre à la nisine d'interagir avec les CEM par interactions hydrophobes ainsi que les autres peptides de la solution de nisine commerciale [183]. La nisine tend donc à s'accumuler à l'interface de la MEC (

Figure 4.3b) avec en parallèle l'augmentation de l'intensité durant les premières étapes de déminéralisation. L'accumulation de la nisine sur la membrane limite ainsi la migration des petites espèces ioniques (Na^+ et Cl^-). Cette limitation, couplée avec la déminéralisation de la solution de nisine, à augmenter l'effet de concentration de polarisation à l'interface de la MEC. La différence de transport d'ions entre l'interface de la membrane et la solution mène à la formation d'une couche laminaire de diffusion à la surface de la MEC, où la concentration en ions à l'interface de la MEC est fortement réduite [152,184,185]. La déplétion en ions à cette interface membranaire est

responsable de la limite de courant atteinte démontrée sur la Figure 4.2 (courbe noire) à 45min de procédé [173]. Le transport de masse des ions, n'étant plus suffisant pour le transport du courant, tend alors au phénomène de dissociation de l'eau (

Figure 4.3c) [151,186]. Comme reporté par Nikonenko et al (2014) [187], la dissociation de l'eau par transfert de protons prend place dans la couche limite de la membrane. La dissociation de l'eau augmente au fur et à mesure que la nisine interagit avec la MEC, menant à la production d'ions H^+ et OH^- à l'interface membranaire dans la couche limite. Dans le cas de la MEC, comme illustré dans la

Figure 4.3d, les ions H^+ migrent à travers la membrane vers la solution de KCl, alors que les ions OH^- migrent dans la solution de nisine commerciale déminéralisée sous l'effet du champ électrique. Par conséquent, la migration des ions H^+ et OH^- produits par la dissociation de l'eau permet d'expliquer l'évolution du pH de la solution de nisine commerciale. À la fin du procédé, lorsque le pH augmente de pH 8,0 à pH 10,62, les molécules de nisine perdent leur charge positive du fait que le pH soit supérieur au pH_i de la nisine de 8,5 [188] induisant une perte des charges H^+ des résidus de lysine et d'histidine donnant à la nisine une charge globale négative (

Figure 4.3d).

Persico et al (2017) [177] ont de plus reporté des effets de répulsion électrostatique attribués aux groupements carboxyliques des acides aminés de la nisine lorsque le pH excède celui du pH_i de la nisine. Ceci permet d'expliquer l'absence de différences lors de la caractérisation des membranes (Tableau 4.1) qui n'a pas permis la détection de colmatage. Comme illustré sur la

Figure 4.3e, la perte de la charge positive de la nisine réduit la capacité de la nisine à interagir avec la MEC et donc sa désorption de la membrane. De plus, comme reporté par Liu et Hansen (1990) [17] une forte diminution de la solubilité de la nisine se produit lorsque le pH augmente au-dessus de pH 8,0. Ceci pourrait soutenir encore plus la perte d'activité antimicrobienne ainsi que la désorption de la nisine de la MEC et donc l'absence de différences lors de la caractérisation des MEI.

La séquence peptides de la nisine permet donc d'envisager des phénomènes d'interactions électrostatiques avec la MEC [177], mais aussi des phénomènes d'interaction hydrophobe [142,170,183]. Cependant, l'augmentation de pH au-dessus de

8,3 a permis la désorption de la nisine de la MEC, permettant de caractériser le colmatage des MEC comme colmatage organique réversible [168,189]. De ce fait, le phénomène de colmatage de la nisine avec la MEC est principalement dû aux phénomènes d'interactions électrostatiques. L'élucidation de ces mécanismes d'interaction permet donc d'envisager de mettre en place une solution permettant d'éviter la perte de l'activité antimicrobienne par la mise en place d'un contrôle du pH de la solution de nisine commerciale, en permettant de conserver la structure et la charge de la nisine.

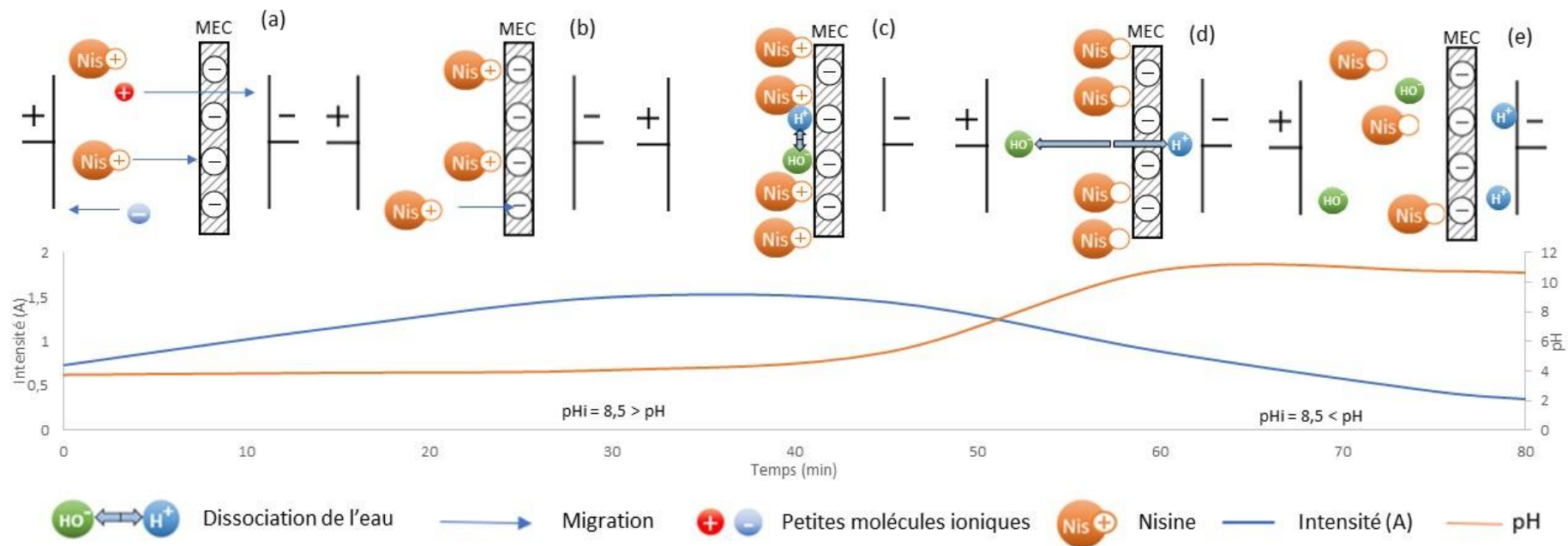


Figure 4.3 : Représentation de l'interaction de la nisine avec la MEC pendant la déminéralisation de la solution de nisine. Les différents états de charge de la nisine durant l'ED sont illustrés selon l'évolution du pH ainsi que de l'évolution de l'intensité de courant durant le procédé. (a) La Nisine⁺ migre vers la cathode. (b) La Nisine⁺ interagit avec les charges fixes anioniques de la MEC. (c) La dissociation de l'eau se produit au niveau de la couche limite de la MEC avec accumulation de la Nisine⁺ sur la surface de la membrane. (d) Les ions OH⁻ migrent dans la solution de nisine commerciale quand les ions H⁺ migrent au travers de la MEC dans la solution de KCl. Le pH de la solution de nisine augmente, menant à la perte de la charge positive de la nisine (Nisine[°]). (e) La Nisine[°] se désorbe de la MEC. (f) Évolution du pH et de l'intensité de courant (A) durant le procédé d'ED.

2.2. Déminéralisation par ED avec contrôle de pH

2.2.1. Évolution du taux de déminéralisation, du pH et de l'activité antimicrobienne

En prenant en compte les observations et conclusions faites précédemment, la déminéralisation de la solution commerciale de nisine (2% (p/V)) a été déminéralisée par ED avec la mise en place du contrôle de son pH au cours du procédé à 3,8, en utilisant une solution d'HCl à 0,5 M, afin de conserver la charge positive de la nisine. Tel qu'illustré sur la Figure 4.4b, le pH de la solution de nisine a pu être maintenu autour de pH 3,8, le pH de la solution de KCl a diminué comme attendu durant la déminéralisation. La mesure de l'activité antimicrobienne présentée en Figure 4.4c permet d'observer que le contrôle du pH à 3,8 a permis le maintien de l'activité antimicrobienne avec une activité finale, après déminéralisation de $95,6 \pm 0,5\%$, de 1024 AU.mL^{-1} , équivalente à celle mesurée initialement (Figure 4.4a).

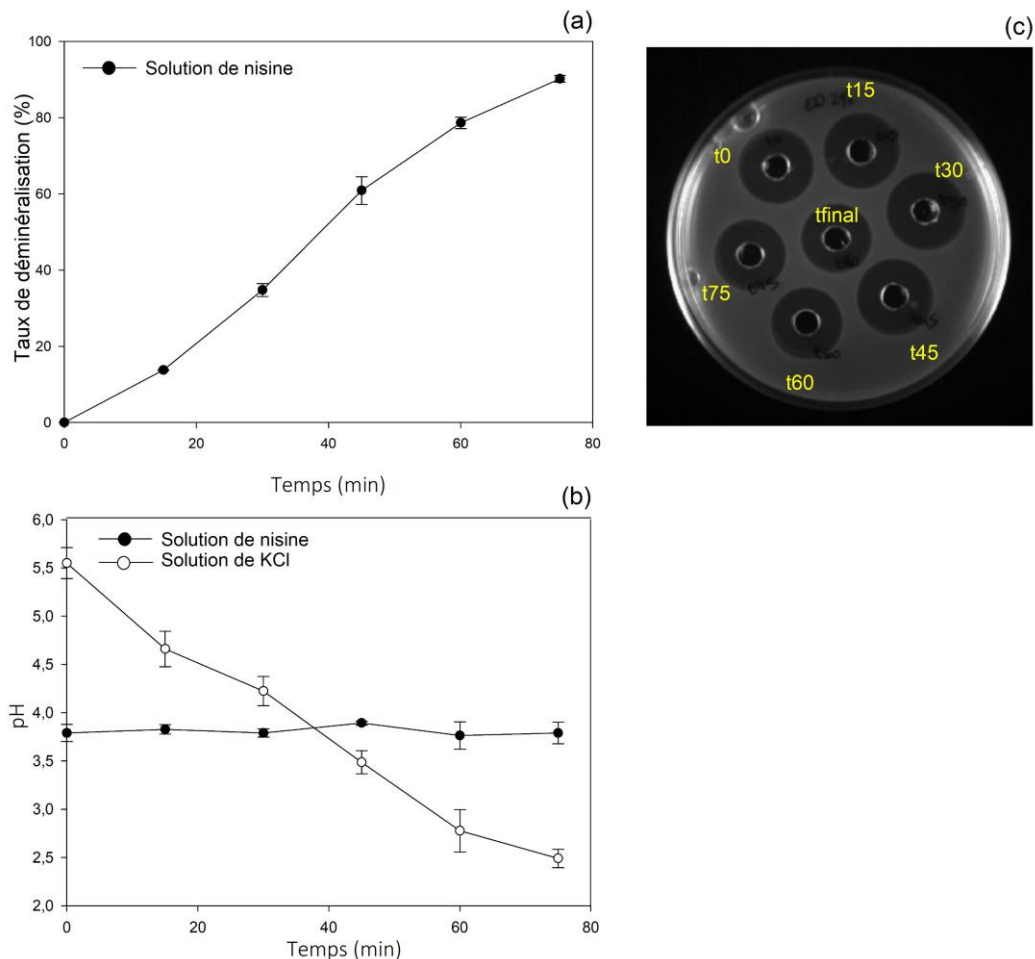


Figure 4.4 : Évolution des différents paramètres lors de la déminéralisation (a) évolution du taux de déminéralisation de la solution de nisine commerciale, (b) du pH de la solution de nisine et de KCl et (c) de l'activité antimicrobienne de la solution de nisine. (●) Solution commerciale de nisine et (○) solution de KCl.

2.2.2. Caractérisation des MEI

La mesure de l'épaisseur et de la conductivité de la membrane avant et après ED ne montre aucune différence significative ($p > 0,05$) comme indiqué dans le Tableau 4.2, confirmant les résultats observés durant le test précédent.

Tableau 4.2 : Caractérisation des MEI avant et après ED avec contrôle de pH à 3,8.

Membrane	Épaisseur (mm)		Conductivité (mS.cm ⁻¹)	
	Avant	Après	Avant	Après
MEC 1	0,147 ± 0,002 ^a	0,145 ± 0,007 ^a	8,520 ± 0,094 ^a	8,513 ± 0,758 ^a
MEC 2	0,147 ± 0,001 ^a	0,146 ± 0,008 ^a	8,655 ± 0,237 ^a	8,308 ± 0,547 ^a
MEC 3	0,149 ± 0,001 ^a	0,148 ± 0,009 ^a	8,503 ± 0,278 ^a	8,187 ± 0,478 ^a
MEA 1	0,138 ± 0,002 ^a	0,137 ± 0,010 ^a	5,402 ± 0,471 ^a	5,188 ± 0,546 ^a
MEA 2	0,138 ± 0,001 ^a	0,136 ± 0,007 ^a	5,033 ± 0,226 ^a	4,811 ± 0,049 ^a

Moyenne ± écart-type. Les données avec les mêmes lettres sur une même ligne ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$ (t-test)).

3. Comparaison de la purification de la nisine par ED et par centrifugations successives

3.1. Taux de déminéralisation

Le taux de déminéralisation des différentes solutions durant chaque procédé et à différentes concentrations pour le procédé de centrifugation (2 et 27% (p/V)) ont été reportées dans le Tableau 4.3. Pour le protocole de centrifugations successives, le taux de déminéralisation final correspond à la fraction C3 qui est le culot final récupéré et resolubilisé, et donc la fraction d'intérêt concernant la nisine purifiée comme reporté par Gough et al (2017) [146]. Peu importe la concentration en solution commerciale de nisine, le procédé de centrifugations successives a permis d'atteindre des taux de déminéralisation jusque 99% avec aucune différence significative entre les concentrations à 2% et 27% (p/V) ($99,8 \pm 0,3\%$ et $99,9 \pm 0,1\%$ respectivement). Comme mentionné précédemment, le taux de déminéralisation de la solution de nisine après ED était de $95,6 \pm 0,5\%$ après 75 min de traitement. Ce taux de déminéralisation est significativement plus faible que ceux trouvés pour le procédé de centrifugations successives, cependant en considérant la littérature concernant la déminéralisation par ED, le taux de déminéralisation ainsi que l'efficacité énergétique de l'ED pourraient être améliorés en augmentant la concentration de la solution à traiter [190,191]. En effet, par exemple avec la déminéralisation du lactosérum à l'échelle industrielle, le lactosérum

est d'abord concentré par la nanofiltration de 6 à 18% en solides totaux. Une telle préconcentration du lactosérum permet notamment d'augmenter la concentration en protéines, mais aussi en sels, augmentant ainsi la conductivité globale de la solution. Une telle augmentation permet de diminuer la consommation énergétique ($EC = Ult$) du procédé d'ED en diminuant le voltage à appliquer et en augmentant le pourcentage de déminéralisation. En effet, lorsque la conductivité de la solution est faible, le temps nécessaire pour diminuer encore la conductivité devient plus long et augmente la consommation d'énergie [191,192]: par exemple, la déminéralisation de solutions avec une conductivité initiale de 20 et 2 $mS.cm^{-1}$ jusqu'à atteindre 0,4 $mS.cm^{-1}$, 0,4 $mS.cm^{-1}$ étant difficilement atteignable, correspond à des taux de déminéralisation de 98 et 80% respectivement. De plus, les fractions S2 des deux concentrations testées présentent des taux de déminéralisation de $95,6 \pm 2,6\%$ et $94,3 \pm 0,8\%$ respectivement, l'absence de différences significatives avec les taux de déminéralisation des fractions S3 et C3 pour chaque concentration indique que la déminéralisation est efficace après deux étapes de centrifugation, posant la nécessité de la multiplication des étapes de centrifugation.

3.2. Activité antimicrobienne totale

Lorsque l'on regarde les activités antimicrobiennes des différentes fractions issues des étapes de centrifugation, on peut observer une différence d'efficacité selon la concentration en solution de nisine commerciale testée. La faible activité totale retrouvée dans la fraction S1 à 27% (p/V) (1600 AU) et son fort taux de déminéralisation permet d'observer l'efficacité de la première étape de centrifugation à la déminéralisation de la solution. Dans le cas de S1 2% (p/V), une forte activité antimicrobienne (102 400 AU) est ici accompagnée d'un faible taux de déminéralisation : l'étape de centrifugation n'a pas permis dans ce cas de séparer la nisine des sels de la solution. La première étape de centrifugation n'a donc pas été efficace lorsque celle-ci a été appliquée sur la solution commerciale à 2% (p/V).

Lorsque l'on compare le produit final de chaque procédé sur une même base sèche (1% p/V), l'ED montre la même activité antimicrobienne avant et après procédé à 358 400 AU. Pour les fractions issues de la centrifugation de la solution à 2%, l'activité antimicrobienne maximale a été retrouvée dans la fraction S1 (102 400 AU), donnant une activité antimicrobienne finale de 200 AU dans la fraction C3. Pour la centrifugation de la solution à 27% (p/V), la plus forte activité antimicrobienne a été retrouvée dans la fraction S2 allant de 819 200 à 1 638 400 AU. L'activité finale retrouvée dans la fraction

C3 (à 27%) était de 51 200 à 204 800. Les fractions finales C3-2% et C3-27% ont donc démontrées les plus faibles activités antimicrobiennes des différentes fractions avec les activités antimicrobiennes les plus élevées retrouvées dans les fractions S2-27% (819 200 à 1 638 400 AU) et S3-27% (205 800 à 819 200 AU), et dans S1-2% (102 400 AU). Ces résultats permettent aussi de montrer des efficacités différentes entre les deux concentrations testées : la centrifugation testée sur la solution à 2% (p/V) initiale n'a pas été efficace dans la déminéralisation de la nisine alors qu'elle l'était pour la solution à 27% (p/V) initiale, purifiant la nisine des sels de la solution et augmentant son activité spécifique. Cependant, la dispersion de l'activité antimicrobienne dans différentes fractions amène à remettre en compte l'utilité de procédé à plusieurs étapes de centrifugation, Gough et al [146] mentionnant notamment que la fraction finale récupérée dans leur protocole était le culot final après les différentes étapes de centrifugation.

Ces résultats permettent donc de démontrer que l'application de la centrifugation successive est moins efficace lorsque la solution à traiter se trouve à faible concentration. Ceci peut s'expliquer par le fait que la solution à 27% permet une meilleure précipitation du fait de la plus forte concentration en protéine, permettant l'interaction protéine-protéine en plus de la forte concentration en sels, facilitant ainsi leur précipitation du fait que le principe de précipitation au sel repose sur la disruption de la barrière d'hydratation des protéines, permettant l'interaction entre leurs régions hydrophobes [193]. La faible concentration en protéine dans la solution à 2% (p/V) fait donc que l'interaction entre protéines est plus limitée que dans la solution à 27%, les solutions moins concentrées en protéine nécessitant donc des concentrations en sels plus importantes pour permettre la même efficacité [194]. Pour l'ED, ces interactions entre protéines n'étant pas un paramètre influencent son efficacité, son utilisation sur une faible concentration comme pour le procédé de centrifugation (2%) une fraction finale de nisine avec une activité antimicrobienne conservée a pu être obtenue. De plus, lorsque l'on regarde la littérature et comme discuté précédemment, une plus grande concentration de la solution de nisine à appliquer sur l'ED permettrait possiblement une meilleure efficacité du procédé.

3.3. Teneur en protéine, activité spécifique et rendement protéique

La lyophilisation des échantillons après ED et après les étapes de centrifugation a permis de mesurer la teneur en protéine des différentes fractions permettant ainsi la caractérisation de leur activité spécifique et de leur rendement en protéines tel que rapporté dans le Tableau 4.3.

Lorsque l'on s'intéresse à l'activité spécifique des fractions avant et après ED, on observe que l'activité spécifique finale obtenue de 1440,46 AU/mg de protéine est supérieure à celui mesuré initialement à 1207,26 AU/mg de protéine, représentant ainsi un facteur de purification de 1,19 (Équation 4). Cette augmentation de l'activité spécifique peut s'expliquer par la perte de petits peptides dans le module d'ED, par adsorption sur les membranes, ou encore par la perte d'acide aminé, de faible taille moléculaire, pouvant migrer à travers les MEI. Cette activité spécifique est cependant plus faible que celles observées pour différentes fractions de la centrifugation à 27% avec S3-27% présentant la plus forte activité spécifique de 2394,26 à 9577,34 AU/mg de protéine. Les autres fractions S1-27% et C3-27% présentent, elles, de plus faibles activités spécifiques de 36,87 et 214,36 AU/mg de protéine respectivement. Pour la centrifugation de la solution commerciale à 2%, seule la fraction S2-2% a montré une meilleure activité spécifique que celle de l'ED, allant de 533,4 à 2133,60 AU/mg de protéine, augmentant ainsi l'activité spécifique de la nisine par un facteur de purification de 1,5 à 6,2. Une forte activité spécifique a aussi été trouvée dans la fraction S1-2% à 5827,15 AU/mg de protéine (donnant un facteur de purification de 16,9) permettant de montrer la capacité de l'étape à séparer la nisine des autres protéines, mais pas des sels présents dans la solution au vu du faible taux de déminéralisation.

Ces résultats sont cependant à mettre en reliefs avec les résultats obtenus en termes de rendement protéique, l'ED démontrant le meilleur rendement en protéine des différents procédés avec un rendement de $83,81 \pm 3,82\%$ (Tableau 4.3). Chaque fraction C3 pour le procédé de centrifugation donne des rendements protéiques similaires de $42,16 \pm 5,97\%$ et $24,39 \pm 11,08\%$ respectivement pour les fractions C3-27% et C3-2%. Concernant la fraction S2 aux deux concentrations ayant démontrées la plus forte activité spécifique avec le plus fort taux de déminéralisation, montre ici des rendements protéiques de $30,60 \pm 9,24\%$ et $2,77 \pm 0,39\%$, respectivement pour les fractions à S2-27 et S2-2%. Le bilan de masse est aussi d'importance dans la caractérisation des rendements pour chaque fraction. Le bilan de masse obtenue pour la solution à 27% est notamment de 92,91% de protéine lorsque le rendement en protéines de chaque fraction (S1, S2, S3 et C3) est pris en compte. Pour la solution centrifugée à 2%, un bilan de masse de 85,44% a été retrouvé. Alors que ces bilans de masse permettent d'observer qu'il n'y a pas de perte de protéine lors des différentes centrifugations (lorsque l'on prend en compte les déviations standard des rendements protéiques, Tableau 4.3), le procédé d'ED présente lui un rendement protéique de $83,81 \pm 3,82\%$. Ceci peut être notamment dû à la petite échelle à laquelle a été fait le protocole (350mL de solution traitée) et donc d'une possible perte de protéine dans les volumes morts du système (autour de 25 à

40mL) aussi possiblement par la prise d'échantillons toutes les 15 min lors du procédé.
À plus grande échelle, ce paramètre serait fortement minimisé.

Tableau 4.3 : Activité antimicrobienne et teneur en protéine de la solution de nisine commerciale après procédés d'ED et de centrifugation successive

Concentration initiale (p/V)	Fraction	Taux de déminéralisation (%)	Activité totale (AU)	Protéine totale (mg)	Activité spécifique (AU/mg de protéines)	Rendement protéique (%)
Centrifugation à 27%	Initial	n/d	n/d	572,40 ± 0 ^a	n/d	n/d
	S1	2,70% ± 0,51 ^d	1600	43,40 ± 7,41 ^{de}	36,87	7,58 ± 0,92 ^c
	S2	94,31% ± 0,78 ^c	819 200-1638400	224,20 ± 85,84 ^{bc}	3653,80-7307,60	30,60 ± 9,24 ^b
	S3	97,07% ± 3,37 ^{ab}	205 800-819 200	85,54 ± 41,31 ^d	2394,26-9577,34	12,57 ± 8,33 ^c
	C3	99,87% ± 0,09 ^a	51 200-204 800	238,86 ± 32,25 ^c	214,36 – 857,41	42,16 ± 5,97 ^b
Centrifugation à 2%	Initial	n/d	102400	42,40 ± 0 ^e	344,90	n/d
	S1	0,00 ± 0,35 ^d	102400	17,57 ± 2,18 ^f	5827,15	38,53 ± 0,20 ^b
	S2	95,65% ± 2,60 ^{bc}	800-3200	1,50 ± 0,50 ^f	533,4-2133,60	2,77 ± 0,39 ^c
	S3	99,62% ± 0,30 ^a	400-800	5,38 ± 4,53 ^f	74,29-148,58	19,81 ± 6,53 ^c
	C3	99,76% ± 0,30 ^a	200	16,65 ± 9,54 ^f	12,01	24,33 ± 11,08 ^b
ED à 2%	Initial	n/d	358 400	296,87 ± 0 ^b	1207,26	n/d
	Final	95,61 ± 0,49 ^{bc}	358 400	248,81 ± 11,33 ^c	1440,46	83,81 ± 3,82 ^a

Les données dans une même colonne avec une lettre différente (a-f) sont significativement différentes à $p < 0.05$ à l'aide d'un t-test protected Fischer's LSD.

L'activité antimicrobienne est exprimée en termes d'activités antimicrobiennes "plus faible, plus élevée" mesurées à partir de trois répétitions.

S1, S2, S3 réfèrent aux étapes de précipitation ; C3 réfère au culot final resuspendu dans l'eau distillée.

n/d: non déterminé

3.4. Analyses UPLC-MS

L'analyse sur base sèche des échantillons (1% p/V) après lyophilisation avant et après traitement a été faite par UPLC-MS pour l'ED et le procédé de centrifugation afin d'en déterminer un facteur de concentration de la nisine via la mesure de l'aire sous pic de la nisine (Tableau 4.4). Le pic de nisine a été notamment déterminé par MS avec comme référence la masse de 3 500 Da comme reportée dans la littérature [16,183].

Parmi toutes les fractions obtenues (centrifugation et ED), c'est la fraction S2-2% qui présente le facteur de concentration de nisine le plus élevé avec un facteur de 47,84 lorsque l'on compare l'aire sous pic de nisine de cette fraction avec celle de la solution initiale. Ce facteur de concentration est suivi par celui de la fraction après ED présentant un facteur de concentration de 10,39, quatre fois inférieur à celui de S2-27%. La détermination du facteur de concentration par UPLC permet donc de démontrer l'efficacité du procédé d'ED pour la purification et la concentration de la nisine, notamment lorsqu'on le compare au procédé de centrifugation à 2%, démontrant pour sa fraction S2-2% son plus fort facteur de concentration de 4,02 comparé à 10,39 pour l'ED. La faible concentration mesurée pour les fractions S3- et C3-2% permettent donc de confirmer la faible efficacité de multiplier les étapes de centrifugation après S2-2%. Les mêmes conclusions peuvent être faites pour la centrifugation à 27% avec de faibles facteurs de concentration pour les fractions S3 et C3 lorsqu'ils sont comparés à la fraction S2-27%

Tableau 4.4 : Détermination de l'aire sous pic de la nisine par UPLC-MS dans les échantillons lyophilisés après ED et centrifugation, sur une même base poudre (1% p/V).

Concentration initiale (p/V)	Fractions	Aire sous pic HPLC (AU)	Facteur de concentration
27%	Initial	823,85 ± 19,96 ^e	n/d
	S1	n/d	n/d
	S2	39419,02 ± 2650,28 ^a	47,84
	S3	2633,01 ± 38,60 ^d	3,19
	C3	4894,92 ± 1114,57 ^b	5,94
2%	S1	1743,29 ± 551,72 ^{cdef}	2,11
	S2	3317,84 ± 213,55 ^c	4,02
	S3	461,25 ± 14,57 ^f	0,55
	C3	1682,14 ± 786,61 ^{cdef}	2,04
ED	2%	8562,20 ± 1930,6 ^b	10.39

Les données dans une même colonne avec une lettre différente (a-f) sont significativement différentes à $p < 0.05$ à l'aide d'un t-test protected Fischer's LSD.

L'aire du pic de nisine (AU) a été déterminée sur trois répétitions. Le facteur de concentration a été déterminé en divisant l'aire sous pic de l'échantillon sur l'aire sous pic de la nisine dans la solution initiale.

n/d: non déterminé

Ces résultats concernant la centrifugation à 27% de la solution commerciale de nisine sont comparables avec ceux rapportés dans la littérature notamment par les techniques d'extraction par solvant tel que le chloroforme. En effet, Burianek et al [98] et Tafreshi et al [96] ont rapporté respectivement des facteurs de purification de 37,43 avec un rendement de 70% et un facteur de purification de 23,40 avec un rendement de 24%. Ces résultats issus de la purification de la nisine par extraction par solvants sont comparables avec les résultats obtenus ici pour les fractions S2-27% et S3-27% (facteur de concentration de 21,18 et 27,76 accompagné de rendement de $30,60 \pm 9,24\%$ et $12,57 \pm 8,33\%$ respectivement). Pour le procédé d'ED, le facteur de purification de 1,19 est comparable à celui d'autre technique telle que la précipitation au sulfate d'ammonium où des facteurs de purification de 3,80, 2,52 et 5,07 ont pu être rapportés dans la littérature, avec des rendements en nisine de 62, 94 et 98% respectivement [97,99,100]. Ces résultats sont aussi comparables à d'autre méthode d'extraction par solvants utilisant le méthanol et l'éthanol avec des facteurs de purification de 5,3 et 5,5 et des rendements de 91 et 85% respectivement [122]. Comparé à la chromatographie d'échange de cation l'ED semble moins efficace, avec un facteur de purification de 31

pour la méthode chromatographique, elle est cependant caractérisée par un rendement en nisine faible de l'ordre de 20%, la rendant de ce fait non applicable pour une production à plus grande échelle de la nisine [96] [195]. Plus récemment, une approche par ultrafiltration a été rapportée dans la littérature pour la purification de la nisine avec un facteur de purification de 4,0 et un rendement en activité de nisine de 100% [120]. Bien que présentant des résultats comparables à ceux retrouvés dans la littérature, l'ED présente en plus de ces différentes méthodes citées l'avantage d'être un procédé considéré comme plus respectueux de l'environnement du fait de sa plus faible consommation énergétique ainsi que le fait que l'ED n'utilisant pas de solvants pour la purification de protéine [167,196,197].

4. Conclusion

Cette étude a permis de rapporter pour la première fois l'utilisation de l'ED pour la purification de la nisine à partir d'une solution de nisine commerciale. Pendant le procédé, des interactions complexes entre les molécules de nisine et les membranes échangeuses de cations ont pu être mises en évidence avec la proposition d'un mécanisme d'interaction. La nisine (positivement chargée) colmate à l'interface de la MEC (chargée négativement) induisant un phénomène de dissociation de l'eau et est repoussée des MEC vers la fin du procédé du fait de la perte de sa charge et de sa solubilité liée à l'augmentation du pH de la solution au-dessus de son point isoélectrique. À notre connaissance, il n'a pas été rapporté dans la littérature de tels phénomènes d'interaction de la nisine avec les membranes échangeuses de cations. Suivant ces premiers résultats observés, la mise en place d'un contrôle du pH durant la purification par ED de la solution commerciale a permis de démontrer l'efficacité de l'ED dans la purification de la nisine et a pu être comparée à un procédé déjà connu de purification par centrifugations successives. Il a été démontré dans cette étude que le procédé de centrifugation n'était pas efficace pour la solution à faible concentration à 2% (p/V). Cependant, elle s'est avérée efficace pour la purification de la solution à 27% (p/V) permettant la production de fractions avec une activité spécifique élevée pour le S2 allant de 3653,80 à 7307,60 AU par mg de protéine et pour le S3 (de 2394,26 à 9577,34 AU par mg de protéines). L'ED a démontré une purification de la nisine avec la production d'une fraction finale avec une activité spécifique de 1440,46 AU par mg de protéine, 1,2 fois plus élevée que l'activité spécifique de la solution initiale. Ces résultats ont de plus été confirmés par analyse UPLC-MS démontrant des facteurs de concentration de 47,84 et 10,39 pour la fraction S2-27% et la fraction après ED respectivement.

Au vu de ces résultats concernant la purification par ED et par centrifugation d'une solution de nisine commerciale, cette étude a pu montrer l'efficacité d'appliquer l'ED à la purification de la nisine, en la comparant à une méthode déjà utilisée ainsi qu'aux différentes méthodes retrouvées dans la littérature. Démontrant des résultats intéressants concernant le rendement en protéine, les activités spécifiques et les facteurs de concentration, l'ED se présente comme une technique prometteuse pour la purification de la nisine. En effet, bien que le procédé de centrifugation présente un facteur de purification important, la technique se caractérise par des rendements faibles ainsi que par la dispersion de la molécule d'intérêt dans différentes fractions menant à remettre en question l'utilité de multiplier les étapes de centrifugation. De plus, d'un point de vue environnemental, il est aussi nécessaire de prendre en compte que l'approche par centrifugation produit de grand volume d'effluents salins, une des principales problématiques liées à l'utilisation de sels pour la purification de protéine. Pour l'ED, le procédé d'ED a permis la purification par un facteur 1,2 et un facteur de concentration de 10,39 de la solution de nisine commerciale (deminéralisée à hauteur de $96,61 \pm 0,49\%$), mais avec un rendement de $83,8 \pm 3,82\%$ de protéine, et ce en une seule étape. Comme chaque procédé membranaire, une des principales limitations de l'ED, plus spécialement à l'échelle industrielle, est les phénomènes de colmatage pouvant se produire au niveau des membranes tel qu'observées avec la nisine dans cette étude, mais pouvant être réglé ici par la mise en place par le contrôle de certains paramètres, notamment le pH dans le cas de cette étude. En plus des phénomènes de colmatage, une autre limitation de l'ED pourrait être le coût des MEI contribuant notamment à 25-30% du coût total d'une unité d'ED [196]. Cependant, l'ED peut d'un autre côté être considéré comme un procédé plus respectueux de l'environnement [192]: les effluents salins produits lors des procédés de centrifugation et de précipitations représentent des barrières tant économique qu'écologique vis-à-vis de leur traitement et donc à l'utilisation de ces techniques. Le traitement des effluents salins par l'ED pourrait faire de l'ED un procédé d'intérêt par la récupération des sels employés/produits, permettant d'envisager l'introduction de l'ED dans un schéma d'économie circulaire, en réutilisant et réduisant les effluents salins produits par la purification de protéine [167].

Chapitre V : Purification de la nisine à partir d'un surnageant complexe de culture par électrodialyse

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'application de l'électrodialyse pour la purification de la nisine à partir d'un surnageant de culture complexe. Ce chapitre s'appuie sur les deux chapitres précédents : (1) tout d'abord par la production de la nisine sur perméat de lactosérum supplémenté. Ce choix a été fait du fait de l'accessibilité au perméat de lactosérum afin de produire la nisine dans de plus grands volumes de fermentation, mais aussi du fait que le perméat de lactosérum reste un milieu complexe, mais documenté en tant que milieu de culture. Le perméat de lactosérum reste un milieu issu des co-produits de l'industrie agroalimentaire efficace pour la production de la nisine par *L.lactis* UL 719. (2) L'étude de la purification par ED d'une solution commerciale de nisine a permis de mettre en place un protocole sans perte de la molécule d'intérêt. Le protocole établi lors du dernier chapitre a été appliqué ici à la purification à partir d'un surnageant de culture. Le but de cette étude a donc été de mettre en évidence l'efficacité de l'ED dans la purification de la nisine et ce après sa production sur un milieu complexe issu de co-produits de l'industrie agroalimentaire, mais aussi à la perspective d'intégrer cette production dans une démarche d'écocircularité.

2. Précipitation au sulfate d'ammonium

Lorsque l'on compare les résultats obtenus selon la saturation en sels de sulfate d'ammonium (20, 40 et 60% de saturation) on observe que le sulfate d'ammonium à 40% de saturation en sels donne l'activité spécifique la plus élevée ($p < 0,05$) avec une valeur de $5310,4 \pm 1007,1$ AU/mg de protéine (Tableau 5.1). À 60% de saturation en sel l'activité spécifique est, elle, de $2481,6 \pm 827,2$ AU/mg de protéine quand celle à 20% de saturation en sels n'a pas d'activité spécifique mesurée du fait qu'aucune concentration protéique n'a pu être déterminée, car en dessous du seuil de la courbe standard faite à l'aide de sérum albumine ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$). L'absence d'activité spécifique pour la saturation à 20% peut s'expliquer du fait de la faible concentration en sels ne permettant une précipitation efficace des protéines du CFS, la compétition pour l'accès aux molécules d'eau entre les sels et les protéines n'étant pas assez importante pour les sels du fait de leur concentration encore trop faible. Une faible concentration en sels réduit donc ces interactions et donc l'efficacité de précipitation des protéines. Pour le CFS initial, une activité spécifique de $72,0 \pm 12,7$ AU/mg de protéine a été trouvée. En utilisant l'Équation 4 décrite dans le chapitre 2 de matériel et méthode, un facteur de purification pour les taux de saturation 40 et 60% a pu être déterminé avec des taux de purification de 73,8 et 34,5 respectivement. De plus des rendements en termes d'activité

ont aussi pu être déterminés par l'activité antimicrobienne totale des solutions après précipitation, avec Équation 2: des rendements en activité antimicrobienne de 60 et 50% ont pu être déterminés pour les taux de saturation de 40 et 60% respectivement.

Tableau 5.1 : Paramètres mesurés après précipitation au sulfate d'ammonium du CFS. La détermination de la teneur en protéine et de l'activité antimicrobienne a permis la caractérisation du taux de purification et du rendement en activité protéique de la nisine.

Taux de saturation	Teneur en protéine (mg)	Activité totale (AU)	Rendement en activité (%)	Activité spécifique (AU/mg de protéine)	Taux de purification
0% (CFS)	725.1 ± 120.1 ^a	51 200	100	72.0 ± 12.7 ^c	1
20%	n/d	2240	4.4	n/d	n/d
40%	5.9 ± 1.2 ^c	30 720	60	5310.4 ± 1007.1 ^a	73.8
60%	10.3 ± 1.7 ^b	25 600	50	2481.6 ± 827.2 ^b	34.5

Moyenne ± écart-type. Les données avec la même lettre sur une même colonne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$, ANOVA). n/d: non déterminé.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Tafreshi et al [96] et Burianek et al [98] qui ont déterminé un taux de purification maximal lorsque 40% de saturation en sels de sulfate d'ammonium était employé, et ce avec des activités spécifiques comparables à celle de Burianek et al [98] de l'ordre de 2000 à 6000 AU/mg de protéine après précipitation. Cependant, le facteur de purification obtenu avec 40% de saturation de sel pour Tafreshi et al [96] est supérieur avec un taux de purification de 168,8 avec un rendement en activité de 90%, comparé au taux de purification et au rendement en activité de 73,8 et 60% retrouvé pour 40% ici. Ceci peut être expliqué par la différence de temps de précipitation appliquée au CFS avec Tafreshi et al ayant appliqué une précipitation durant 24H comparé à 3H dans cette étude. Bien que ces résultats restent relativement comparables, d'autre étude ont pu mettre en évidence différentes saturations optimales en sel pour la purification de la nisine par précipitation notamment Choi et al [97] qui ont rapporté un taux de purification de 5,0 avec un taux de saturation en sels de 35% ou encore Lee et al [100] avec un taux de purification de 3,8 pour un taux de saturation en sulfate d'ammonium de 50%. Une autre étude a, elle, démontré un taux de purification de 2,5 avec l'utilisation d'un taux de saturation en sels de sulfate d'ammonium de 60 à 80% [99]. Ces différents résultats relevés dans la littérature

peuvent s'expliquer par la différence des milieux de culture dans lequel la nisine a été produite, la plupart de ces études ayant produit la nisine à l'aide d'un milieu MRS, comparé au perméat de lactosérum utilisé dans cette étude. En effet, l'environnement dans lequel se trouve la nisine pour la précipitation est un facteur important pour l'efficacité d'une précipitation aux sels [193] du fait que la précipitation dépende de l'hydrophobicité des protéines et donc de la nature des protéines présentes dans le milieu, le perméat de lactosérum étant pauvre en protéine [198] compare au milieu MRS généralement utilisé pour la production de la nisine. Le temps d'exposition des protéines au sel est aussi un paramètre important à prendre en compte dans l'efficacité du procédé, un temps d'exposition plus long permettant une interaction plus importante du sel avec les protéines afin de permettre leur précipitation [199]. Une autre raison qui permettrait d'expliquer la plus faible activité spécifique de nisine dans le culot après précipitation à 60% de saturation est le fait que de fortes concentrations en sel puissent rendre le culot plus léger et ainsi le faire flotter même après centrifugation comme rapportée dans la littérature [200].

3. Purification de la nisine après précipitation par ED

La solution de nisine à purifier par ED a été produite après 24H de fermentation de la souche *L.lactis* UL 719 dans 2 L de milieu de perméat de lactosérum supplémenté en extrait de levure et en tween 80. Après avoir retiré la biomasse, une précipitation au sulfate d'ammonium à 40% de saturation a été faite sur le surnageant produit. Le culot récupéré après centrifugation a été resolubilisé dans 350 mL d'eau distillée et correspond à la solution traitée par ED.

3.1. Taux de déminéralisation et évolution de l'activité antimicrobienne

Avant ED, la conductivité de la solution de nisine a été mesurée à $12,0 \pm 1,1$ mS.cm⁻¹ et a diminuée jusque $0,4 \pm 0,1$ mS.cm⁻¹ à la fin du procédé d'ED (Figure 5.1a), correspondant à un taux de déminéralisation de $96,6 \pm 0,7\%$ (Équation 7). Comme attendu, la conductivité de la solution de KCl a augmentée durant le procédé pour atteindre une conductivité finale de $10,2 \pm 0,5$ mS.cm⁻¹. Le pH de la solution de nisine a été maintenu à pH 3,8 pendant le procédé d'ED (Figure 5.1b) permettant ainsi de maintenir l'activité antimicrobienne de la solution de nisine comme démontré sur la Figure 5.1c où l'activité antimicrobienne de la solution a été maintenue à 512 AU.mL⁻¹ comme mesuré initialement. Le pH de la solution de KCl a lui diminué jusque 30min de déminéralisation, allant de 4,9 à 3,8, puis a augmenté jusqu'à la fin du procédé pour

s'élever à pH 5,8. Cette augmentation du pH de la solution de KCl après 30 de traitement peut s'expliquer par la faible conductivité de la solution de nisine à ce moment du procédé d'ED, atteignant une valeur de $0,6 \pm 0,2 \text{ mS.cm}^{-1}$ à la fin de l'ED. La déplétion en ions dans la solution de nisine a pu induire un phénomène de concentration de polarisation au niveau de la membrane échangeuse de cation. Les ions H^+ et OH^- migrant de façon moins efficace au travers des MEI, les ions H^+ migrent moins de la solution de nisine vers la solution de KCl où les ions OH^- tendent eux à s'accumuler. Ces mouvements des ions du fait de la concentration de polarisation permettent d'expliquer l'augmentation du pH de la solution de KCl observé vers la fin du procédé d'ED. En effet la concentration de polarisation peut apparaître dans un système électrodialytique lorsque la concentration en ions devient plus importante à l'une des surfaces d'une MEI comparée à l'autre, généralement la surface du côté de la solution traitée [187]. Néanmoins, l'augmentation du pH de la solution de KCl n'a pas limité la purification de la solution de nisine. Ces résultats sont toutefois comparables à ceux trouvés dans l'étude précédente (chapitre 4) du point de vue de l'évolution de la conductivité de la solution de nisine ainsi que le temps requis pour atteindre 95% de taux de déminéralisation (65min ici comparé à 75min dans l'étude précédente). Le maintien de l'intégrité de la nisine via le contrôle du pH est aussi comparable à ce qui a pu être observé dans le chapitre précédent. L'évolution de la conductivité est aussi comparable à celles décrites dans la littérature où une faible conductivité était accompagnée d'une augmentation du pH [201].

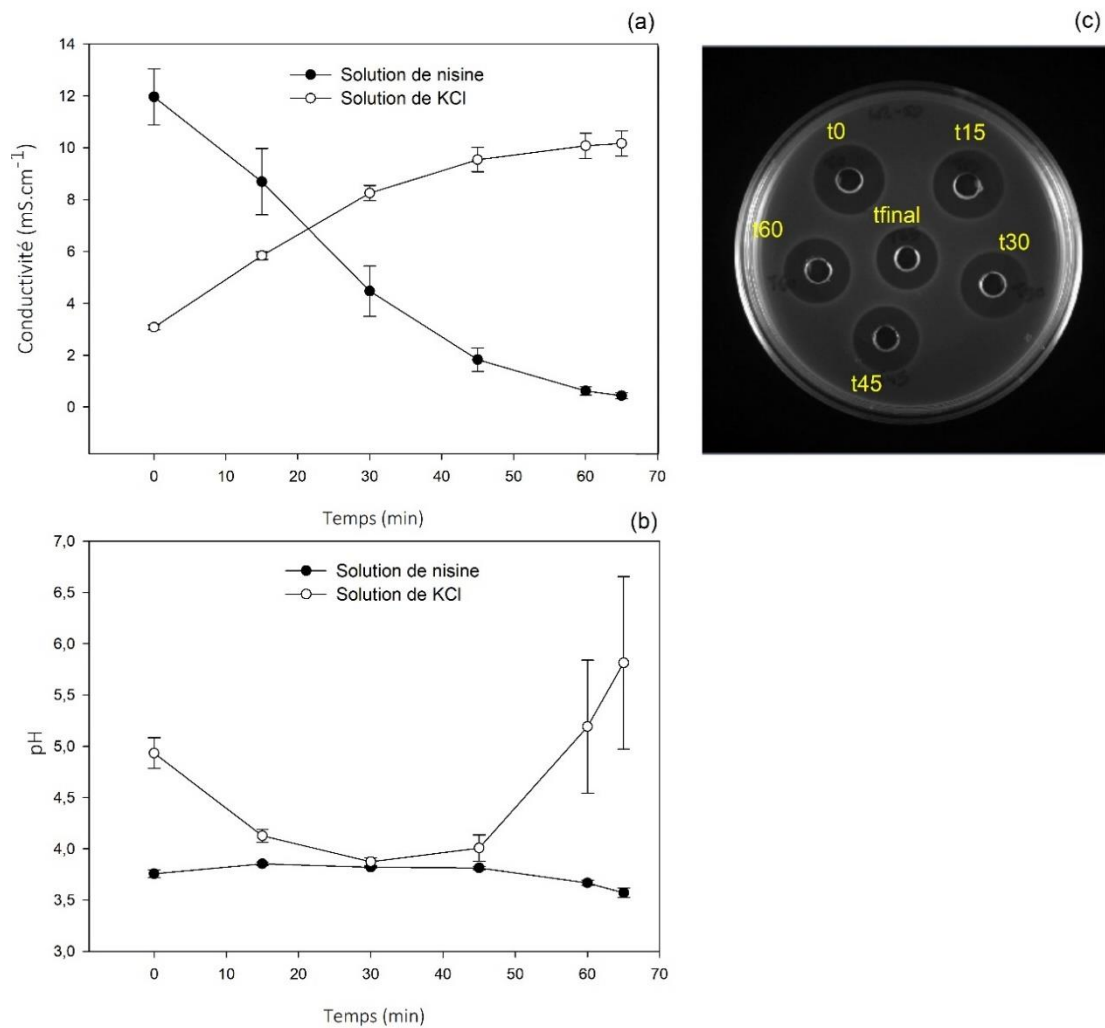


Figure 5.1 : Évolution de (a) la conductivité de la solution de nisine et de KCl, (b) du pH de la solution de nisine et de KCl et (c) l'activité antimicrobienne de la solution de nisine. Ces paramètres ont été mesurés jusqu'à atteindre 95% de taux de déminéralisation de la solution de nisine. (●) solution de nisine et (○) solution de KCl

3.2. Caractérisation des MEI

La mesure de la conductivité électrique des MEI ainsi que leur épaisseur a été faite avant et après procédé d'ED afin de déterminer la présence de possible phénomène de colmatage qui pourrait affecter leur intégrité [168]. Pour chaque membrane, aucune différence n'a été observée pour l'épaisseur ou la conductivité avant et après ED ($p > 0,05$; Tableau 5.2) avec une épaisseur comprise entre 0,138 et 0,145 mm. Comme pour l'épaisseur, les valeurs de conductivité ne sont pas significativement différentes après déminéralisation avec des valeurs allant de 7,73 à 8,47 mS.cm⁻¹ pour les membranes de MEC et de 5,23 à 5,90 mS.cm⁻¹ pour MEA.

Tableau 5.2 : Mesure de l'épaisseur et la conductivité des membranes avant et après électrodialyse

Membrane	Épaisseur (mm)		Conductivité (mS.cm ⁻¹)	
	Avant	Après	Avant	Après
MEC 1	0,138 ± 0,008 ^a	0,138 ± 0,006 ^a	8,47 ± 0,29 ^a	7,73 ± 0,47 ^a
MEC 2	0,138 ± 0,006 ^a	0,143 ± 0,003 ^a	8,40 ± 0,30 ^a	7,93 ± 0,21 ^a
MEC 3	0,143 ± 0,004 ^a	0,140 ± 0,006 ^a	8,63 ± 0,75 ^a	8,03 ± 0,21 ^a
MEA 1	0,145 ± 0,009 ^a	0,138 ± 0,006 ^a	5,90 ± 0,62 ^a	5,27 ± 0,35 ^a
MEA 2	0,144 ± 0,010 ^a	0,140 ± 0,006 ^a	5,43 ± 0,35 ^a	5,23 ± 0,21 ^a

Moyenne ± écart-type. Les données avec la même lettre sur une même ligne et pour la même analyse (épaisseur et conductivité) ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$, t-test).

Les similarités en termes de caractérisation de membranes avant et après ED permettent de valider l'absence de colmatage. Cela a été confirmé visuellement et en touchant les membranes. Ces résultats sont aussi en accord avec ce qui a pu être observé dans l'étude précédente (chapitre 4) où aucun colmatage n'a été observé après déminéralisation avec contrôle de pH par ED de la solution commerciale.

4. Purification par ED de la nisine

La purification de la nisine à partir du CFS par précipitation puis déminéralisation par ED a permis d'augmenter l'activité spécifique de la nisine de $75,9 \pm 4,4$ à $1652,7 \pm 236,8$ AU/mg de protéine, correspondant à un facteur de purification de 21,8 (Équation 4) avec un rendement en activité de 70% en reportant l'activité totale après ED sur celle sur CFS initial (Équation 2) (Tableau 5.3). Aucune teneur en protéine n'a pu être déterminée après précipitation au sulfate d'ammonium du fait d'une trop faible quantité d'échantillons prélevés restants.

Tableau 5.3 : Paramètres mesurés sur le CFS initial, après précipitation au sulfate d'ammonium et après ED.

Échantillons	Teneur en protéine (mg)	Activité totale (AU)	Activité spécifique (AU/mg de protéine)	Rendement activité (%)	Taux de purification
CFS (initial)	6760,0 ± 383,0	512 000	75,9 ± 4,4	100	1.0
Après précipitation	n/d	358 400	n/d	70	n/d
Après ED	219,7 ± 29,7	358 400	1652,7 ± 236,8	70	21,8

n/d: non déterminé

L'analyse HPLC des échantillons après lyophilisation (CFS, après précipitation et après ED) afin de les remettre sur une même base de poudre à 1% (p/V) a permis de déterminer un facteur de concentration en complément des facteurs de purification caractérisés précédemment (Figure 5.2). Le pic de nisine après ED présente une aire sous courbe de $770,1 \pm 79,9$ AU et était significativement plus élevée que l'aire sous courbe du pic de nisine du CFS initial de $4,9 \pm 0,7$ AU ($p < 0.05$). Le pic de nisine après précipitation au sel à lui donnait une aire sous courbe de $399,6 \pm 59,3$ AU et était lui aussi significativement plus grand que le pic de nisine déterminé sur le CFS, mais plus faible que celui déterminé après ED. Ces aires sous pics permettent donc de déterminer des facteurs de concentration de l'ordre de 80x et 156x après précipitation au sel et après ED, respectivement, lorsque comparées avec le CFS initial.

Un taux de purification de 21,8 avec un rendement en activité de 70% a donc été obtenu après ED, ce taux de purification étant plus faible que celui déterminé précédemment dans le protocole de précipitation au sel où la saturation à 40% avait donné alors un taux de purification de 73,8 avec un rendement en activité de 60% (Tableau 5.1). Cela peut être dû au fait que les protocoles ne se sont pas fait à un même volume de travail, le protocole de précipitation au sulfate d'ammonium ayant été fait sur des volumes de CFS de 200mL, lorsque le protocole de purification par ED a été fait sur 2000 mL de CFS produits. Néanmoins, ces résultats restent comparables à ce qui a pu être rapporté pour d'autres techniques de purification communément employées dans la purification de la nisine (Tableau 5.4). Différents protocoles utilisant la précipitation au sulfate d'ammonium ont par exemple reporté des facteurs de purification pour la plupart plus faible que ceux trouvés dans notre étude avec des facteurs de purification allant de 2,3 à 5,1 accompagné de rendement en activité de nisine de 62 à 98% [97,99,100]. Un taux de purification de 168,8 avec un rendement en activité de 90% a cependant été trouvé par Tafreshi et al (2020) [96] pour la purification de la nisine à l'aide de la précipitation au sulfate d'ammonium. Lorsque comparés à d'autres techniques communes pour la purification de la nisine, les taux de purification déterminés dans notre étude sont comparables aussi à ceux trouvés à l'aide des techniques chromatographiques comme la chromatographie d'échange cationique avec un taux de purification de 31 (21,8 pour notre étude), mais avec un rendement en activité de 20% (comparé à 70%) [96]. D'autres techniques chromatographiques ont été étudiées notamment par Suárez et al [121] qui ont purifié la nisine jusqu'à un facteur de 10 et avec un rendement en activité de 72% de nisine à l'aide de la chromatographie par immunoaffinité. La chromatographie par échange d'ion a aussi été étudiée pour la purification de la nisine, démontrant des taux

de purification élevés de l'ordre de 31 fois, et ce avec un rendement de 90 en activité de nisine [93]. Les techniques d'extraction par solvant ont aussi été utilisées dans la purification de la nisine : l'extraction à l'aide du méthanol et de l'éthanol a par exemple été appliquée sur une solution commerciale de nisine contenant 2,5% de nisine et a permis de démontrer des facteurs de purification de 5,3 et 5,5 avec des rendements en activité de 91 et 85% respectivement [122]. Des résultats similaires ont été trouvés par Taylor et al [103] avec l'utilisation de mêmes solvants sur une solution commerciale, démontrant des taux de purification de 5,98 et de 1,93 accompagnés de rendement en activité de 52,4 et 63,0%, respectivement pour le méthanol et l'éthanol. L'extraction à l'aide du chloroforme a aussi été rapportée dans la littérature avec un taux de purification de 37,4 pour un rendement en activité de 24% [96]. D'autres techniques moins communément employées dans la purification de la nisine ont été étudiées dans la purification de la nisine à partir d'un extrait brut après production de la nisine. Forestier et al [120] ont notamment étudié la purification de la nisine par ultrafiltration à partir d'un surnageant de culture en utilisant une membrane de polyéther sulfone (PES) de 10kDa en seuil de coupure et ont montré notamment au taux de purification de 4,0 avec un rendement de 100%.

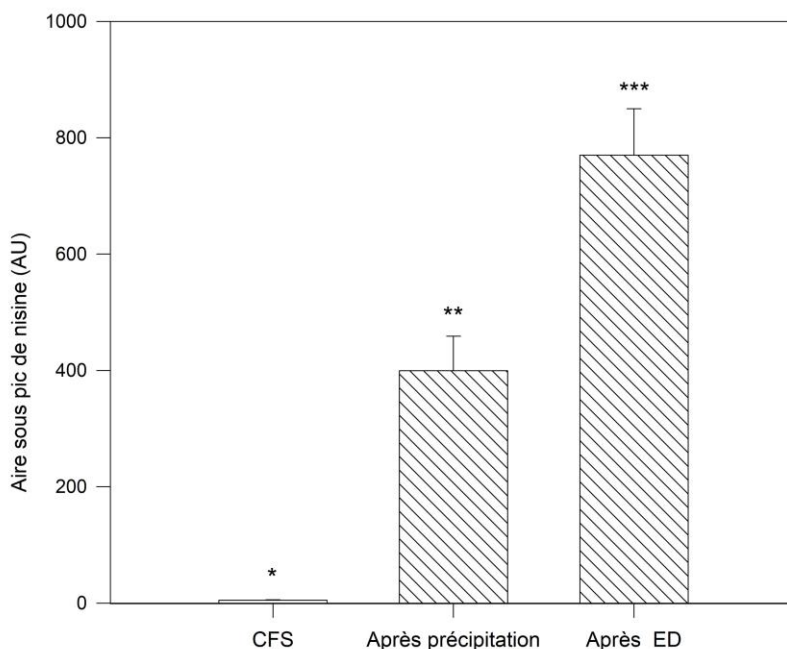


Figure 5.2 : Aire sous pic de la nisine déterminée par UPLC sur le CFS initial, après précipitation au sel et après ED. Le pic de nisine a été confirmé par spectrométrie de masse en accord avec la masse moléculaire rapportée de la nisine de 3 500 Da.

De plus ces résultats sont comparables avec ceux déterminés dans le chapitre précédent où la purification par ED d'une solution commerciale de nisine, comparée avec un protocole de centrifugations successives, a permis la purification de la nisine à hauteur de 1,2 en termes de facteur de purification avec un rendement de 83,8. Ces deux techniques ont aussi présenté des facteurs de concentration de 10,4 pour l'ED et de 47,8 pour la centrifugation successive qui a cependant présenté des rendements faibles. L'application de l'ED pour la purification de la nisine à partir d'un CFS comparé à la purification à partir d'une solution commerciale se révèle donc efficace et de grand intérêt.

Bien que présentant des facteurs de purification et des rendements an activité comparable aux autres techniques rapportées dans la littérature (Tableau 5.4), l'ED présente certains avantages notamment en tant que procédé plus respectueux de l'environnement avec une consommation énergétique généralement plus faible, comparé à la centrifugation notamment, ainsi que le fait que la purification par ED n'utilise pas de solvants chimiques comme l'extraction par solvants ou les techniques chromatographiques par exemple. De plus, l'ED en tant que procédé versatile pourrait être implémenté à l'échelle industrielle dans les procédés de purification comparée aux autres méthodes caractérisaient par des coûts élevés [195].

Tableau 5.4 : Comparaison des différentes techniques utilisées dans la purification de la nisine avec facteur de purification et rendement en activité de nisine.

Schéma de purification	Source de la nisine	Facteur de purification	Rendement en activité (%)	Références
Électrodialyse après précipitation au sulfate d'ammonium	Extrait brut	21,8	70	Cette étude
Électrodialyse	Solution à 2.5% de nisine	1,9	/	Chapitre 4
Précipitation au sulfate d'ammonium	Extrait brut	3,8	94	[100]
	Extrait brut	2,5	62	[99]
	Extrait brut	5,1	98	[97]
Chromatographie d'échange d'ions	Extrait brut	31	20	[96]

	Extrait brut	31	90	[93]
Chromatographie d'immunoaffinité	Extrait brut	10	72	[121]
Chromatographie d'interaction hydrophobe	Extrait brut	10,9	50,8	[99]
Méthanol	Solution à 2.5% de nisine	5,3	91	[122]
	Solution à 2.5% de nisine	6,0	52,4	[103]
Éthanol	Solution à 2.5% de nisine	5,5	85	[122]
	Solution à 2.5% de nisine	1,9	/	[103]
Chloroforme	Extrait brut	37,4	24	[96,98]
Ultrafiltration	Extrait brut	4,01	100	[120]

5. Conclusion

La précipitation au sel pour la purification des protéines est une technique couramment employée, généralement en tant que première étape permettant une première grande étape de concentration en réduisant le volume de la solution à traiter. Ceci est spécialement vrai pour la purification des bactériocines et de la nisine du fait que leur production est caractérisée par des rendements de production faibles [202]. Le faible coût du sulfate d'ammonium et le besoin de concentrer la nisine à partir du surnageant de culture sont les principales raisons de l'implémentation d'une étape de précipitations aux sels dans le processus de purification de la nisine. Après précipitation aux sels, de grandes quantités de solutions concentrées en sulfate d'ammonium sont généralement rejetées lorsqu'elle est suivie par les techniques de dialyse et de chromatographie. En plus d'être caractérisées par de faibles rendements en nisine, ces techniques sont aussi caractérisées par la production d'effluents salins représentant une source de pollution ainsi que des contraintes techniques et économiques quant à leur traitement [164].

Dans ce travail, un schéma de production et de purification de la nisine a donc été proposé. Après production de la nisine sur un milieu alternatif, fait à partir d'un perméat de lactosérum supplémenté, l'efficacité d'une précipitation au sulfate d'ammonium suivi d'une purification par ED a permis d'être démontré avec la production d'une fraction de

nisine présentant des facteurs de purification et de concentration élevée de l'ordre de 21,8 et 156 respectivement, et ce avec un rendement en activité de nisine de 70%. Dans la précédente étude (Chapitre 4) les procédés d'ED et de centrifugations successives ont été appliqués à la purification de la nisine à partir d'une solution commerciale de nisine, démontrant des facteurs de concentration de 10,4 et de 47,8 respectivement.

Parmi les différentes méthodes utilisées pour le traitement des effluents salins comme les méthodes thermiques, les méthodes biologiques ou encore les méthodes à l'aide de membrane, l'ED dans le cas des effluents produits par précipitations au sulfate d'ammonium présente la possibilité d'être utilisée dans une perspective d'économie circulaire en permettant le traitement des effluents salins en recyclant le sel afin que celui-ci puisse être réutilisé dans l'étape de précipitation implémentée ici dans le processus de purification de la nisine. Comme illustré sur la Figure 5.3, le schéma d'économie circulaire peut être implémenté tout d'abord par l'utilisation de co-produit pour la production de la nisine, avec ici l'utilisation d'un perméat de lactosérum issu de l'industrie agroalimentaire. L'utilisation du perméat de lactosérum ou d'autres co-produits permettant de recycler des effluents de l'industrie agroalimentaire tout en réduisant les coûts de production de la nisine, actuellement un des freins à l'exploitation de la nisine. De plus, le concept d'économie circulaire se reflète aussi par l'utilisation de l'ED dans la purification de la nisine, nisine produite qui aura des applications en tant que conservateur dans l'industrie agroalimentaire, mais aussi dans le traitement des effluents salins produits par l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium, un des plus grands problèmes à l'emploi de cette technique, afin de réduire la quantité d'effluents polluants produits et de plus en permettant la réutilisation des sels récupérés par ED. L'utilisation de l'ED dans le traitement des effluents hautement salés et des eaux de rejets a déjà été démontrée dans la littérature par Chen et al (2020) ainsi que par Bazinet et al (2020) [196,203]. Ceci peut aussi être soutenu par le fait que les résultats de purification retrouvés sont comparables aux autres techniques communément utilisées pour la purification de la nisine avec l'ED présentant comme avantages d'être un procédé plus respectueux de l'environnement en termes de consommation énergétique ou par l'absence d'utilisation de solvants [167,196,197].

Ce travail a donc permis de démontrer l'efficacité de l'ED dans la purification de la nisine avec des facteurs de purification et de concentration élevés, lorsque comparés aux différentes techniques communément employées. À notre connaissance, aucune étude n'a été reportée dans la littérature concernant l'utilisation de l'ED dans la purification de

la nisine à partir d'un surnageant de culture complexe. De plus, la perspective de pouvoir implémenter la production de la nisine une démarche écocirculaire, de sa production à l'aide de co-produit à sa purification par ED permettant le retraitement des effluents produits est une nouvelle perspective présentée.

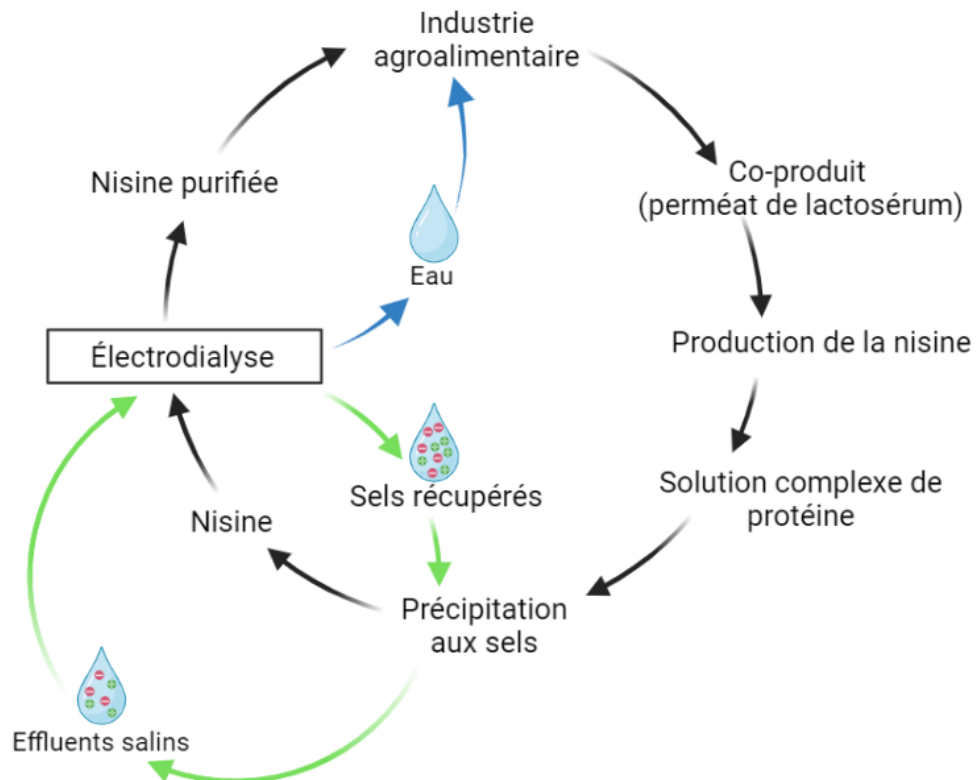


Figure 5.3 : Concept d'écocircularité pour la production et la purification de la nisine par ED et le traitement des effluents salins.

Chapitre VI : Purification de la nisine à partir d'un surnageant de culture complexe par ultrafiltration

1. Introduction

Dans ce chapitre, nous étudions la séparation de la nisine par ultrafiltration et comparons les performances avec celles obtenues par électrodialyse. Comme détaillé dans le chapitre 1, l'ultrafiltration va permettre la séparation de la nisine par la sélection d'une membrane poreuse possédant un seuil de coupure défini tenant compte de la taille de la nisine et celle des différents constituants du milieu, et ce sous l'effet d'un gradient de pression. Comme dans le chapitre 5, nous étudions la séparation de la nisine après une étape de précipitation par sulfate d'ammonium du surnageant de culture après fermentation sur perméat de lactosérum. Les résultats sont comparés à ceux obtenus en appliquant l'ultrafiltration sans pré-purification.

2. Caractérisation des solutions traitées

Le surnageant de culture (CFS) et la solution obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium ont été caractérisés en termes de pH, de conductivité ainsi que de teneur en protéines et de matières sèches. Les différents paramètres mesurés sont présentés dans le Tableau 6.1.

Tableau 6.1 : Caractéristiques des deux solutions de nisine traitées par ultrafiltration.

Caractéristiques	Solution traitée	
	CFS	Solution après précipitation
pH	4,53 ± 0,33	3,85 ± 0,52
Conductivité (mS.cm ⁻¹)	8,76 ± 0,53	12,06 ± 2,74
Matière sèche (%)	8,17 ± 1,38	0,43 ± 0,11
Protéines (g.L ⁻¹)	2,92 ± 0,39	0,47 ± 0,22

Les pH mesurés diffèrent du fait de la précipitation au sulfate d'ammonium où le pH a été ajusté avant l'étape à 3,8 afin de permettre la précipitation dans les conditions les plus stables possibles pour la nisine. Le pH de 4,53 ± 0,33 est le pH du CFS après fermentation de 24H et est dû à la production d'acide lactique durant la production de la nisine par *L.Lactis* UL 719. La différence de conductivité s'explique facilement par la présence de sels de sulfate d'ammonium retrouvée dans le culot après l'étape de précipitation donnant une conductivité plus élevée à la solution prépurifiée de 12,03 ± 2,74 mS .cm⁻¹ que celle du CFS sans précipitation au sel avec une conductivité de 8,76 ± 0,53 mS .cm⁻¹. La mesure de matière sèche et de la teneur en protéine entre les deux solutions permet d'observer la plus grande différence dans leur caractérisation. La matière sèche mesurée dans le CFS sans traitement est de 7,19, bien plus élevée que

celle mesurée dans la solution prépurifiée par précipitation au sulfate d'ammonium avec une teneur en matière sèche de $0,43\% \pm 0,11$. Cette différence peut s'expliquer par la différence de concentration en protéines des deux solutions : le CFS présente une teneur en protéine de $2,67 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ contre $0,47 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$ pour la solution prépurifiée au sel. Cette différence de concentration en protéine permet de montrer la capacité de l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium à éliminer une grande partie des protéines présentes dans le CFS initial.

3. Evolution des flux de perméat

2.1.1. Perméabilité à l'eau de la membrane d'ultrafiltration

Avant traitement par ultrafiltration des surnageants de culture et des solutions issues de l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium, la perméabilité à l'eau des membranes utilisées a été mesurée à l'eau distillée sur une gamme de pression transmembranaire allant de 1 à 5 bars. Ces mesures vont notamment permettre la détermination de la résistance intrinsèque de la membrane ainsi que la récupération du flux à l'eau initial de la membrane après nettoyage.

Les flux à l'eau aux différentes pressions testées sont présentés sur la Figure 6.1. La courbe obtenue montre une évolution linéaire des de perméat en fonction de la PTM, le flux à l'eau ne dépendant ici que de la résistance de la membrane sans colmatage [204]. Le flux à l'eau moyen obtenu à une pression transmembranaire de 2 bars est de $214,86 \pm 32,85 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$. Les résultats obtenus ont également permis de déterminer une perméabilité L_{w0} et une résistance R_m moyennes de la membrane de $108,41 \pm 14,13 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ et de $3,67 \pm 0,76 \times 10^{12} \text{ m}^{-1}$, respectivement.

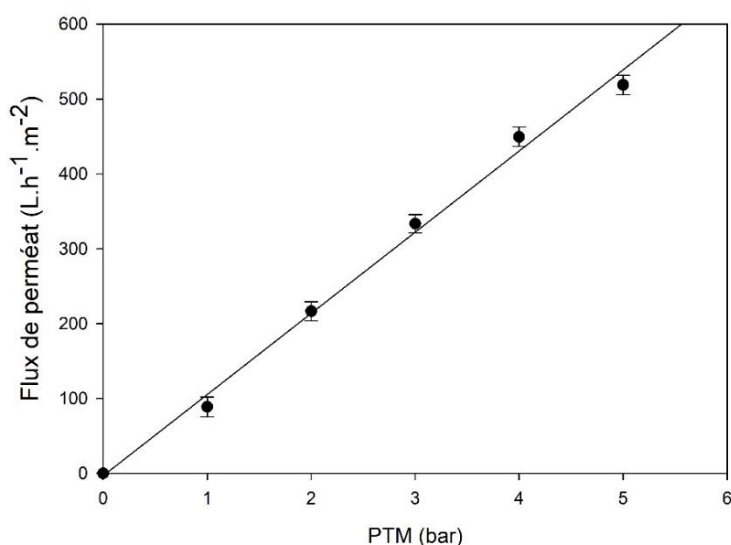


Figure 6.1: Flux de perméat à l'eau des membranes d'ultrafiltration à différentes PTM à 20°C

2.1.2. Flux de perméat en mode recirculation totale

Afin de déterminer la pression transmembranaire pour les essais d'ultrafiltration, le flux de perméat a été mesuré à différentes pressions en recirculation totale. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 6.2.

La courbe obtenue permet d'observer une augmentation linéaire du flux de perméat jusqu'à atteindre un plateau voire une diminution du flux de perméat. Cette différence d'évolution permet de définir la pression à 3 bars comme la PTM à laquelle le flux cesse d'augmenter de façon linéaire. Afin de déterminer la pression de travail tout au long de ces travaux, la PTM de 3 bars a donc été prise comme référence en tant que pression transmembranaire critique à partir de laquelle le flux de perméat n'évolue plus de façon linéaire. Pour les essais d'ultrafiltration, la PTM de travail a donc été fixée à 2 bars, correspondant ainsi à 80%, de la pression critique.

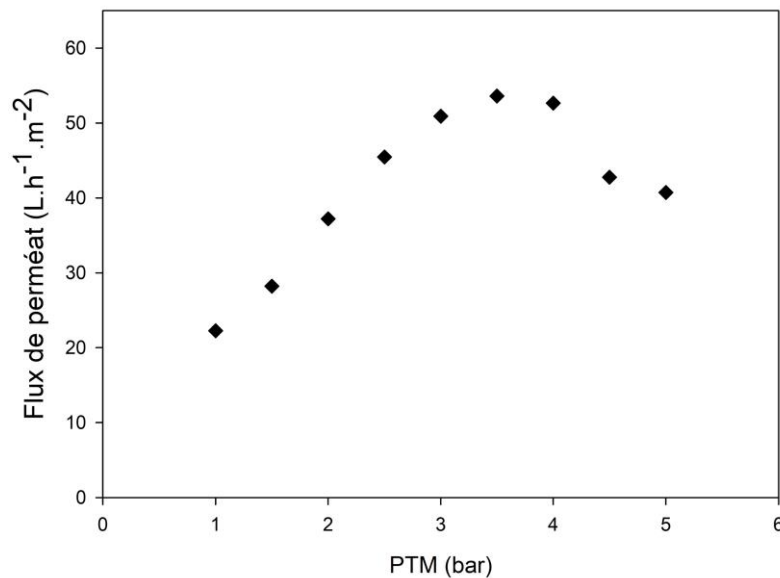


Figure 6.2 : Flux de perméat du surnageant de culture mis en recirculation à sur différentes PTM de 1 à 5 bars à 20°C. Le plateau observé à partir de 3 bars permet de déterminer une PTM de travail de 2 bar (<80% à la PTM limite).

2.1.3. Flux de perméat en mode concentration

2.1.3.a étape de concentration

Après avoir fixé la pression transmembranaire à 2 bars, l'ultrafiltration a été appliquée en vue de la purification de deux CFS, le premier ayant subi préalablement une étape

de pré-purification par précipitation au sulfate d'ammonium, et le deuxième sans étape de précipitation. Pour chacune de ces deux solutions, l'ultrafiltration a été réalisée en mode concentration jusqu'à atteindre un facteur de réduction volumique (FRV) de 5. L'évolution du flux de perméat en fonction du FRV atteint (Figure 6.3) permet d'observer une diminution du flux au cours de l'ultrafiltration et permet aussi d'observer une différence d'évolution entre le CFS avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium. Le CFS sans précipitation préalable voit son flux de perméat diminuer rapidement jusqu'à atteindre un FRV de 1,2, à partir duquel la diminution du flux est moins importante. Une évolution un peu différente peut être observée pour le CFS avec précipitation avec une diminution importante jusqu'à atteindre un FRV de 2,1. Cette diminution du flux de perméat peut facilement être attribuée aux phénomènes de concentration de polarisation et de colmatage par les constituants présents dans le CFS traité. Comme décrit dans la section 5.3 du chapitre 1, ces phénomènes sont caractéristiques des procédés de filtration à membrane et amplement décrits dans la littérature [143,205]. La diminution du flux de perméat en fonction du FRV permet donc de décrire deux étapes dans la diminution des flux de perméat, principalement pour le CFS sans précipitation, avec une première étape de diminution significative du flux jusqu'à atteindre un FRV de 1,2 et de 2,1 pour le CFS sans et avec précipitation respectivement, suivi d'une évolution quasi stable des flux de perméat avec de faibles diminutions jusqu'à atteindre un FRV de 5. Les flux de perméat atteints à la fin de l'ultrafiltration pour les deux CFS sont de 22,8 et de 18,9 L.h⁻¹.m⁻² pour le CFS avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium, respectivement. La différence observée dans l'évolution des flux de perméat entre les CFS avec et sans précipitation peut s'expliquer notamment par la différence de concentration en protéines, la précipitation au sulfate d'ammonium étant une étape de pré-purification permettant de séparer la nisine d'autres protéines présentes dans le CFS initial. La teneur en protéine du CFS après précipitation au sulfate d'ammonium et resolubilisé dans 500mL d'eau distillée a notamment été estimée à 0,42 ± 0,22 mg.mL⁻¹ et peut être comparée à celle mesurée dans le CFS sans précipitation à 2,67 ± 0,04 mg.mL⁻¹. Cette différence de concentration en protéine peut donc expliquer la plus forte diminution du flux ainsi que le fait que les premières valeurs de flux de perméat soit plus faible que celles du CFS avec traitement (36 L.h⁻¹.m⁻² contre à 45 L.h⁻¹.m⁻² pour le CFS sans et avec traitement respectivement pour la première valeur de flux de perméat mesurée). Ces observations peuvent être appuyées par l'étude de Bacchin et al [206] démontrant que plus la concentration de la solution traitée est élevée, plus le flux de perméat est faible. La plus forte concentration en protéine du CFS sans précipitation au sulfate d'ammonium favoriserait donc les phénomènes limitants de

colmatage et de concentration de polarisation par l'accumulation des particules sur la membrane.

Les flux de perméat après ultrafiltration correspondent à une diminution de l'ordre de 78,9 et 82,5% respectivement pour le CFS avec et sans précipitation préalable. Ces observations sont cependant en accord avec ce qui a pu être décrit dans la littérature, Chen et al [207] décrivent que le flux de perméat après ultrafiltration pouvait diminuer jusqu'à 98% par rapport au flux de perméat à l'eau initial. Ces diminutions de flux de perméat au cours de l'ultrafiltration sont dans le même ordre de valeurs que celles retrouvées par Forestier et al [120] étudiant la purification de la nisine à partir de surnageant de culture par la même membrane.

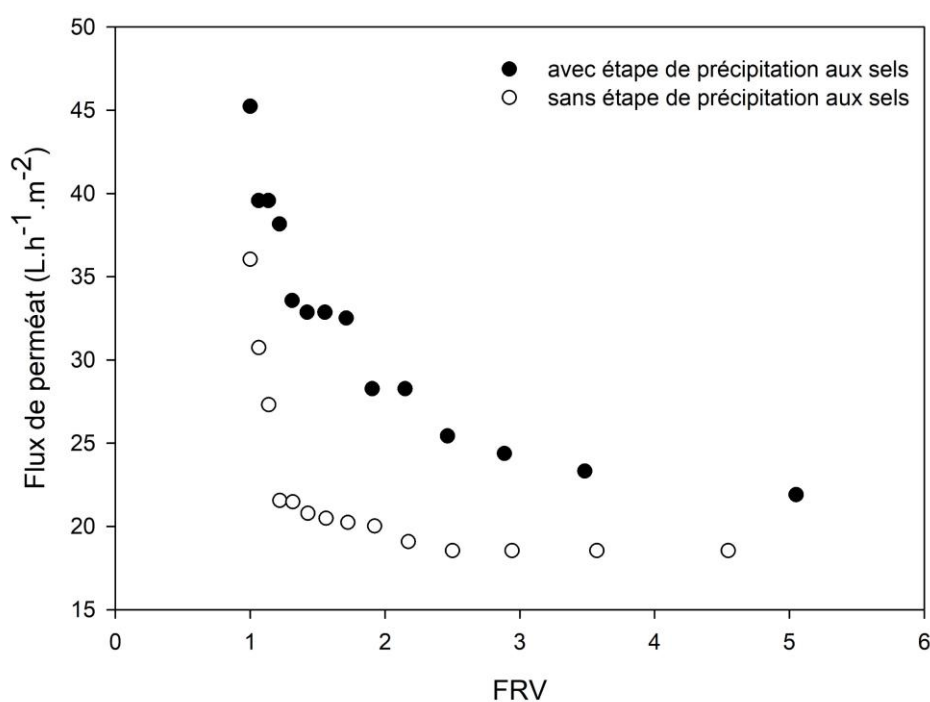


Figure 6.3 : Évolution des flux de perméat moyens lors de la première étape de concentration des surnageants de cultures complexes en fonction du FRV. (●) Avec étape de précipitation au sulfate d'ammonium ; (○) Sans étape de précipitation au sulfate d'ammonium.

2.1.3.b étape de diafiltration

Le rétentat obtenu à l'issue de l'étape de concentration a été diafiltré en resolubilisant le rétentat jusqu'à 500 mL de volume à l'aide d'eau distillée. La mesure des flux de perméat moyen au cours de la diafiltration permet de voir premièrement un flux initial plus élevé que le flux final mesuré lors de l'étape de concentration pour les deux solutions traitées (flux moyens initial de 38 et de 23 L.h⁻¹.m⁻², respectivement pour la solution prépurifiée

et le CFS, contre 22 et 18 L.h⁻¹.m⁻² pour les flux de perméat à la fin de la concentration. Cette différence de flux peut s'expliquer par l'ajout d'eau distillée afin d'obtenir une solution d'alimentation de 500 mL, permettant de diminuer la concentration de la solution traitée, la concentration ayant une influence sur la perméabilité de la membrane comme décrit précédemment [206]. La diminution des flux de perméat se fait ensuite rapidement, cette fois ci en deux temps pour les deux solutions traitées, avec une première diminution rapide de 38 et de 23 L.h⁻¹.m⁻² à 30 et 16 L.h⁻¹.m⁻², respectivement pour la solution avec et sans précipitation. Après ces valeurs les flux de perméat restent relativement stables, diminuant légèrement vers la fin de l'étape de diafiltration pour atteindre une valeur de flux de 28 et 14 L.h⁻¹.m⁻². Ces valeurs finales sont légèrement différentes des flux atteints après la première étape de concentration qui étaient de 22,8 et de 18,9 L.h⁻¹.m⁻² pour la solution avec et sans précipitation. Cette étape de diafiltration permet de mieux observer la diminution en deux étapes des flux de perméat comme observer dans l'étape de concentration. Cette diminution en deux étapes est cette fois ci observable pour les deux solutions, avec une diminution rapide jusqu'à atteindre une FRV de 2 et 1, respectivement pour la solution prépurifiée et le CFS, avant d'observer une moindre diminution jusqu'à la fin du traitement.

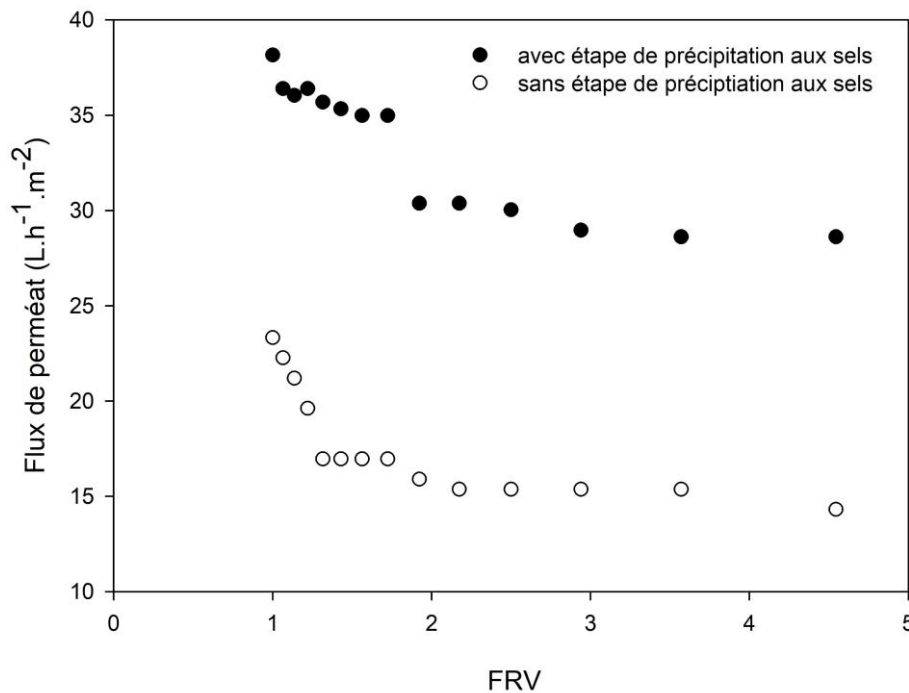


Figure 6.4 : Évolution des flux de perméat moyens lors de la deuxième étape de diafiltration des surnageants de cultures complexes en fonction du FRV. (●) Avec étape de précipitation au sulfate d'ammonium ; (○) Sans étape de précipitation au sulfate d'ammonium.

2.2. Caractérisation du colmatage des membranes

2.2.1. Efficacité du nettoyage et indice de colmatage

La mesure de la perméabilité membranaire aux différentes étapes du nettoyage a permis de caractériser le colmatage par la détermination de l'indice de colmatage IC (Équation 11) et l'efficacité du nettoyage EN pour le CFS avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium (Tableau 6.2).

La perméabilité à l'eau après rinçage et nettoyage met en évidence une perte de la perméabilité durant la filtration avec des L_{p1} de $0,41 \pm 0,008$ et de $0,41 \pm 0,009 \text{ m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ($\times 10^{10}$) très inférieurs aux L_{p0} mesurées initialement à $2,73 \pm 0,579$ et $3,28 \pm 1,166 \text{ m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ($\times 10^{10}$), respectivement pour les CFS avec et sans précipitation. Ces valeurs de perméabilité initiale ont été retrouvées, en prenant en compte la variabilité des résultats, lorsque la mesure de flux de perméat à l'eau a été réalisée après nettoyage (L_{p2} à $2,57 \pm 0,054$ et $3,35 \pm 0,095 \text{ m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ($\times 10^{10}$)).

Tableau 6.2 : Perméabilité à l'eau des membranes avant et après traitement et nettoyage, indice de colmatage et efficacité de nettoyage.

	Caractéristiques des membranes	
	Avec précipitation aux sels	Sans précipitation aux sels
L_{p0} ($\times 10^{10} \text{ m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)	$2,73 \pm 0,579$	$3,28 \pm 1,166$
L_{p1} ($\times 10^{10} \text{ m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)	$0,41 \pm 0,008$	$0,41 \pm 0,009$
L_{p2} ($\times 10^{10} \text{ m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)	$2,57 \pm 0,054$	$3,35 \pm 0,095$
IC (%)	$84,83 \pm 2,90$	$86,79 \pm 4,41$
EN (%)	$94,38 \pm 0,06$	$103,2 \pm 7,72$
J_{w0} ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)	$208,33 \pm 35,00$	$219 \pm 43,53$
J_s ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$)	$27,50 \pm 3,53$	$18,36 \pm 2,31$

L'indice de colmatage obtenu sur la membrane après ultrafiltration du CFS sans précipitation au sulfate d'ammonium est légèrement plus élevé avec un IC de $86,79 \pm 4,41\%$ contre $84,83 \pm 2,90\%$ pour le CFS avec précipitation. La caractérisation de ces IC permet donc de confirmer que la diminution observée des flux de perméat au cours de la purification est due à l'apparition de phénomènes de colmatage sur les membranes PES. Cet IC est aussi à mettre en parallèle de l'indice d'efficacité du nettoyage (EN) démontrant que le nettoyage des membranes ne permet pas de retrouver la perméabilité

initiale de la membrane avec un EN plus élevé pour la membrane après UF du CFS sans précipitation lorsque comparé avec la membrane après UF du CFS avec précipitation ($103,2 \pm 7,72\%$ et $94,38 \pm 0,06\%$ respectivement). Les résultats obtenus nous permettent donc de conclure l'apparition de différents colmatages sur les membranes de PES, selon le CFS traité, et notamment d'un colmatage irréversible dans le cas du CFS prépurifié ne permettant pas de retrouver la perméabilité initiale malgré le nettoyage chimique.

2.2.2. Modèle de résistance en série

Les différentes résistances contribuant au colmatage ont été déterminées (Équation 12) à l'aide du modèle de résistances en série. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 6.3. La détermination de la résistance totale (R_t) permet de voir que la résistance des membranes UF est plus élevée après traitement du CFS sans précipitation que celui avec précipitation, avec des valeurs de $26,40 \pm 3,4$ et $39,52 \pm 4,9$ $\text{m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ ($\times 10^{12}$) respectivement. Le rapport de résistance due au colmatage R_{fc} sur R_t permet de caractériser le phénomène de colmatage comme significativement important selon Aouni et al [208] qui considère qu'un colmatage est important lorsque R_{fc}/R_t est supérieur à 50%. Dans notre étude, les rapports R_{fc}/R_t obtenus sont de $85,48 \pm 4,9\%$ et $91,90 \pm 1,9\%$, respectivement pour le CFS avec et sans traitement, et sont donc significativement supérieur à la valeur de 50% définie dans la littérature. Ces résultats sont en accord avec les observations faites sur l'évolution des flux de perméats lors de l'UF où le CFS sans précipitation présentait la plus forte diminution de flux de perméat s'expliquant alors par une plus forte résistance de la membrane à permettre le passage des solutés à travers elle.

La caractérisation de la résistance due au colmatage permet de diviser cette résistance en une résistance réversible R_{rev} et une résistance irréversible R_{irr} . La détermination de ces résistances (Tableau 6.3) permet d'observer une plus grande contribution de la résistance irréversible dans le phénomène de colmatage avec des valeurs de $65,10 \pm 3,7\%$ et $57,37 \pm 6,8\%$ pour le CFS avec et sans précipitation respectivement. Ces résultats permettent aussi d'observer une contribution plus élevée de R_{irr} pour le CFS avec précipitation. La Figure 6.5 permet de mieux représenter la différence de contributions des résistances à la résistance totale et au phénomène de colmatage en représentant sous forme d'histogrammes compilées les ratios R_{irr}/R_{fc} et R_{rev}/R_{fc} .

Tableau 6.3 : Résistances déterminées durant l'ultrafiltration des surnageants de culture avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium

	R_t ($\times 10^{12} \text{ m}^{-1}$)	R_m ($\times 10^{12} \text{ m}^{-1}$)	R_{fc} ($\times 10^{12} \text{ m}^{-1}$)	R_{rev} ($\times 10^{12} \text{ m}^{-1}$)	R_{irr} ($\times 10^{12} \text{ m}^{-1}$)	R_m/R_t (%)	R_{fc}/R_t (%)	R_{rev}/R_t (%)	R_{irr}/R_t (%)
Avec précipitation	26,40 ± 3,4	3,75 ± 0,8	22,65 ± 3,4	5,52 ± 2,9	17,22 ± 1,2	14,52 ± 4,9	85,48 ± 4,9	20,38 ± 8,6	65,10 ± 3,7
Sans précipitation	39,52 ± 4,9	3,25 ± 1,1	36,27 ± 3,8	13,77 ± 3,7	22,50 ± 0,1	8,05 ± 1,8	91,90 ± 1,9	34,53 ± 4,9	57,37 ± 6,8

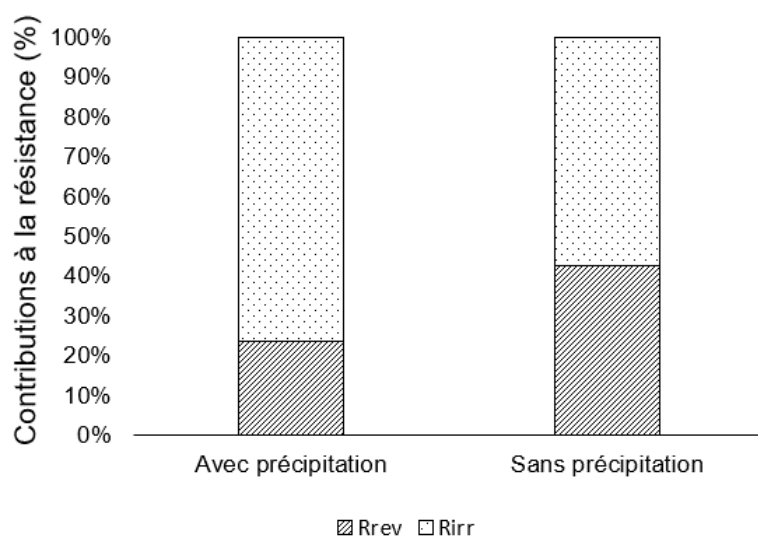


Figure 6.5 : Contributions des différents colmatages à la résistance globale du colmatage. R_{rev} : colmatage réversible ; R_{irr}, colmatage irréversible.

La détermination des différentes résistance R_{irr} et R_{rev} permet donc de caractériser différents phénomènes de colmatage. R_{rev} caractérise notamment l'apparition de concentration de polarisation et de phénomène de colmatage à la surface de la membrane quand R_{irr} caractérise plutôt le blocage des pores de la membrane par adsorption de particules et de molécules dans la membrane [209].

2.3. Caractérisation de la purification des CFS

L'efficacité de la séparation de la nisine par ultrafiltration a été déterminée par la mesure de différents paramètres tels que la teneur en protéine, permettant la détermination des bilans de masses (Tableau 6.4) des fractions avant UF et issues des différentes étapes d'UF (concentration et diafiltration), ainsi que l'activité antimicrobienne. Ces mesures ont notamment permis de déterminer l'activité spécifiques des fractions, ainsi que leur rendement en activité et leur facteur de purification. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 6.5.

2.3.1. Bilans matières

Le bilan matière des différents protocoles d'ultrafiltration a été déterminé par la mesure des concentrations en protéines et en matières sèches des différentes fractions R1, P1, R2 et P2. Ces valeurs détaillées dans le Tableau 6.4 permettent d'observer la rétention

totale des protéines par les membranes d'UF lors de l'étape de concentration et de diafiltration pour la solution prépurifiée. Le bilan matière pour la fraction R1 de la solution prépurifiée ne permet de retrouver que 36,6% des protéines de la solution, le perméat P1 ne permettant pas la mesure de protéine (en raison d'une trop faible concentration). La différence en termes de balance de matière sèche entre le rétentat et le perméat (peu importe la condition de la solution traitée et l'étape d'ultrafiltration) s'explique par la présence dans le surnageant de culture complexe de différentes molécules de faibles tailles moléculaires pouvant donc traverser la membrane d'UF. C'est le cas notamment des sels contenus dans le CFS et surtout la solution prépurifiée, mais aussi des acides organiques comme l'acide lactique produit durant la fermentation, ou encore le lactose composant le milieu de perméat de lactosérum. Le passage d'AA à travers la membrane permet aussi d'expliquer cette différence.

La principale différence des bilans matière déterminés est la présence en grande quantité de protéine dans les perméats issus de la concentration et la diafiltration du CFS sans précipitation au sulfate d'ammonium avec des bilans de matière de protéine de 50,4 et 43,0% pour P1 et P2 respectivement, contrairement aux bilans en protéines des perméats issus de l'ultrafiltration de la solution prépurifiée où aucune valeur de concentration en protéine n'a pu être déterminée. Ceci permet donc d'observer la présence dans le CFS initial d'une concentration importante de composés protéiques dont des peptides et des AA, pouvant traverser la membrane d'UF, que l'on ne retrouve pas dans la solution après précipitation au sulfate d'ammonium. L'étape de précipitation au sulfate d'ammonium a donc permis de séparer la nisine de composés protéiques de faible taille moléculaire comme il a été observé lors de la mesure de la concentration en protéines dans le CFS et la solution prépurifiée (Tableau 6.1). La concentration en protéine ainsi que la mesure de la matière sèche totale des solutions permet de montrer que dans la solution prépurifiée, les protéines représentent 15% de la matière sèche totale alors qu'elles ne représentent que 3,7% de la matière sèche totale dans le CFS sans précipitation.

Le bilan matière de protéines dans les perméats et les rétentats issus de l'ultrafiltration du CFS permettent de retrouver la quasi intégralité des protéines de la solution initiale avec un bilan de 89,9% après l'étape de concentration. Ce bilan est grandement inférieur dans le cas de la solution prépurifiée où, après l'étape de concentration, seul 36,6% de la teneur en protéine est retrouvée dans le rétentat R1. Cette perte de matière en protéine peut s'expliquer par l'adsorption de ces composés sur la membrane d'UF, ne permettant pas de récupérer les protéines impliquées dans le colmatage. Cependant

cette raison seule ne permet pas d'expliquer le faible bilan en protéine. Les bilans matière en protéines déterminés après l'étape de diafiltration (et déterminer selon la quantité de protéine dans le rétentat R1 de l'étape précédente) permettent d'observer une récupération totale des protéines avec des bilans matières de 111,6 et 104,7% pour la solution prépurifiée et le CFS respectivement. Ces bilans nous permettent de conclure que les protéines restantes dans le rétentat après concentration ne sont pas impliquées dans le colmatage. Ceci est en accord avec les observations faites lors de la mesure des flux de perméat où l'on observe une très faible diminution du flux de perméat lors de l'étape de diafiltration.

Tableau 6.4 : Bilan de matières des protéines et de la matière sèche entre les différentes fractions issues de l'ultrafiltration des solutions avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium, détermine selon Équation 13.

		Fractions	Bilan matière	
			Protéine (%)	Matière sèche (%)
Avec précipitation	Concentration	R1	36,6	16,2
		P1	n/d	33,3
		Bilan (%)	36,6	49,6
	Diafiltration	R2	111,6	13,3
		P2	n/d	130,7
		Bilan (%)	111,6	144,0
Sans précipitation	Concentration	R1	33,7	25,1
		P1	50,4	64,8
		Bilan (%)	84,1	89,9
	Diafiltration	R2	61,6	56,1
		P2	43,0	88,5
		Bilan (%)	104,7	144,7

n/d : non déterminé

Les bilans de masses pour R2 et P2 ont été déterminé en prenant la teneur en protéine et en matière sèche dans le R1 avant diafiltration.

2.3.2. Facteur de purification et rendement en activité de nisine

L'activité antimicrobienne mesurée sur le CFS varie de 256 à 512 AU.mL⁻¹, cette différence étant observée entre le CFS sans et avec précipitation respectivement, mais ne représente que la différence d'un puit d'inhibition. Il peut ensuite être observé sur le Tableau 6.5 une augmentation de cette activité antimicrobienne dans les rétentats après concentration (R1) et après diafiltration (R2). En considérant l'activité antimicrobienne initiale pour chaque CFS, l'augmentation observée dans les rétentats sont de même ordre avec une augmentation de 512 à 2084 AU.mL⁻¹ pour le CFS avec précipitation, et une augmentation de 256 à 1024 AU.mL⁻¹ pour le CFS sans précipitation. La très faible activité mesurée dans les perméats (8 à 16 AU.mL⁻¹) permet de confirmer que la nisine soit bien retenue par les membranes d'UF. Ces résultats, qui indiquent la capacité des membranes de 10 kDa à retenir la nisine, sont en accord avec ce qui a pu être rapporté dans la littérature sur la capacité de la nisine à former des multimères [17], Tryfon et al décrivant les phénomènes de dimérisation des molécules de nisine [210], mais aussi potentiellement, issues de la supplémentation en extrait de levure et de la fermentation de *L.lactis* UL 719, [26]. Ce phénomène de formation de multimères ont aussi été observés par Forestier et al [120] avec la rétention de la nisine sur une membrane PES de 10kDa et associant cette rétention de la nisine à la formation de dimères et de tétramères dans la solution.

La mesure de l'activité antimicrobienne et de la teneur en protéine dans chaque fraction a ensuite permis de déterminer leur facteur de purification, selon l'Équation 4. Les résultats démontrent un facteur de purification de 19,19 et 17,15 pour R1 et R2 respectivement. Ces facteurs de purification sont à mettre en parallèle des rendements en activités déterminés à 22,0 et 29,3% respectivement. Cependant, les rendements obtenus avec l'étape d'ultrafiltration sont de 81,4% et 73,2% pour R1 et R2, respectivement. Le CFS sans précipitation présente lui des facteurs de purification de 2,21 et 3,68 avec des rendements en activité de 78,0 et 80,0%. La perte en rendement d'activité dans le cas du CFS avec précipitation se produit après précipitation au sulfate d'ammonium où la caractérisation du culot resolubilisé permet de trouver un rendement en activité de 25,1%. Cette perte en rendement d'activité ne correspond pas aux rendements déterminés précédemment dans le chapitre 5 où la précipitation au sulfate d'ammonium à 40% de saturation en sels a permis de produire des fractions avec des rendements allant de 60 à 80%. Cette différence peut s'expliquer principalement par une différence de conditions opératoires dans l'étape de précipitation, où dans cette étude la précipitation n'a pu se faire à basse température (4°C) comme dans l'étude précédente.

Cette différence de température lors de la précipitation permettrait d'expliquer la perte en rendement d'activité. Cette précipitation au sulfate d'ammonium a cependant permis de prépurifier la nisine du CFS avec un facteur de purification de 8,21.

Ces résultats sont comparables à ce qui ont pu être déterminé dans le chapitre 4 et le chapitre 5 avec l'utilisation de l'ED pour la purification de la nisine avec des facteurs de purification de 1,9 pour la purification à partir d'une solution commerciale et un facteur de 21,8 pour la purification à partir d'un CFS après précipitation. Les résultats obtenus avec l'UF sont aussi comparable à ce qui peut être rapporté dans la littérature, notamment avec les autres techniques conventionnelles utilisées (Tableau 5.4), mais aussi des facteurs de purification de Forestier et al [120], démontrant un facteur de purification de 3,68 lors de la purification de la nisine à l'aide de membrane PES de 10kDa.

Tableau 6.5 : Paramètres de la purification de la nisine par ultrafiltration avec mesures de la teneur en protéine et de l'activité antimicrobienne pour la détermination de l'activité spécifique, du facteur de purification et du rendement en activité.

	Fractions	Protéine (mg/mL ⁻¹)	Activité antimicrobienne			
			Activité (AU.mL ⁻¹)	Activité spécifique (AU/mg de protéines)	Rendement (%)	Facteur de purification
Avec précipitation	CFS	3,03 ± 0,27	512	124,17 ± 48,24	100	1,00
	Culot (après précipitation)	0,47 ± 0,22	512	1020,12 ± 86,75	25,1	8,21
	R1	0,86 ± 0,03	2084	2383,00 ± 76,42	22,0	19,19
	P1	n/d	16	n/d	0,4	n/d
	R2	0,96 ± 0,05	2084	2129,57 ± 107,11	29,3	17,15
	P2	n/d	8	n/d	0,4	n/d
Sans précipitation	CFS	2,92 ± 0,39	256	88,42 ± 11,91	100	1,00
	R1	4,92 ± 0,39	1024	208,53 ± 16,41	78,0	2,36
	P1	1,85 ± 0,03	16	8,77 ± 0,16	5,03	0,10
	R2	3,04 ± 0,23	1024	338,24 ± 25,79	80,0	3,82
	P2	0,53 ± 0,06	8	23,86 ± 8,60	3,75	0,27

n/d : non déterminé

3. Conclusion

La purification de la nisine par ultrafiltration s'avère être un procédé efficace pour la purification de la nisine à partir de surnageants de culture complexes. La comparaison d'un surnageant de culture complexe et d'un CFS prépurifiée par précipitation au sulfate d'ammonium permet d'observer des comportements et des résultats différents. La caractérisation des solutions avant traitement permet notamment d'observer une différence de concentration en protéine et en matière sèche entre les deux solutions, la précipitation au sulfate d'ammonium permettant la séparation de la nisine d'autres composés protéiques du CFS. Cette différence s'observe également dans les bilans matière. Le suivi de l'évolution des flux de perméat au cours de l'ultrafiltration montre une plus grande diminution de celle-ci pour le CFS comparé au CFS prépurifié. Ces diminutions de flux de perméat sont dues aux phénomènes de colmatage. La détermination des indices de colmatage et d'efficacité de nettoyage n'a cependant pas permis de différencier les deux procédés et d'ainsi appuyer les observations faites sur l'évolution des flux. L'analyse de la résistance en série a permis de différencier le caractère réversible et irréversible du colmatage dans les deux cas de figure. L'apparition d'un colmatage irréversible sur les membranes semble plus importante dans le cas du CFS prépurifiée par rapport au CFS sans précipitation, les protéines représentant 15% de la matière sèche totale de la solution après précipitation, contre 3,71% dans le CFS sans précipitation. L'ultrafiltration des CFS, avec et sans précipitation au sulfate d'ammonium, s'accompagne donc de phénomènes de colmatages plus importants et en partie irréversibles. Ces phénomènes de colmatages permettant d'expliquer l'évolution et la diminution des flux de perméat au cours des deux étapes d'ultrafiltration (concentration et diafiltration).

La mesure des activités antimicrobiennes et de la teneur en protéine a permis de caractériser l'efficacité de l'ultrafiltration pour la purification de la nisine. Des facteurs de purification différents ont été déterminés avec des facteurs de purification de 19,19 et 17,15 pour les rétentats après concentration et diafiltration du CFS prépurifié. Dans le cas du CFS sans précipitation, les facteurs de purification de 2,21 et 3,68 ont été déterminés. Les rétentats issus des CFS avec précipitations démontrant des facteurs de purification plus élevés, mais accompagnés de pertes de rendement en activité, lorsque comparés au CFS sans traitement. Ces facteurs de purification s'accompagnent cependant de rendements en activité antimicrobienne de nisine. Ces rendements sont de 22,0 et 29,3% pour R1 et R2 du CFS prépurifié, et sont de 78,0 et 80,0% pour le CFS sans précipitations aux sels. Les faibles rendements observés dans le cas du CFS

prépurifié s'explique par une perte de nisine lors de l'étape de précipitations au sulfate d'ammonium, le culot récupéré étant caractérisé par un rendement en activité de 25,1%. Ces résultats permettent donc d'observer de plus importants facteurs de purification pour le CFS prépurifié, mais avec des rendements en activités moindres.

L'ensemble de ces résultats est comparable à la littérature. L'évolution des flux de perméats au cours de l'ultrafiltration est notamment comparable à ce qui a pu être observé par Forestier et al [120] et en accord avec les observations faites par Bacchin et al [206]. La caractérisation des fractions après UF en termes de rendements et de facteur de purification permet aussi de comparer le procédé d'UF aux procédés communément employés dans la purification de la nisine, ceux-ci étant résumés dans le Tableau 5.4. L'UF y présente notamment des facteurs de purification plus importants que les techniques d'extraction par solvants ou par précipitation aux sels. Elle présente aussi des facteurs de purification comparables aux techniques chromatographiques, l'UF présentant cependant des rendements supérieurs, mais aussi se présentant comme une technique plus modulable à grande échelle et n'employant pas de solvants contrairement aux techniques chromatographiques.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus dans les précédents chapitres permet donc de démontrer l'efficacité de l'UF et de l'ED dans la purification de la nisine à partir de surnageant de culture complexe. L'UF se caractérise cependant par l'apparition rapide de phénomènes limitants lors de la purification, avec une diminution rapide de la perméabilité de la membrane dans le cas des deux CFS (Tableau 6.2). Aussi, contrairement décrit précédemment pour l'ED, l'application d'une étape de précipitation au sulfate d'ammonium accompagne la purification de la nisine par la production de polluants salins dont la gestion représente une limitation aussi bien économique qu'écologique à grande échelle [164].

Conclusion générale et perspectives

Pendant ce projet de thèse, les objectifs se sont concentrés sur la production de la nisine en utilisant des sous-produits de l'industrie agroalimentaire comme des milieux de cultures alternatifs moins coûteux. Ensuite nous avons étudié la purification de la nisine en utilisant deux procédés membranaires pour la purification de la nisine : l'électrodialyse, qui permet la purification de la nisine en appliquant un courant électrique à travers des membranes échangeuses d'ions, et l'ultrafiltration, qui utilise un gradient de pression à travers une membrane poreuse.

Le troisième chapitre de cette thèse a permis de montrer que la souche bactérienne *L.lactis* UL 719 était plus efficace que la souche commerciale *L.lactis* ATCC 11454 pour production de la nisine. Elle a aussi permis de faire ressortir certains co-produits en termes d'activité antimicrobienne et de biomasse produites à l'issue de la fermentation avec les hydrolysats de peptones de pois et de poissons PROS. Ces deux hydrolysats de peptones démontrant les meilleures activités avec la souche UL 719. Ces activités restent toutefois inférieures à celles retrouvées dans le milieu commercial MRS. Ces résultats nous ont permis aussi d'observer qu'une plus grande production de biomasse ne permettait pas le meilleur rendement en nisine. Enfin cette étude a notamment permis de mettre en place les protocoles de production de la nisine nécessaire pour étudier sa séparation à partir de surnageant de culture complexe dans les chapitres suivants.

Le quatrième chapitre de cette thèse a abordé la séparation de la nisine à partir d'une solution commerciale en utilisant l'électrodialyse. Cette utilisation de l'ED pour la purification de la nisine, qui, selon nos connaissances, n'a pas été mentionnée dans la littérature, a permis de mettre en évidence un mécanisme d'interaction entre les molécules de nisine et les membranes échangeuses de cations. Grâce à la caractérisation du phénomène d'interactions, nous avons pu développer ensuite un protocole de purification de la solution commerciale de nisine par ED tout en préservant son activité antimicrobienne. Comparé à un procédé de centrifugation déjà connu et publié dans la littérature, ce protocole a démontré l'efficacité de l'ED pour la purification de la nisine, en montrant des facteurs de purification comparables à ceux obtenus avec différentes techniques rapportées dans la littérature. De plus, l'ED offre la perspective d'être un procédé plus respectueux de l'environnement en raison de sa faible consommation de solvants et de sa capacité à traiter les effluents salins produits pendant la purification de la nisine.

Le chapitre 5 a permis d'étudier la purification de la nisine à l'aide de l'ED et ce sur un surnageant de culture complexe. Ce chapitre, suite logique des deux chapitres précédents, a permis de suivre la production de la nisine de la fermentation sur perméat de lactosérum avec *L.lactis* UL 719, à sa purification par précipitation au sulfate d'ammonium et par ED. Cette étude a premièrement permis de valider l'efficacité de l'ED dans la purification de la nisine à partir d'un surnageant de culture avec des facteurs de purification et de concentration comparable à la littérature, confirmant aussi les résultats obtenus dans le chapitre 4. De plus, l'utilisation du perméat de lactosérum comme milieu de culture, et la perspective de pouvoir utiliser l'ED dans le traitement et le recyclage des sels utilisés pour la précipitation a permis de proposer un schéma d'économie circulaire de la production de la nisine comme illustré sur la Figure 5.3.

Enfin, dans le chapitre 6, nous avons étudié et comparé la purification de la nisine à partir d'un surnageant de culture complexe en utilisant le procédé d'ultrafiltration. L'application de l'UF sur le surnageant de culture, avec et sans étape de précipitation au sulfate d'ammonium, a permis de mettre en évidence différents facteurs de purification. Lorsque le surnageant de culture a été préalablement précipité au sulfate d'ammonium, le facteur de purification était de 19,19 après concentration par UF. Lorsque le surnageant n'a pas subi d'étape de précipitation préalable avant la concentration par UF, le facteur de purification était de 3,82.

La production de la nisine à l'aide de différents co-produits, ainsi que sa séparation par procédé d'UF et d'ED ont été démontrés. La production de la nisine s'est avérée efficace sur quelques co-produits d'hydrolysats de protéines de pois et de poisson PROS, démontrant que la production de la nisine n'était pas forcément liée à la production de la biomasse bactérienne. Ces travaux ont ensuite permis de mettre en évidence l'efficacité de l'ED pour la purification de la nisine. Une première étude a permis de décrire pour la première des phénomènes d'interactions de la nisine avec les membranes échangeuses de cations lors de l'ED. À la suite la purification de la nisine produite sur un perméat de lactosérum, en couplage avec la précipitation au sulfate d'ammonium, a permis la production d'une fraction purifiée de nisine.

Ces études ont aussi permis de dégager différentes perspectives. La séparation de la nisine à l'aide de l'ED permet d'envisager sa production par un procédé plus respectueux de l'environnement. L'utilisation de l'ED couplée avec la précipitation au sulfate d'ammonium permet d'envisager la production de la nisine dans une démarche écocirculaire, où l'ED permettrait en plus de la purification de la nisine de retraiter et

recycler les sels de sulfate d'ammonium employé dans la prépurification de la nisine. Nos résultats ont aussi démontré que l'UF peut s'intégrer efficacement dans un schéma de purification de la nisine en impliquant moins d'étapes que les méthodes conventionnelles. Néanmoins, la maîtrise des conditions de prépurification en amont de l'ultrafiltration est nécessaire pour assurer un rendement global satisfaisant.

Bibliographie

- [1] J. Gustavsson, C. Cederberg, U. Sonesson, The methodology of the FAO study: "Global Food Losses and Food Waste - extent, causes and prevention," SIK. (2013).
- [2] N.H. Martin, P. Torres-Frenzel, M. Wiedmann, Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste, *J. Dairy Sci.* 104 (2021) 1251–1261. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19130>.
- [3] B.H. Lado, A.E. Yousef, Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms, *Microbes Infect.* 4 (2002) 433–440. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01557-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01557-5).
- [4] F. Devlieghere, L. Vermeiren, J. Debevere, New preservation technologies: Possibilities and limitations, *Int. Dairy J.* 14 (2004) 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.002>.
- [5] R. Paul Ross, S. Morgan, C. Hill, Preservation and fermentation: past, present and future, *Int. J. Food Microbiol.* 79 (2002) 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5).
- [6] V. Bali, P.S. Panesar, M.B. Bera, Trends in utilization of agro-industrial byproducts for production of bacteriocins and their biopreservative applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 36 (2016) 204–214. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.947916>.
- [7] M. Davidson, A. Branen, *Food Antimicrobials - An Introduction*, Taylor Francis Group. 3 (2005) 1–11.
- [8] D. Drider, S. Rebuffat, eds., *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, Springer New York, New York, NY, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5>.
- [9] M. Magana, M. Pushpanathan, A.L. Santos, L. Leanse, M. Fernandez, A. Ioannidis, M.A. Giulianotti, Y. Apidianakis, S. Bradfute, A.L. Ferguson, A. Cherkasov, M.N. Seleem, C. Pinilla, C. de la Fuente-Nunez, T. Lazaridis, T. Dai, R.A. Houghten, R.E.W. Hancock, G.P. Tegos, The value of antimicrobial peptides in the age of resistance, *Lancet Infect. Dis.* (2020) S1473309920303273. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30327-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30327-3).
- [10] A. Gharsallaoui, N. Oulahal, C. Joly, P. Degraeve, Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56 (2016) 1262–1274. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765>.
- [11] L.H. Deegan, P.D. Cotter, C. Hill, P. Ross, Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension, *Int. Dairy J.* 16 (2006) 1058–1071. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>.
- [12] D.E. Jones, D.V. Salin, D.G.W. Williams, Nisin market study phase I, (n.d.) 28.
- [13] A.F. Jozala, L.C. de L. Novaes, A. Pessoa, Nisin, in: V. Bobbarala (Ed.), *Concepts Compd. Altern. Antibact., InTech*, 2015. <https://doi.org/10.5772/60932>.
- [14] J. Nissen-Meyer, H. Holo, L.S. Håvarstein, K. Sletten, I.F. Nes, A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides., *J. Bacteriol.* 174 (1992) 5686–5692. <https://doi.org/10.1128/JB.174.17.5686-5692.1992>.
- [15] L. Saavedra, P. Castellano, F. Sesma, Purification of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria, in: *Public Health Microbiol.*, Humana Press, New Jersey, 2004: pp. 331–336. <https://doi.org/10.1385/1-59259-766-1:331>.
- [16] T.R. Klaenhammer, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 12 (1993) 39–85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>.
- [17] W. Liu, J.N. Hansen, Some Chemical and Physical Properties of Nisin, a Small-Protein Antibiotic Produced by *Lactococcus lactis*, *APPL Env. MICROBIOL.* 56 (1990) 8.

- [18] R. Jack, G. Bierbaum, C. Heidrich, H.-G. Sahl, The genetics of lantibiotic biosynthesis, *BioEssays*. 17 (1995) 793–802. <https://doi.org/10.1002/bies.950170909>.
- [19] G. Jung, H.-G. Sahl, Lantibiotics: a survey. In : Nisin and novel lantibiotics, Leiden Escom. (1991) 1–34.
- [20] M. Kleerebezem, Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis, *Peptides*. 25 (2004) 1405–1414. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.10.021>.
- [21] A. Guder, I. Wiedemann, H.-G. Sahl, Posttranslationally modified bacteriocins—the lantibiotics, *Biopolymers*. 55 (2000) 62–73. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<62::AID-BIP60>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<62::AID-BIP60>3.0.CO;2-Y).
- [22] O. McAuliffe, Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, *FEMS Microbiol. Rev.* (2001) 24.
- [23] I. Wiedemann, E. Breukink, C. van Kraaij, O.P. Kuipers, G. Bierbaum, B. de Kruijff, H.-G. Sahl, Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 1772–1779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006770200>.
- [24] Y. Cui, C. Zhang, Y. Wang, J. Shi, L. Zhang, Z. Ding, X. Qu, H. Cui, Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 16668–16707. <https://doi.org/10.3390/ijms131216668>.
- [25] I.F. Nes, H. Holo, Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria, *Biopolymers*. 55 (2000) 50–61. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<50::AID-BIP50>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<50::AID-BIP50>3.0.CO;2-3).
- [26] J. Cleveland, T.J. Montville, I.F. Nes, M.L. Chikindas, Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 71 (2001) 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8).
- [27] O. Koponen, Studies of producer self-protection and nisin biosynthesis of *Lactococcus lactis*, [Olli Koponen], 2004.
- [28] R. Parente, Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria, (1999) 52:628-638.
- [29] A. Hurst, Nisin, *Advances in applied microbiology*, 1981.
- [30] A. Prince, P. Sandhu, P. Ror, E. Dash, S. Sharma, M. Arakha, S. Jha, Y. Akhter, M. Saleem, Lipid-II Independent Antimicrobial Mechanism of Nisin Depends On Its Crowding And Degree Of Oligomerization, *Sci. Rep.* 6 (2016) 37908. <https://doi.org/10.1038/srep37908>.
- [31] D.P. Singh, V.K. Gupta, R. Prabha, *Microbial Interventions in Agriculture and Environment. Volume 1, Volume 1, 2019.* <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8391-5> (accessed February 12, 2020).
- [32] A.J.M. Driessen, R.N.H. Konings, W.N. Konings', Mechanistic Studies of Lantibiotic-Induced Permeabilization of Phospholipid Vesicles, *Biochemistry*. 34 (1995) 1606–1614.
- [33] D.C. Alvarez, V.H. Pérez, O.R. Justo, R.M. Alegre, Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using cheese whey permeate, *Process Biochem.* 41 (2006) 1967–1973. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.009>.
- [34] S.L. Morris, R.C. Walsh, J.N. HansenQ, Identification and Characterization of SomBe bacterial Membrane Sulfhydryl Groups Which Are Targets of Bacteriostatic and Antibiotic Action, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 13590–13594.
- [35] Z. Alkhatib, M. Lagedroste, I. Fey, D. Kleinschrodt, A. Abts, S.H.J. Smits, Lantibiotic Immunity: Inhibition of Nisin Mediated Pore Formation by NisI, *PLoS ONE*. 9 (2014) e102246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102246>.
- [36] J. Delves-Broughton, The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards Gram-negative bacteria, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 32 (1993) 87–97. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(93\)90042-Z](https://doi.org/10.1016/0964-8305(93)90042-Z).

- [37] A.C. Frazer, M. Sharratt, J.R. Hickman, The biological effects of food additives. I.—Nisin, *J. Sci. Food Agric.* 13 (1962) 32–42. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740130106>.
- [38] L.J. de Arauz, A.F. Jozala, P.G. Mazzola, T.C. Vessoni Penna, Nisin biotechnological production and application: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 20 (2009) 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.056>.
- [39] M.L. Cabo, M.A. Murado, P. Gonzalez, L. Pastoriza, Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model, *Enzyme Microb. Technol.* (2001) 10.
- [40] L. De Vuyst, F. Leroy, Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13 (2007) 194–199. <https://doi.org/10.1159/000104752>.
- [41] N.P. Guerra, M.L. Rua, L. Pastrana, Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey, *Int. J. Food Microbiol.* 70 (2001) 267–281. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00551-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00551-7).
- [42] F. Leroy, L. de Vuyst, Temperature and pH Conditions That Prevail during Fermentation of Sausages Are Optimal for Production of the Antilisterial Bacteriocin Sakacin K, *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 974–981. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.974-981.1999>.
- [43] V. Juturu, J.C. Wu, Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 2187–2200. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007>.
- [44] L.M.D. Gonçalves, A. Ramos, J.S. Almeida, A.M.R.B. Xavier, M.J.T. Carrondo, Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 (1997) 346–350. <https://doi.org/10.1007/s002530051060>.
- [45] M. Zamfir, R. Callewaert, P.C. Cornea, L. Vuyst, Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801, *FEMS Microbiol. Lett.* 190 (2000) 305–308. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09303.x>.
- [46] N.P. Guerra, Modeling the batch bacteriocin production system by lactic acid bacteria by using modified three-dimensional Lotka–Volterra equations, *Biochem. Eng. J.* 88 (2014) 115–130. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.04.010>.
- [47] R. Yang, M.C. Johnson, B. Ray, Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria, 58 (1992) 5.
- [48] N.P. Guerra, L. Pastrana, Nisin and pediocin production on mussel-processing waste supplemented with glucose and five nitrogen sources, *Lett. Appl. Microbiol.* 34 (2002) 114–118. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01054.x>.
- [49] E. Yang, L. Fan, J. Yan, Y. Jiang, C. Doucette, S. Fillmore, B. Walker, Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria, *AMB Express.* 8 (2018) 10. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>.
- [50] N. Bertrand, I. Fliss, C. Lacroix, High nisin-Z production during repeated-cycle batch cultures in supplemented whey permeate using immobilized *Lactococcus lactis* UL719, *Int. Dairy J.* 11 (2001) 953–960. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00129-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00129-7).
- [51] W. Liu, H. Zheng, Z. Wu, Y. Wang, Effects of pH profiles on nisin fermentation coupling with foam separation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 1401–1407. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2217-z>.
- [52] M. Mataragas, J. Metaxopoulos, E.H. Drosinos, Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages, *Bacteriocins Lact. Acid Bact.* (2002) 10.
- [53] L. De Vuyst, R. Callewaert, K. Crabbé, Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of

- bacteriocin production under unfavourable growth conditions, *Microbiology*. 142 (1996) 817–827. <https://doi.org/10.1099/00221287-142-4-817>.
- [54] A. Delgado, D. Brito, P. Fevereiro, R. Tenreiro, C. Peres, Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions, *J. Microbiol. Methods*. 62 (2005) 121–124. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.01.006>.
- [55] A. Hurtado, C. Reguant, A. Bordons, N. Rozès, Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress, *Food Microbiol.* 28 (2011) 1339–1344. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.004>.
- [56] R. Yang, B. Ray, Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria, *Food Microbiol.* 11 (1994) 281–291. <https://doi.org/10.1006/fmic.1994.1032>.
- [57] C.-I. Cheigh, H.-J. Choi, H. Park, S.-B. Kim, M.-C. Kook, T.-S. Kim, J.-K. Hwang, Y.-R. Pyun, Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi, *J. Biotechnol.* 95 (2002) 225–235. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00010-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00010-X).
- [58] L. Settanni, A. Corsetti, Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation, *Int. J. Food Microbiol.* 121 (2008) 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>.
- [59] M. Costas Malvido, E. Alonso González, N. Pérez Guerra, Nisin production in realkalized fed-batch cultures in whey with feeding with lactose- or glucose-containing substrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 7899–7908. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7558-9>.
- [60] M. Papagianni, N. Avramidis, G. Filiouis, Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1557–1563. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.035>.
- [61] S. Schirru, L. Favaro, N.P. Mangia, M. Basaglia, S. Casella, R. Comunian, F. Fancello, B.D.G. de Melo Franco, R.P. de Souza Oliveira, S.D. Todorov, Comparison of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium, *Ann. Microbiol.* 64 (2014) 321–331. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0667-0>.
- [62] T. Anthony, T. Rajesh, N. Kayalvizhi, P. Gunasekaran, Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 872–877. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.027>.
- [63] W.S. Kim, Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture, *Lett. Appl. Microbiol.* 25 (1997) 169–171. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00195.x>.
- [64] E. Parente, C. Hill, A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria, *J. Appl. Bacteriol.* 73 (1992) 290–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04980.x>.
- [65] J. Miao, M. Xu, H. Guo, L. He, X. Gao, C. DiMarco-Crook, H. Xiao, Y. Cao, Optimization of culture conditions for the production of antimicrobial substances by probiotic *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans* FX-6, *J. Funct. Foods*. 18 (2015) 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.011>.
- [66] C. Liu, Y. Liu, S. Chen, Effects of nutrient supplements on simultaneous fermentation of nisin and lactic acid from cull potatoes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121 (2005) 9.
- [67] L. De Vuyst, Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *actis* NIZO 22186 in a synthetic medium, *J. Appl. Bacteriol.* 78 (1995) 28–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb01669.x>.
- [68] M.J. López-González, S. Escobedo, A. Rodríguez, A.R. Neves, T. Janzen, B. Martínez, Adaptive Evolution of Industrial *Lactococcus lactis* Under Cell Envelope

- Stress Provides Phenotypic Diversity, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 2654. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02654>.
- [69] B. Özel, Ö. Şimşek, M. Akçelik, P.E.J. Saris, Innovative approaches to nisin production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 6299–6307. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9098-y>.
- [70] J.A. Vázquez, M.P. González, M.A. Murado, Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 605–613. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.020>.
- [71] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, I.M. Banat, Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production, *AMB Express.* 1 (2011) 5. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>.
- [72] F. Cladera-Olivera, G.R. Caron, A. Brandelli, Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology, *Biochem. Eng. J.* 21 (2004) 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.05.002>.
- [73] A.K. Garsa, R. Kumariya, S.K. Sood, A. Kumar, S. Kapila, Bacteriocin Production and Different Strategies for Their Recovery and Purification, *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 6 (2014) 47–58. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9153-z>.
- [74] A.S. Motta, A. Brandelli, Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2008) 641–646. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9520-6>.
- [75] M.P. Ryan, G. Walsh, The biotechnological potential of whey, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 15 (2016) 479–498. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>.
- [76] G. Ünlü, B. Nielsen, C. Ionita, Production of Antilisterial Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Dairy-Based Media: A Comparative Study, *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 7 (2015) 259–274. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9200-z>.
- [77] A.F. Jozala, M.S.D. Andrade, L.J.D. Arauz, A.P. Jr, T.C.V. Penna, Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136 (2007) 14.
- [78] M. Mirhosseini, G. Emtiazi, Optimisation of Enterocin A Production on a Whey-Based Substrate, (2011) 8.
- [79] P. Desjardins, J. Meghrous, C. Lacroix, Effect of aeration and dilution rate on nisin Z production during continuous fermentation with free and immobilized *Lactococcus lactis* UL719 in supplemented whey permeate, *Int. Dairy J.* 11 (2001) 943–951. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00128-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00128-5).
- [80] J.A. Vázquez, M.P. González, M.A. Murado, Pediocin production by *Pediococcus acidilactici* in solid state culture on a waste medium: Process simulation and experimental results: Solid State Production of *Pediococcus*, *Biotechnol. Bioeng.* 85 (2004) 676–682. <https://doi.org/10.1002/bit.20018>.
- [81] Â.M. Fiorentini, E.S. Sant'Anna, A.C.S. Porto, J.Z. Mazo, B.D.G.M. Franco, Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat, *Braz. J. Microbiol.* 32 (2001) 42–46. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100010>.
- [82] S.D. Todorov, Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp., *Braz. J. Microbiol.* 39 (2008) 178–187. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100035>.
- [83] H. Bing, Y. Zhanqiao, L. Baosheng, M. Qingshan, Z. Rijun, Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens, *Afr. J. Microbiol. Res.* 5 (2011) 1147–1155. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.643>.
- [84] D. Mitra, A.L. Pometto, S.K. Khanal, B. Karki, B.F. Brehm-Stecher, J. van Leeuwen, Value-Added Production of Nisin from Soy Whey, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 1819–1833. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8951-y>.
- [85] Q. Cheng, X. Shi, Y. Liu, X. Liu, S. Dou, C. Ning, Z. qi Liu, S. Sun, X. Chen, X. Ren, Production of nisin and lactic acid from corn stover through simultaneous

- saccharification and fermentation, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 32 (2018) 420–426. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1420425>.
- [86] X. Zhu, Optimization of Nutritional Factors for Nisin yield Improvement by *Lactococcus lactis* E15 using Corn Steep Liquor Powder as Nitrogen Source, *Adv. Biotechnol. Microbiol.* 2 (2017). <https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.02.555585>.
- [87] M.C. Malvido, E.A. González, D.L. Bazán Tantaleán, R.J. Bendaña Jácome, N.P. Guerra, Batch and fed-batch production of probiotic biomass and nisin in nutrient-supplemented whey media, *Braz. J. Microbiol.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00114-1>.
- [88] N.P. Guerra, L. Pastrana, Enhanced nisin and pediocin production on whey supplemented with different nitrogen sources, (2001) 4.
- [89] M.N. Amiali, C. Lacroix, R.E. Simard, High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration, 14 (1998) 8.
- [90] F. Goulhen, J. Meghrous, C. Lacroix, Production of a nisin Z/pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeate, *J. Appl. Microbiol.* 86 (1999) 399–406. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00675.x>.
- [91] M. Ariana, J. Hamedi, Enhanced production of nisin by co-culture of *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis* and *Yarrowia lipolytica* in molasses based medium, *J. Biotechnol.* 256 (2017) 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.009>.
- [92] M.J. Coventry, J.B. Gordon, M. Alexander, M.W. Hickey, J. Wan, A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1764–1769. <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1764-1769.1996>.
- [93] C.-I. Cheigh, M.-C. Kook, S.-B. Kim, Y.-H. Hong, Y.-R. Pyun, Simple one-step purification of nisin Z from unclarified culture broth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 using expanded bed ion exchange chromatography, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 1341–1345. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000045630.29494.45>.
- [94] A.M. Suárez, J.I. Azcona, J.M. Rodríguez, B. Sanz, P.E. Hernández, One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 4990–4992. <https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4990-4992.1997>.
- [95] N.J. Stern, E.A. Svetoch, B.V. Eruslanov, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, V.D. Pokhilenko, V.P. Levchuk, O.E. Svetoch, B.S. Seal, Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and Purification of Its Bacteriocin, Which Is Inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the Chicken Gastrointestinal System, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 3111–3116. <https://doi.org/10.1128/AAC.00259-06>.
- [96] S.H. Tafreshi, S. Mirdamadi, S. Khatami, Comparison of Different Nisin Separation and Concentration Methods: Industrial and Cost-Effective Perspectives, *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 12 (2020) 1226–1234. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09607-9>.
- [97] H.-J. Choi, C.-I. Cheigh, S.-B. Kim, Y.-R. Pyun, Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi, *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 563–571. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00976.x>.
- [98] L.L. Burianek, A.E. Yousef, Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures, *Lett. Appl. Microbiol.* 31 (2000) 193–197. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00802.x>.
- [99] S.S. Gujarathi, S.B. Bankar, L.A. Ananthanarayan, Fermentative Production, Purification and Characterization of Nisin, *Int. J. Food Eng.* 4 (2008). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1386>.
- [100] K.-H. Lee, G.-S. Moon, J.-Y. An, H.-J. Lee, H.-C. Chang, D.-K. Chung, J.-H. Lee, Isolation of a Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strain from Kimchi and Characterization of its nisZ Gene, *J. Microbiol. Biotechnol.* 12 (2002) 389–397.
- [101] Vishakha Sharma, Rahul C Ranveer, Neelam Jain, Gajender Kumar Aseri, Bacteriocins: Production, different strategies of purification and applications, *Int.*

- J. Res. Pharm. Sci. 10 (2019) 1808–1817. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v10i3.1376>.
- [102] Y. Wang, F. Nan, H. Zheng, Z. Wu, Effects of temperature and trehalose on foam separation of nisin from the culture broth produced by *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* W28, *J. Dairy Sci.* 95 (2012) 5588–5596. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5709>.
- [103] T.M. Taylor, P.M. Davidson, Q. Zhong, Extraction of Nisin from a 2.5% Commercial Nisin Product Using Methanol and Ethanol Solutions, *J. Food Prot.* 70 (2007) 1272–1276. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.5.1272>.
- [104] E.P. Campbell, D.R. Kasler, A.E. Yousef, Maximizing Recovery of Paenibacillin, a Bacterially Produced Lantibiotic, Using Continuous Foam Separation from Bioreactors, *Foods.* 11 (2022) 2290. <https://doi.org/10.3390/foods11152290>.
- [105] R.C.R. Martinez, V.O. Alvarenga, M. Thomazini, C.S. Fávaro-Trindade, A. de S. Sant’Ana, Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk, *LWT - Food Sci. Technol.* 68 (2016) 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.027>.
- [106] G. Prioult, C. Turcotte, L. Labarre, C. Lacroix, I. Fliss, Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads, (2000).
- [107] M.N. Drager, H.A. Chase, Liquid fluidized beds for protein purification, (1990) 118: 12.1–12.12.
- [108] R. Callewaert, L. De Vuyst, Expanded bed adsorption as a unique unit operation for the isolation of bacteriocins from fermentation media, in: B. Mattiasson (Ed.), *Expand. Bed Chromatogr.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1999: pp. 159–168. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1519-5_18.
- [109] M.R.F. Moreno, R. Callewaert, L.D. Vuyst, Isolation of bacteriocins through expanded bed adsorption using a hydrophobic interaction medium, (2001) 45–50.
- [110] E.V. Pingitore, E. Salvucci, F. Sesma, M.E. Nader-Macías, Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB), . . M. (2007) 13.
- [111] M. Uteng, H.H. Hauge, I. Brondz, J. Nissen-Meyer, G. Fimland, Rapid Two-Step Procedure for Large-Scale Purification of Pediocin-Like Bacteriocins and Other Cationic Antimicrobial Peptides from Complex Culture Medium, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 952–956. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.952-956.2002>.
- [112] H. Dündar, Ö. ÇeliKbiçak, B. SaliH, T.F. Bozoğlu, Large-scale purification of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* using diatomite calcium silicate, *Turk. J. Biol.* 38 (2014) 611–618. <https://doi.org/10.3906/biy-1312-52>.
- [113] D. Guyonnet, C. Fremaux, Y. Cenatiempo, J.M. Berjeaud, Method for Rapid Purification of Class IIa Bacteriocins and Comparison of Their Activities, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 1744–1748. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1744-1748.2000>.
- [114] N.L. Rose, P. Sporns, L.M. McMullen, Production of Antibodies against Enterocin B for Immunological Detection and Purification Purposes, *Food Agric. Immunol.* 13 (2001) 225–239. <https://doi.org/10.1080/09540100120094492>.
- [115] J. Gutiérrez, R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M.F. Fernández, L.M. Cintas, P.E. Hernández, Performance and Applications of Polyclonal Antipeptide Antibodies Specific for the Enterococcal Bacteriocin Enterocin P, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2247–2255. <https://doi.org/10.1021/jf030551j>.
- [116] P. Wannun, S. Piwat, R. Teanpaisan, Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1, *Anaerobe.* 27 (2014) 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.03.001>.
- [117] N. Xiraphi, M. Georgalaki, G.V. Driessche, B. Devreese, J.V. Beeumen, E. Tsakalidou, J. Metaxopoulos, E.H. Drosinos, Purification and characterization of

- curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 89 (2006) 19–26. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9004-3>.
- [118] N. Sharma, R. Kapoor, N. Gautam, R. Kumari, Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Bacillus subtilis* R75 Isolated from Fermented Chunks of Mung Bean (*Phaseolus radiatus*), *Food Technol Biotechnol*. 2 (2011) 169–176.
- [119] V. Kumar, S.K. Tiwari, Halocin HA1: An archaeocin produced by the haloarchaeon *Haloferax larsenii* HA1, *Process Biochem*. 61 (2017) 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.010>.
- [120] A. Forestier, Y. Belguesmia, F. Krier, D. Drider, P. Dhulster, L. Firdaous, Recovery of nisin from culture supernatants of *Lactococcus lactis* by ultrafiltration: Flux properties and separation efficiency, *Food Bioprod. Process*. 136 (2022) 196–210. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.10.002>.
- [121] A.M. Suárez, J.I. Azcona, J.M. Rodríguez, B. Sanz, P.E. Hernández, One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography., *Appl. Environ. Microbiol*. 63 (1997) 4990–4992. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.12.4990-4992.1997>.
- [122] D. Xiao, P. Michael Davidson, D.H. D'Souza, J. Lin, Q. Zhong, Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2.5% preparation, *J. Food Eng*. 100 (2010) 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.044>.
- [123] P. García, L. Rodríguez, A. Rodríguez, B. Martínez, Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins, *Trends Food Sci. Technol*. 21 (2010) 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.010>.
- [124] V.A. Stergiou, L.V. Thomas, M.R. Adams, Interactions of Nisin with Glutathione in a Model Protein System and Meat, *J. Food Prot*. 69 (2006) 951–956. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.4.951>.
- [125] P. Pathanibul, T.M. Taylor, P.M. Davidson, F. Harte, Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin, *Int. J. Food Microbiol*. 129 (2009) 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.020>.
- [126] W. Xu, W. Qu, K. Huang, F. Guo, J. Yang, H. Zhao, Y. Luo, Antibacterial effect of Grapefruit Seed Extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables, *Postharvest Biol. Technol*. 45 (2007) 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.11.019>.
- [127] M.A. Daeschel, D.-S. Jung, B.T. Watson, Controlling Wine Malolactic Fermentation with Nisin and Nisin-Resistant Strains of *Leuconostoc oenos*, *Appl. Environ. Microbiol*. 57 (1991) 601–603. <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.601-603.1991>.
- [128] A. Gálvez, H. Abriouel, R.L. López, N.B. Omar, Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *Int. J. Food Microbiol*. 120 (2007) 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>.
- [129] D.C. Laranja, P. da S. Malheiros, E.C. Tondo, Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in sliced cooked ham, *J. Food Process. Preserv*. 43 (2019). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14132>.
- [130] J.M. Shin, J.W. Gwak, P. Kamarajan, J.C. Fenno, A.H. Rickard, Y.L. Kapila, Biomedical applications of nisin, *J. Appl. Microbiol*. 120 (2016) 1449–1465. <https://doi.org/10.1111/jam.13033>.
- [131] S. Soltani, R. Hammami, P.D. Cotter, S. Rebuffat, L.B. Said, H. Gaudreau, F. Bédard, E. Biron, D. Drider, I. Fliss, Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations, *FEMS Microbiol. Rev*. 45 (2021) fuaa039. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>.
- [132] C. Valenta, A. Bernkop-Schnürch, H.P. Rigler, The Antistaphylococcal Effect of Nisin in a Suitable Vehicle: A Potential Therapy for Atopic Dermatitis in Man, *J. Pharm. Pharmacol*. 48 (2011) 988–991. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1996.tb06019.x>.

- [133] L.T. Cao, J.Q. Wu, F. Xie, S.H. Hu, Y. Mo, Efficacy of Nisin in Treatment of Clinical Mastitis in Lactating Dairy Cows, *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 3980–3985. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0153>.
- [134] C.L. Lay, L. Dridi, M.G. Bergeron, M. Ouellette, I. Fliss, Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination, *J. Med. Microbiol.* 65 (2016) 169–175. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000202>.
- [135] G.L. Blay, C. Lacroix, A. Zihler, I. Fliss, In vitro inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics against common intestinal bacteria, *Lett. Appl. Microbiol.* 45 (2007) 252–257. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02178.x>.
- [136] R. Castro-Muñoz, G. Boczkaj, E. Gontarek, A. Cassano, V. Fila, Membrane technologies assisting plant-based and agro-food by-products processing: A comprehensive review, *Trends Food Sci. Technol.* 95 (2020) 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.003>.
- [137] Z. Cui, Protein separation using ultrafiltration — an example of multi-scale complex systems, *China Particuology.* 3 (2005) 343–348. [https://doi.org/10.1016/S1672-2515\(07\)60213-9](https://doi.org/10.1016/S1672-2515(07)60213-9).
- [138] M.-P. Zacharof, Separation of lactobacilli bacteriocins from fermented broths using membranes, (2013) 10.
- [139] S. Ohmomo, S. Murata, N. Katayama, S. Nitisinprasart, M. Kobayashi, T. Nakajima, M. Yajima, K. Nakanishi, Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157: S. OHMOMO ET AL., *J. Appl. Microbiol.* 88 (2001) 81–89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00866.x>.
- [140] M. Fidaleo, M. Moresi, Electrodialysis Applications in The Food Industry, in: *Adv. Food Nutr. Res.*, Elsevier, 2006: pp. 265–360. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)51005-8](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)51005-8).
- [141] H. Strathmann, Electrodialysis, a mature technology with a multitude of new applications, *Desalination.* 264 (2010) 268–288. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.04.069>.
- [142] L. Bazinet, D. Ippersiel, F. Lamarche, Recovery of magnesium and protein from soy tofu whey by electrodialytic configurations, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 663–668. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199907\)74:7<663::AID-JCTB97>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199907)74:7<663::AID-JCTB97>3.0.CO;2-I).
- [143] P. Luis, Introduction, in: *Fundam. Model. Membr. Syst.*, Elsevier, 2018: pp. 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813483-2.00001-0>.
- [144] L. Bazinet, A. Doyen, C. Roblet, 7 - Electrodialytic phenomena, associated electromembrane technologies and applications in the food, beverage and nutraceutical industries, in: S.S.H. Rizvi (Ed.), *Sep. Extr. Conc. Process. Food Beverage Nutraceutical Ind.*, Woodhead Publishing, 2013: pp. 202–218. <https://doi.org/10.1533/9780857090751.1.202>.
- [145] J. Meghrou, C. Lacroix, M. Bouksaïm, G. LaPointe, R.E. Simard, **Note** : Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719, *J. Appl. Microbiol.* 83 (1997) 133–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00160.x>.
- [146] R. Gough, B. Gómez-Sala, P.M. O'Connor, M.C. Rea, S. Miao, C. Hill, A. Brodkorb, A Simple Method for the Purification of Nisin, *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 9 (2017) 363–369. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9287-5>.
- [147] D.A. Cowan, J.H. Brown, Effect of Turbulence on Limiting Current in Electrodialysis Cells, *Ind. Eng. Chem.* 51 (1959) 1445–1448. <https://doi.org/10.1021/ie50600a026>.
- [148] W. Villeneuve, V. Perreault, P. Chevallier, S. Mikhaylin, L. Bazinet, Use of cation-coated filtration membranes for demineralization by electrodialysis, *Sep. Purif. Technol.* 218 (2019) 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.02.032>.
- [149] M. Doria, A. Ferrara, A. Auricchio, AAV2/8 Vectors Purified from Culture Medium with a Simple and Rapid Protocol Transduce Murine Liver, Muscle, and Retina

- Efficiently, *Hum. Gene Ther. Methods.* 24 (2013) 392–398. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2013.155>.
- [150] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- [151] L. Lebrun, E. Da Silva, G. Pourcelly, M. Métayer, Elaboration and characterisation of ion-exchange films used in the fabrication of bipolar membranes, *J. Membr. Sci.* 227 (2003) 95–111. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2003.07.022>.
- [152] R. Lteif, L. Dammak, C. Larchet, B. Auclair, Conductivité électrique membranaire: étude de l'effet de la concentration, de la nature de l'électrolyte et de la structure membranaire, *Eur. Polym. J.* (1999) 9.
- [153] C. Conidi, A. Cassano, F. Caiazza, E. Drioli, Separation and purification of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes, *J. Food Eng.* 195 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.09.017>.
- [154] E.M. Romero-Dondiz, J.E. Almazán, V.B. Rajal, E.F. Castro-Vidaurre, Removal of vegetable tannins to recover water in the leather industry by ultrafiltration polymeric membranes, *Chem. Eng. Res. Des.* 93 (2015) 727–735. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.06.022>.
- [155] A. Delgado, F.N. Arroyo López, D. Brito, C. Peres, P. Fevereiro, A. Garrido-Fernández, Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics, *J. Biotechnol.* 130 (2007) 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.041>.
- [156] T.C.V. Penna, D.A. Moraes, Optimization of Nisin Production by *Lactococcus lactis*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2002).
- [157] N.P. Guerra, L.P. Castro, Enhancement of nisin production by *Lactococcus lactis* in periodically re-alkalized cultures, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38 (2003) 157–167. <https://doi.org/10.1042/BA20030059>.
- [158] M.C. Malvido, E.A. González, R.J.B. Jácome, N. Pérez Guerra, The Joint Effect of pH Gradient and Glucose Feeding on the Growth Kinetics of *Lactococcus lactis* CECT 539 in Glucose-Limited Fed-Batch Cultures, *Pol. J. Microbiol.* 68 (2019) 269–280. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-030>.
- [159] L. De Vuyst, E.J. Vandamme, Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations, *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992) 571–578. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-3-571>.
- [160] W. Lv, W. Cong, Z. Cai, Effect of sucrose on nisin production in batch and fed-batch culture by *Lactococcus lactis*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 511–514. <https://doi.org/10.1002/jctb.1230>.
- [161] E.W.J. van Niel, B. Hahn-Hägerdal, Nutrient requirements of lactococci in defined growth media, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (1999) 617–627. <https://doi.org/10.1007/s002530051569>.
- [162] S. Khelissa, N.-E. Chihib, A. Gharsallaoui, Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative, *Arch. Microbiol.* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02054-z>.
- [163] N.P. Guerra, L. Pastrana, Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*, *Lett. Appl. Microbiol.* 37 (2003) 51–55. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01346.x>.
- [164] P. Sahu, A comprehensive review of saline effluent disposal and treatment: conventional practices, emerging technologies, and future potential, *J. Water Reuse Desalination.* 11 (2021) 33–65. <https://doi.org/10.2166/wrd.2020.065>.
- [165] L. Bazinet, L. Firdaous, Membrane Processes and Devices for Separation of Bioactive Peptides, *Recent Pat. Biotechnol.* 3 (2009) 61–72. <https://doi.org/10.2174/187220809787172623>.

- [166] S. Al-Amshawee, M.Y.B.M. Yunus, A.A.M. Azoddein, D.G. Hassell, I.H. Dakhil, H.A. Hasan, Electrodialysis desalination for water and wastewater: A review, *Chem. Eng. J.* 380 (2020) 122231. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122231>.
- [167] A. Cournoyer, L. Bazinet, Electrodialysis Processes an Answer to Industrial Sustainability: Toward the Concept of Eco-Circular Economy? —A Review, (2023).
- [168] S. Mikhaylin, L. Bazinet, Fouling on ion-exchange membranes: Classification, characterization and strategies of prevention and control, *Adv. Colloid Interface Sci.* 229 (2016) 34–56. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.12.006>.
- [169] A. Chaabouni, F. Guesmi, I. Louati, C. Hannachi, B. Hamrouni, Temperature effect on ion exchange equilibrium between CMX membrane and electrolytes solutions, *J. Water Reuse Desalination.* 5 (2015) 535–541. <https://doi.org/10.2166/wrd.2015.008>.
- [170] R. McNair, G. Szekely, R.A.W. Dryfe, Ion-Exchange Materials for Membrane Capacitive Deionization, *ACS EST Water.* 1 (2021) 217–239. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.0c00123>.
- [171] E. Khetsomphou, F. Deboli, M.L. Donten, L. Bazinet, Impact of Hierarchical Cation-Exchange Membranes' Chemistry and Crosslinking Level on Electrodialysis Demineralization Performances of a Complex Food Solution, *Membranes.* 13 (2023) 107. <https://doi.org/10.3390/membranes13010107>.
- [172] J.-H. Choi, H.-J. Lee, S.-H. Moon, Effects of Electrolytes on the Transport Phenomena in a Cation-Exchange Membrane, *J. Colloid Interface Sci.* 238 (2001) 188–195. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7510>.
- [173] J.J. Krol, M. Wessling, H. Strathmann, Concentration polarization with monopolar ion exchange membranes: current±voltage curves and water dissociation, *J. Membr. Sci.* (1999) 10.
- [174] J.-S. Park, J.-H. Choi, K.-H. Yeon, S.-H. Moon, An approach to fouling characterization of an ion-exchange membrane using current–voltage relation and electrical impedance spectroscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 294 (2006) 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.07.016>.
- [175] W.M.D. Vos, J. Hugenholtz, O.P. Kuipers[†], Properties of Nisin Z and Distribution of Its Gene, nisZ, in *Lactococcus lactis*, *APPL Env. MICROBIOL.* 59 (1993) 6.
- [176] K. Siegers, S. Heinzmann, K.-D. Entian, Biosynthesis of Lantibiotic Nisin: Postrantional modification of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12294–12301. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12294>.
- [177] M. Persico, S. Mikhaylin, A. Doyen, L. Firdaous, R. Hammami, M. Chevalier, C. Flahaut, P. Dhulster, L. Bazinet, Formation of peptide layers and adsorption mechanisms on a negatively charged cation-exchange membrane, *J. Colloid Interface Sci.* 508 (2017) 488–499. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.08.029>.
- [178] M.-E. Langevin, L. Bazinet, Ion-exchange membrane fouling by peptides: A phenomenon governed by electrostatic interactions, *J. Membr. Sci.* 369 (2011) 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.12.031>.
- [179] M. Persico, L. Bazinet, Fouling prevention of peptides from a tryptic whey hydrolysate during electromembrane processes by use of monovalent ion permselective membranes, *J. Membr. Sci.* 549 (2018) 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.12.021>.
- [180] N.D. Pismenskaya, E.I. Belova, V.V. Nikonenko, C. Larchet, Electrical conductivity of cation-and anion-exchange membranes in ampholyte solutions, *Russ. J. Electrochem.* 44 (2008) 1285–1291. <https://doi.org/10.1134/S1023193508110141>.
- [181] T.V. Eliseeva, V.A. Shaposhnik, Effects of circulation and facilitated electromigration of amino acids in electrodialysis with ion-exchange membranes, *Russ. J. Electrochem.* 36 (2000) 64–67. <https://doi.org/10.1007/BF02757798>.

- [182] M. Persico, G. Daigle, S. Kadel, V. Perreault, G. Pellerin, J. Thibodeau, L. Bazinet, Predictive models for determination of peptide fouling based on the physicochemical characteristics of filtration membranes, *Sep. Purif. Technol.* 240 (2020) 116602. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116602>.
- [183] L. De Vuyst, E.J. Vandamme, Nisin, A Lantibiotic Produced by *Lactococcus Lactis* Subsp. *Lactis*: Properties, Biosynthesis, Fermentation and Applications, in: L. De Vuyst, E.J. Vandamme (Eds.), *Bacteriocins Lact. Acid Bact.*, Springer US, Boston, MA, 1994: pp. 151–221. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2668-1_5.
- [184] Y. Tanaka, Water dissociation reaction generated in an ion exchange membrane, *J. Membr. Sci.* 350 (2010) 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.01.010>.
- [185] P. Długołęcki, P. Ogonowski, S.J. Metz, M. Saakes, K. Nijmeijer, M. Wessling, On the resistances of membrane, diffusion boundary layer and double layer in ion exchange membrane transport, *J. Membr. Sci.* 349 (2010) 369–379. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.11.069>.
- [186] N.W. Rosenberg, C.E. Tirrell, Limiting Currents in Membrane Cells, *Ind. Eng. Chem.* 49 (1957) 780–784. <https://doi.org/10.1021/ie50568a047>.
- [187] V.V. Nikonenko, A.V. Kovalenko, M.K. Urtenov, N.D. Pismenskaya, J. Han, P. Sistat, G. Pourcelly, Desalination at overlimiting currents: State-of-the-art and perspectives, *Desalination.* 342 (2014) 85–106. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.01.008>.
- [188] Y.-C. Tai, J. McGuire, J.A. Neff, Nisin antimicrobial activity and structural characteristics at hydrophobic surfaces coated with the PEO–PPO–PEO triblock surfactant Pluronic® F108, *J. Colloid Interface Sci.* 322 (2008) 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.02.062>.
- [189] M. Persico, S. Mikhaylin, A. Doyen, L. Firdaous, V. Nikonenko, N. Pismenskaya, L. Bazinet, Prevention of peptide fouling on ion-exchange membranes during electrodialysis in overlimiting conditions, *J. Membr. Sci.* 543 (2017) 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.08.039>.
- [190] B.K. Pramanik, L. Shu, V. Jegatheesan, A review of the management and treatment of brine solutions, *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 3 (2017) 625–658. <https://doi.org/10.1039/C6EW00339G>.
- [191] J. Shi, L. Gong, T. Zhang, S. Sun, Study of the Seawater Desalination Performance by Electrodialysis, *Membranes.* 12 (2022) 767. <https://doi.org/10.3390/membranes12080767>.
- [192] S.K. Patel, M. Qin, W.S. Walker, M. Elimelech, Energy Efficiency of Electro-Driven Brackish Water Desalination: Electrodialysis Significantly Outperforms Membrane Capacitive Deionization, *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020) 3663–3677. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07482>.
- [193] P.M. Doran, Unit Operations, in: *Bioprocess Eng. Princ.*, Elsevier, 2013: pp. 445–595. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00011-3>.
- [194] M. Dixon, E.C. Webb, Enzyme Fractionation By Salting-Out: A Theoretical Note, in: *Adv. Protein Chem.*, Elsevier, 1962: pp. 197–219. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60030-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60030-3).
- [195] F.W.F. Wong, A.B. Ariff, D.C. Stuckey, Downstream protein separation by surfactant precipitation: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.* 38 (2018) 31–46. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1312266>.
- [196] L. Bazinet, T.R. Geoffroy, Electrodialytic Processes: Market Overview, Membrane Phenomena, Recent Developments and Sustainable Strategies, *Membranes.* 10 (2020) 221. <https://doi.org/10.3390/membranes10090221>.
- [197] S. Mikhaylin, L. Patouillard, M. Margni, L. Bazinet, Milk protein production by a more environmentally sustainable process: bipolar membrane electrodialysis coupled with ultrafiltration, *Green Chem.* 20 (2018) 449–456. <https://doi.org/10.1039/C7GC02154B>.

- [198] G.W. Smithers, Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow, *Int. Dairy J.* 48 (2015) 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.011>.
- [199] N. Jamaluddin, D.C. Stuckey, A.B. Ariff, F.W. Faizal Wong, Novel approaches to purifying bacteriocin: A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58 (2018) 2453–2465. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1328658>.
- [200] R.R. Burgess, Chapter 20 Protein Precipitation Techniques, in: *Methods Enzymol.*, Elsevier, 2009: pp. 331–342. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63020-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63020-2).
- [201] M. Amara, H. Kerdjoudj, Modified cation exchange resin applied to demineralisation of a liquid industrial waste. Comparison to a classical treatment and electro dialysis, *Hydrometallurgy.* 65 (2002) 59–68. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(02\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(02)00065-8).
- [202] S. Gurumayum, S.S. Senapati, P. Rasane, K. Dhawan, S. Kaur, J. Singh, D. Kaur, Bacteriocins: Biosynthesis, Production, Purification, and Its Potential Applications in Food and Human Health, in: D.K. Verma, A.R. Patel, K.S. Sandhu, A. Baldi, S. Garcia (Eds.), *Biotech. Process. Food Ind.*, 1st ed., Apple Academic Press, Includes bibliographical references and index., 2021: pp. 237–268. <https://doi.org/10.1201/9781003057543-11>.
- [203] X. Chen, G.Q. Chen, Q. Wang, T. Xu, S.E. Kentish, Transforming salty whey into cleaning chemicals using electro dialysis with bipolar membranes, *Desalination.* 492 (2020) 114598. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2020.114598>.
- [204] N. Krishnakumar, M. Yea, M. Cheryan, Ultrafiltration of soy protein concentrate: performance and modelling of spiral and tubular polymeric modules, *J. Membr. Sci.* 244 (2004) 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.06.056>.
- [205] Y. Sun, Z. Qin, L. Zhao, Q. Chen, Q. Hou, H. Lin, L. Jiang, J. Liu, Z. Du, Membrane fouling mechanisms and permeate flux decline model in soy sauce microfiltration, *J. Food Process Eng.* 41 (2018) e12599. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12599>.
- [206] P. Bacchin, P. Aimar, R. Field, Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications, *J. Membr. Sci.* 281 (2006) 42–69. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.04.014>.
- [207] H.-L. Chen, Y.-S. Chen, R.-S. Juang, Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process, *Sep. Purif. Technol.* 59 (2008) 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.06.010>.
- [208] A. Aouni, C. Fersi, B. Cuartas-Urbe, A. Bes-Piá, M.I. Alcaina-Miranda, M. Dhahbi, Study of membrane fouling using synthetic model solutions in UF and NF processes, *Chem. Eng. J.* 175 (2011) 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.09.093>.
- [209] X. Zhao, R. Zhang, Y. Liu, M. He, Y. Su, C. Gao, Z. Jiang, Antifouling membrane surface construction: Chemistry plays a critical role, *J. Membr. Sci.* 551 (2018) 145–171. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2018.01.039>.
- [210] A. Tryfon, P. Siafarika, C. Kouderis, S. Kaziannis, S. Boghosian, A.G. Kalampounias, Evidence of Self-Association and Conformational Change in Nisin Antimicrobial Polypeptide Solutions: A Combined Raman and Ultrasonic Relaxation Spectroscopic and Theoretical Study, *Antibiotics.* 12 (2023) 221. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020221>.

Résumé

Mise en œuvre de procédés membranaires pour la séparation sélective de la nisine à partir de surnageants de cultures complexes

La recherche d'alternatives aux conservateurs chimiques et aux antibiotiques représente un domaine d'étude de plus en plus important. Une des alternatives les plus étudiée est la nisine, une bactériocine reconnue en tant que conservateur naturelle dans l'industrie alimentaire. Cependant son utilisation reste limitée du fait de problème lié à sa production et sa purification. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'emploi de rejets de l'industrie alimentaire (résidus végétaux et de poissons) comme milieu de culture moins coûteux pour les bactéries lactiques et produire la nisine. Pour la purification de la nisine, des procédés membranaires, l'ultrafiltration (UF) et l'électrodialyse (ED), ont été étudiées et ont montré leur efficacité pour la purification de la nisine à partir de surnageants complexes et ce dans une perspective éco-circulaire, en retraitant les polluants salins issus de la purification de la nisine par ED.

Mots-clefs : Électrodialyse, Ultrafiltration, mécanisme de colmatage, procédé écocirculaire

Abstract

Membranes process applications for nisin purification from complex culture supernatants

Search for alternatives to chemical preservatives and antibiotics represent a topic of great interest. One of the most studied alternatives is the use of nisin, a bacteriocin recognized as a natural preservative in the food industry. However, its use is limited due to problem regarding its production and purification. In this study we investigated the use of food industry by-products (from vegetal and fish) as cheaper fermentation broth for nisin production. For the purification of nisin we tested membrane process such as ultrafiltration (UF) and electrodialysis (ED) and showed their efficacy for nisin purification from a complex supernatant. Moreover, the use of ED was shown to be efficient and could be implemented in an eco-circular economy scheme by using ED for recycling salty pollutant produced during nisin purification.

Key words: Electrodialyse, Ultrafiltration, fouling mechanism, ecocircular process