

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 506 325

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 81 09950

(54) Procédé pour extraire la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase d'une matière végétale.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). C 12 N 9/88; A 23 K 1/165; A 23 L 1/30;
A 24 B 15/24.

(22) Date de dépôt 19 mai 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 47 du 26-11-1982.

(71) Déposant : Société dite : LEAF PROTEINS, INC., résidant aux EUA.

(72) Invention de : Samuel G. Wildman et Prachuab Kwanyuen.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Rinuy, Santarelli,
14, av. de la Grande-Armée, 75017 Paris.

La présente invention concerne dans son ensemble un procédé pour isoler des protéines des feuilles de plantes. Selon un autre de ses aspects, elle a trait à un procédé permettant de tirer la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase des feuilles vertes de plantes. Selon un autre aspect plus particulier, l'invention concerne un procédé pour extraire la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase des feuilles de tabac.

Les feuilles succulentes de certaines plantes, telles que tabac, épinard, soja, blé, cotonnier et luzerne, sont composées de 10 à 20 % de matières solides, le reste étant de l'eau. Pour sa part, la portion solide comprend une portion hydrosoluble et une portion insoluble dans l'eau, cette dernière étant formée, pour l'essentiel, de la matière structurale fibreuse de la feuille.

Les composés hydrosolubles peuvent être divisés en deux groupes. L'un d'eux comprend des composés de poids moléculaire relativement faible tels que des sucres, des vitamines, des aminoacides et d'autres composés dont le poids moléculaire ne dépasse pas environ 10 000. Le second est presque exclusivement formé de protéines dont les poids moléculaires égalent ou dépassent environ 30 000.

Les protéines peuvent être divisées en deux fractions. L'une d'elles renferme un mélange de protéines dont les poids moléculaires s'échelonnent d'environ 30 000 à 100 000. Ces protéines sont parfois appelées "protéines de la fraction 2". La fraction restante comprend une seule protéine dont le poids moléculaire est égal à environ 550 000, et on l'appelle parfois "protéine de la fraction 1".

La protéine de la fraction 1 a été identifiée pour la première fois en 1947. Des recherches subséquentes ont permis de découvrir que cette protéine était un enzyme impliqué dans la photosynthèse. Depuis lors, plusieurs noms lui ont été attribués. Parmi ces noms, on mentionne les noms de ribulose 1,5-diphosphate carboxylase, carboxydismutase, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase et ribulose 1,5-di(ou bis)phosphate carboxylase-oxygénase.

La protéine de la fraction 1 peut représenter jusqu'à 25 % de la teneur totale en protéines d'une feuille

et jusqu'à 10 % de la matière solide contenue dans la feuille. On a découvert en 1970 que la protéine cristalline de la fraction 1 pouvait être tirée des feuilles du tabac.

A l'état pur, la protéine de la fraction 1 est une substance inodore, insipide et incolore qui a une grande valeur nutritionnelle. En raison de ces propriétés et du fait qu'on peut l'obtenir avec une grande pureté, la protéine de la fraction 1 est considérée comme ayant à l'état potentiel une application intéressante comme supplément nutritionnel pour les animaux et l'homme. Dans le cas des êtres humains, l'additif pourrait être un composant de régimes à forte teneur en protéines ou d'autres régimes spéciaux. Il a été suggéré par exemple comme supplément à l'alimentation de patients qui nécessitent une dialyse par suite de néphropathie.

Malgré son abondance relative dans les plantes cultivées, la protéine de la fraction 1 est un produit sans importance du point de vue commercial, attendu que les procédés connus permettant de l'extraire d'une matière végétale ne sont pas réalisables à l'échelle industrielle.

Trois procédés fondamentaux pour isoler la protéine de la fraction 1 ont été décrits dans la littérature publiée. Chaque procédé publié débute par la réduction en pulpe des feuilles, ou bien des feuilles et des tiges de la plante, suivie de l'expression d'un jus vert de la pulpe. Le jus vert, qui contient de fines particules d'une matière pigmentée en vert, est clarifié par exemple par filtration ou centrifugation pour séparer du liquide la matière solide en fines particules. Le liquide résultant a une couleur brune.

Le premier procédé décrit pour isoler la protéine de la fraction 1 impliquait la concentration de la protéine de la fraction 1 en même temps que sa séparation partielle des composés de bas poids moléculaire dans le jus brun, par filtration moléculaire. En utilisant un tamis moléculaire dont les pores laissent passer les petites molécules sans laisser passer les protéines de la fraction 1, on place le jus brun sous pression de manière que les petites molécules traversent les pores.

La solution contenant la protéine de la fraction 1 est concentrée au dixième de son volume environ puis elle est dialysée pour éliminer de petites molécules additionnelles contenues dans la solution. On effectue la dialyse 5 en utilisant un sac de dialyse du type en collodion. Les pores du sac ne doivent pas laisser passer la protéine de la fraction 1, mais ils doivent laisser s'échapper dans l'eau à travers le sac les molécules plus petites. Pendant la dialyse, des cristaux de protéine de la fraction 1 sont 10 formés.

Le deuxième procédé développé pour isoler la protéine de la fraction 1 impliquait le passage du jus brun obtenu à partir des feuilles sur une colonne chromatographique de "Sephadex". Le produit "Sephadex" consiste en 15 perles microscopiques, insolubles dans l'eau, d'un sucre polymérisé. On utilise un produit "Sephadex" G-25 ou G-50 pour effectuer la séparation. Le choix des perles convenables permet aux petites molécules de pénétrer à l'intérieur de leur structure à l'exclusion des grandes molécules. Par 20 conséquent, les grandes molécules ne se trouvent que dans le liquide situé dans les interstices entre les perles de "Sephadex" étroitement tassées. Cet espace interstitiel est appelé "volume des vides".

Pour effectuer une séparation efficace, le 25 volume du jus brun ne peut pas dépasser environ 25 % du volume total des perles. Les perles sont tout d'abord équilibrées avec un tampon et un volume de jus brun contenant le même tampon est ensuite déposé à la partie supérieure de la colonne "Sephadex".

30 Le liquide brun est élué de la colonne au moyen de la solution tampon. A mesure que le jus descend dans la colonne, le passage de petites molécules est retardé puisque ces molécules pénètrent à l'intérieur des perles. En revanche, les grandes molécules de la fraction 1 descendent 35 plus rapidement dans la colonne à travers le labyrinthe formé par les interstices entre les perles et sortent de la colonne sous la forme d'une solution brun clair. Toutefois, l'élution entraîne une dilution de la solution d'un facteur 2 au moins.

L'élimination des petites molécules modifie l'environnement autour des molécules de la protéine de la fraction 1, ce qui entraîne une cristallisation.

Le procédé décrit le plus récemment implique le
5 passage du jus brun sur une colonne de "Sephadex G-25" de la manière décrite ci-dessus. Si la protéine de la fraction 1 ne cristallise pas, comme c'est le cas de l'extrait de toutes les plantes excepté le tabac, du sulfate d'ammonium est ajouté jusqu'à ce que la solution soit saturée à 30-50 %.
10 Cela entraîne la précipitation d'une matière amorphe qui est recueillie par centrifugation. Après la séparation, le précipité est redissous dans un volume de tampon plus faible que celui dans lequel il avait été formé, auquel on ajoute 8 % de polyéthylèneglycol. On place ce mélange dans une
15 coupelle ouverte près d'une autre coupelle ouverte contenant du gel de silice et on enferme les deux coupelles dans un récipient clos. De l'eau est graduellement évaporée de la solution de protéine et absorbée par le gel de silice. A la longue, des cristaux de la protéine de la fraction 1 se
20 développent.

Il est évident pour l'homme de l'art que les procédés antérieurs décrits ci-dessus prennent du temps ou sont coûteux ou les deux à la fois. Cependant, la Demandereuse a fait connaître dans la demande de brevet des
25 Etats-Unis d'Amérique N° 78 505 déposée le 24 septembre 1979 un procédé simple pour isoler la protéine de la fraction 1, consistant à réduire les feuilles en une pulpe, à chauffer la portion liquide de la pulpe à une température inférieure à celle qui entraîne la dénaturation de la protéine, puis à
30 refroidir la portion liquide à une température à laquelle la protéine de la fraction 1, c'est-à-dire la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase, cristallise.

Depuis que la demande de brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 78 505 précitée a été déposée, la Demandereuse
35 a découvert un procédé encore plus simple et plus efficace pour isoler la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase des feuilles de plantes vertes. Elle a découvert en fait que l'opération de chauffage initialement considérée comme étant

une partie essentielle du procédé pouvait être supprimée dans la plupart des cas. Le procédé perfectionné de l'invention permet d'obtenir la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase sous une forme cristalline par ajustement du pH de la portion 5 liquide d'une pulpe formée à partir des feuilles à une valeur comprise dans une plage allant d'environ 6 à une valeur supérieure à celle à laquelle la protéine se dénature et précipite en une masse amorphe, c'est-à-dire une valeur supérieure au point isoélectrique qui se situe à un pH 10 d'environ 5,0. Après séparation de la matière insoluble, on laisse reposer le liquide, de préférence tout en le refroidissant au-dessous de la température ambiante, pour permettre la cristallisation de la protéine de la fraction 1. On a observé le fait général que la cristallisation avait lieu 15 plus rapidement à mesure que le pH s'abaissait, c'est-à-dire qu'il se rapprochait du point isoélectrique.

L'un des buts de la présente invention est de trouver un procédé perfectionné pour l'isolement de la protéine de la fraction 1.

20 Un autre but de l'invention est d'obtenir la protéine de la fraction 1 en un haut rendement et avec une grande pureté.

La manière dont ces objectifs, ainsi que 25 d'autres, sont atteints conformément à la présente invention ressort de la description détaillée qui suit.

Le procédé de la présente invention peut être utilisé pour isoler la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase et une protéine de bas poids moléculaire des feuilles de nombreuses espèces. Toutefois, attendu que les feuilles du 30 tabac, et en particulier les feuilles du tabac immature, constituent une source particulièrement riche de la protéine, il est préférable d'utiliser ces feuilles dans le procédé de l'invention. En conséquence, on se référera plus précisément à l'isolement de la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase du tabac dans la description de la présente invention.

Après que les feuilles ont été détachées du plan de tabac, ces feuilles, seules ou conjointement avec les tiges si des plantes de petite taille constituent la source

des feuilles, sont broyées, écrasées ou autrement réduites en une pulpe pour libérer la portion liquide des feuilles des matières solides. De préférence, l'opération de réduction en pulpe est conduite en présence d'un agent réducteur. A cet 5 égard, l'opération de réduction en pulpe permet aux phénol-oxydases présentes dans les feuilles d'entrer en contact avec les protéines des feuilles. Il en résulte une oxydation des aminoacides aromatiques tels que la tyrosine qui font partie de la structure primaire des protéines. Cette oxydation 10 modifie les protéines, ce qui se manifeste visuellement par leur brunissement, et abaisse leur solubilité dans l'eau. L'agent réducteur se comporte en fait comme un anti-oxydant en supprimant cette oxydation.

L'agent réducteur que l'on utilise de préférence 15 dans la présente invention est le 2-mercaptopropanol parce qu'il est volatil et s'évapore au cours du traitement subséquent décrit ci-dessous en laissant peu ou pas de résidu dans la matière isolée. Toutefois, on peut aussi utiliser d'autres agents réducteurs. Parmi ceux-ci, on mentionne des 20 agents tels que le métabisulfite de sodium et le dithiothréitol. La séparation du résidu éventuel de ces agents peut être effectuée par des techniques classiques. La quantité d'agent réducteur suffisante pour influencer 1'oxydation peut varier par exemple selon l'agent que l'on 25 choisit. Dans le cas du 2-mercaptopropanol, une suppression efficace de l'oxydation indésirable peut être obtenue en utilisant environ 5 ml de l'agent liquide par kilogramme de matière végétale en traitement.

La portion liquide de la matière végétale 30 contient les protéines de la plante, comprenant la fraction 1, et d'autres matières solides sous la forme dissoute. La portion solide de la pulpe renferme une matière grossière, aisément séparée et une matière en fines particules pigmentée en vert qui est difficile à séparer du liquide. La matière 35 grossière est de préférence séparée de la portion liquide rapidement après que la matière constituant les feuilles a été convertie en une pulpe. Une filtration simple, par exemple au moyen d'une étamine, effectue cette séparation.

Lorsqu'on procède de la sorte, la portion liquide qui contient encore la matière en fines particules pigmentée en vert est traitée avec un acide, de préférence l'acide chlorhydrique, lorsque cela est nécessaire, pour ajuster le pH dans la plage désirée, c'est-à-dire dans la plage allant d'environ 6,0 à un point proche mais au-dessus du point isoélectrique pour lequel la protéine se trouvant dans la portion liquide est dénaturée, en sorte qu'elle précipite en une masse amorphe. Cette masse contient à la fois la matière protéinique de la fraction 1 et de la fraction 2. Le point isoélectrique des protéines est à pH 5,0 environ. Par conséquent, la limite inférieure pratique à laquelle le pH doit être ajusté conformément à la présente invention est un pH d'environ 5,3. La séparation de la matière grossière peut être effectuée après acidification du liquide. D'autres acides minéraux tels que l'acide phosphorique et l'acide sulfurique peuvent aussi être utilisés.

La Demanderesse a découvert que le pH de la portion liquide d'une pulpe de feuilles de tabac varie conformément à l'âge de la plante. Dans le cas de plantes très jeunes, c'est-à-dire de plantes d'une hauteur inférieure à 30,5 cm, le pH est égal ou supérieur à environ 6,0. À mesure que la plante mûrit, le pH de la portion liquide décroît, c'est-à-dire que la portion liquide est naturellement plus acide. Par exemple, le pH du liquide provenant de plantes dont la hauteur se situe dans la plage d'environ 45,7 à 61,0 cm est égal à environ 5,7, tandis que la portion liquide dérivée de plantes de 61,0 à 91,5 cm a une valeur d'environ 5,3.

Pour obtenir les meilleurs résultats, on ajuste de préférence le pH de la portion liquide dans une plage d'environ 5,4 à 5,6, notamment dans une plage d'environ 5,4 à 5,6. Lorsque le pH est supérieur à 5,8 environ, une cristallisation a lieu à une vitesse notablement plus faible qu'à un pH inférieur. Au contraire, lorsqu'on ajuste le pH au-dessous d'environ 5,4, la protéine de la fraction 1 que l'on obtient a perdu ses propriétés avantageuses. On présume que le fait d'ajuster le pH à une valeur voisine du point

isoélectrique entraîne des modifications de la protéine de la fraction 1 semblables à celles qui résultent de sa dénaturation. Par exemple, il est plus difficile de redissoudre la protéine de la fraction 1 qui cristallise dans un liquide à 5 un pH inférieur à environ 5,4.

La Demanderesse a également découvert que par le réglage du pH dans la plage préférée de 5,4 à 5,6, la séparation de la matière verte en fines particules est facilitée parce qu'elle coagule partiellement. Cette 10 matière, qui contient la chlorophylle de la plante, peut être séparée par tout moyen convenable, mais la centrifugation constitue un mode de séparation commode et préféré.

Dans quelques cas, notamment dans le cas d'une matière en pulpe provenant de plantes de plus grande maturité 15 ou si l'on utilise un pH supérieur à environ 5,6, il peut être nécessaire de chauffer le mélange contenant la matière verte en fines particules, pour obtenir une séparation aisée. L'étape de chauffage a pour effet de coaguler la matière en fines particules dans une mesure permettant sa séparation par 20 centrifugation comme indiqué ci-dessus.

La pulpe entière peut être chauffée pour faciliter la séparation de la matière verte en fines particules. Toutefois, il est préférable de chauffer la portion de la pulpe restant après que la matière grossière a 25 été enlevée.

L'opération de chauffage doit être conduite à une température inférieure à celle à laquelle la protéine est dénaturée par la chaleur seulement. Par conséquent, en général, l'opération de chauffage doit être conduite au-dessous d'environ 52° parce qu'un chauffage au-dessus de cette température entraîne la précipitation de la protéine. On a obtenu de bons résultats en chauffant la pulpe à environ 30 48°C pendant une période n'excédant pas environ 15 minutes. Les températures inférieures à environ 48°C peuvent être utilisées, mais de plus longues durées de chauffage sont 35 nécessaires.

Le traitement thermique peut être effectué par un procédé continu ou discontinu comme décrit dans la demande de

- brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 78 505 précitée. Ainsi,
dans un procédé discontinu, la pulpe est placée dans un
récipient de manière que de la chaleur soit transférée à la
pulpe dans des conditions dans lesquelles aucune partie de la
5 pulpe, ou tout au moins sa portion liquide, ne soit chauffée
à une température à laquelle la protéine est dénaturée. Comme
indiqué ci-dessus, la pulpe est chauffée de préférence à une
température de $50 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant une période d'environ 15 à
environ 20 minutes.
- 10 Dans un procédé continu, la pulpe est pompée sans
agitation exagérée dans des serpentins immergés dans un
liquide chauffé à une température choisie de manière que, par
échange de chaleur, un volume spécifié de pulpe soit chauffé
15 à $50^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ pendant environ 15 à environ 20 minutes, puis
dans des serpentins au contact d'un liquide à une température
inférieure à 50°C pour réduire la température de la pulpe.

Un chauffage de la pulpe comme décrit ci-dessus
pour provoquer la coagulation de la matière en fines
particules est plus efficace qu'un simple réglage de pH.
20 Toutefois, le régime de chauffage ne doit être utilisé que
lorsque cela est nécessaire pour enlever la matière en fines
particules, attendu que cela a pour effet réel de prolonger
la période pendant laquelle la cristallisation de la protéine
de la fraction 1 a lieu et, dans quelques cas, pour accroître
25 la quantité de protéine obtenue.

Comme indiqué, la matière en fines particules
peut être séparée après coagulation, par exemple par
centrifugation, de la portion liquide. Le liquide surnageant
30 obtenu est un jus brun. Ce jus est conservé à une température
à laquelle la cristallisation a lieu, habituellement à une
température égale ou inférieure à la température ambiante,
pour obtenir des cristaux de la protéine de la fraction 1. On
a obtenu des résultats particulièrement avantageux en
refroidissant le jus brun à environ 8°C . La durée maximale de
35 conservation qui est nécessaire ne dépasse pas environ 16
heures. L'expérience a montré qu'une conservation au-delà de
16 heures n'améliore habituellement pas les rendements. La
ribulose 1,5-diphosphate dicarboxylase cristallisée est

séparée du liquide surnageant par filtration ou centrifugation (3000 tr/min, 5 minutes).

La forme cristalline de la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase diffère des trois formes obtenues par les procédés de l'art antérieur. Les cristaux de la forme I sont des cristaux dodécahédriques qui sont produits par les procédés mentionnés ci-dessus au moyen de tamis moléculaires ou par chromatographie sur "Sephadex". Les cristaux de la forme II sont des lamelles extrêmement minces et, jusqu'ici, ils n'ont été produits que dans des conditions très spéciales et en quantités extrêmement faibles en vue d'études cristallographiques au moyen des rayons X. Les cristaux de la forme III sont des bipyramides tétragonales et sont produits par le traitement au sulfate d'ammonium et au polyéthylèneglycol mentionnés dans ce qui précède.

Au contraire, les cristaux de la protéine de la fraction 1 produits par le procédé décrit dans le présent mémoire affectent encore une quatrième forme, différente des trois autres formes des cristaux déjà connus. Ainsi, lorsqu'on utilise le procédé de la présente invention, on obtient des cristaux de protéine de la fraction 1 ayant une forme octogonale apparente, à l'examen microscopique, en de forts rendements et avec une grande pureté.

Contrairement aux cristaux de la forme I qui se redissolvent dans de l'eau contenant du sel ordinaire (NaCl), les cristaux octogonaux restent non dissous mais passent généralement en solution lorsqu'ils sont mis en suspension dans de l'eau dont le pH est ajusté à une valeur égale ou supérieure à 7,5 par l'hydroxyde de sodium (NaOH). La demanderesse a découvert que la protéine tirée de plantes très matures, c'est-à-dire les plantes qui ont une hauteur de 61,0 à 91,5 cm, dont le jus brun a naturellement un pH de 5,3, ne peut pas se redissoudre dans l'eau (pH 8,5 par addition de NaOH). Une dialyse de la protéine de la fraction 1 redissoute vis-à-vis d'un tampon (tris, pH 7,5) suivie d'un passage sur une colonne de "Sephadex" entraîne une recristallisation, mais non à l'état de cristaux de la forme I.

Les cristaux de la fraction 1 obtenus à partir du jus brun peuvent être purifiés commodément par lavage à l'eau pour éliminer les impuretés. Une séparation des cristaux de la liqueur surnageante est là encore obtenue de la meilleure 5 façon par centrifugation. Une centrifugation à faible vitesse (environ 3000 tr/min) pendant 5 minutes est suffisante.

Ce procédé de cristallisation de la protéine de la fraction 1 entraîne son élimination quasi totale du jus brun. La liqueur surnageante résultante contient des protéines de 10 la fraction 2, d'autres matières solides solubles et, le cas échéant, la protéine non cristallisée de la fraction 1. La protéine de la fraction 2 peut être séparée de la liqueur surnageante par acidification de cette liqueur à un pH égal ou inférieur au point isoélectrique, c'est-à-dire à un pH 15 égal ou inférieur à 5,0. Cela a pour effet de faire précipiter les protéines en solution. Les rendements maximaux en protéine sont obtenus par le réglage du pH à une valeur d'environ 4,0-4,5 par l'addition d'acide chlorhydrique ou d'autres acides convenables. Le précipité résultant peut être 20 recueilli par centrifugation (3000 tr/min, 5 minutes). On peut éliminer les impuretés en lavant le précipité avec de l'eau et en le recueillant à nouveau par centrifugation.

La succession des étapes entre la récolte des feuilles, leur réduction en une pulpe (ce qui peut se faire 25 par broyage, écrasement ou tout autre procédé convenable), le réglage du pH, la conduite éventuelle du chauffage et la séparation de la matière solide de la portion liquide doit être accomplie aussitôt que possible après la récolte. Des retards dans l'accomplissement de ces étapes réduisent le 30 rendement en ribulose 1,5-diphosphate carboxylase que l'on peut obtenir. Par conséquent, il est préférable de conduire ces opérations sur le site ou près du site de récolte des feuilles.

D'autres détails de l'invention ressortent des 35 exemples suivants :

EXEMPLE 1

- Des plants de tabac type NC95 sont cultivés à une densité de plantation de $9,3 \text{ dm}^2$ par plant jusqu'à ce qu'une hauteur de 45,7 à 61,0 cm ait été atteinte. Les plants sont 5 cultivés de manière que les feuilles aient une couleur d'un vert intense. Les portions aériennes entières des plantes sont récoltées et découpées en morceaux assez petits pour être introduits dans un mélangeur Waring de 3,8 litres de capacité. Les pales de l'agitateur sont recouvertes d'environ 10 200 ml d'eau (le mélangeur Waring ne désintègre pas la matière végétale tant que les pales ne sont pas immergées dans un liquide. Toutefois, avec d'autres dispositifs de ce genre, tels qu'un désintégrateur Rietz, l'addition d'eau serait inutile).
- 15 Un lot d'un kilogramme de tiges et de feuilles grossièrement hachées provenant de la matière végétale récoltée est ajouté à l'eau additionnée de 5 ml de 2-mercaptopropanoïde et le mélange est agité pour former une pulpe difforme. La pulpe résultante, qui a la consistance d'une 20 pâte à crêpes épaisse, représente un volume d'environ 1,2 litre. La matière grossière contenue dans la pulpe est versée sur deux couches d'étamine de 0,71/0,84 mm d'ouverture de maille supportées par un tamis de 0,50 mm d'ouverture de maille, de 20,32 cm de diamètre, qui est placé dans un grand 25 entonnoir posé sur un ballon collecteur.
- Traitée de cette façon, la pulpe (1,2 litre) donne environ 1,0 litre de liquide contenant une matière pigmentée en vert. Le "jus vert" a un pH d'environ 5,7 à 5,9 dans différentes préparations.
- 30 Le jus vert est divisé en portions aliquotes de 500 ml chacune. Une portion aliquote est conservée à 25°C, tandis que l'autre est chauffée à 50°C pendant 10 minutes. Ensuite, les deux portions aliquotes sont centrifugées simultanément dans une ultracentrifugeuse Beckmann dans un 35 rotor R-21 tournant à 18 000 tr/min pendant 30 minutes. Cette grande force centrifuge enlève toute la couleur verte sous la forme d'un précipité, en laissant un "jus brun" limpide. Chaque portion aliquote de jus brun, c'est-à-dire les

portions aliquotes chauffée et non chauffée, est divisée en parties égales, l'une conservée à 8°C et l'autre laissée au repos à 25°C. Des quantités égales de la protéine de la fraction 1 cristallisent dans chaque portion aliquote. La 5 cristallisation est achevée dans tous les cas en 16 heures, bien que des cristaux apparaissent plus rapidement lorsque le jus brun est réfrigéré. Cet exemple démontre qu'un chauffage de la portion liquide n'est pas essentiel pour obtenir les cristaux de ribulose 1,5-diphosphate carboxylase.

10

EXEMPLE 2

En suivant le mode opératoire de l'exemple 1, on obtient un jus vert ayant un pH de 5,7 à partir de plants de tabac de 45,7 à 61,0 cm de hauteur. Le jus vert est divisé en 15 deux portions égales. Le pH de l'une des portions est ajusté à 6,2 au moyen d'hydroxyde de sodium. Les deux portions sont chauffées à 50°C pendant 10 minutes pour faciliter l'enlèvement de la matière verte en fines particules, par centrifugation modérée. Après l'enlèvement de la matière verte, les 20 deux échantillons de jus brun sont conservés à 8°C. En quelques heures, des cristaux apparaissent dans le jus brun de pH égal à 5,7. Aucun cristal n'apparaît dans l'échantillon de pH égal à 6,2, même après 24 heures.

Dans une expérience similaire, un jus brun dérivé 25 de plants de tabacs de 61,0 à 91,4 cm de hauteur, ayant un pH de 5,3, a produit des cristaux en 30 minutes et une cristallisation totale a eu lieu en 3 heures après la première apparition de cristaux. Toutefois, la protéine de la fraction 1 résultante ne s'est pas redissoute à un pH de 8-8,5. Dans une 30 autre expérience dans laquelle on a utilisé des plants de tabac de 45,7 à 61,0 cm de hauteur dont le liquide brun avait un pH de 5,8, des cristaux de protéine de la fraction 1 ne sont pas apparus avant 12 heures. La cristallisation a été totale en 16 heures. Ces résultats démontrent que la 35 formation de cristaux de protéine de la fraction 1 a lieu plus rapidement à un pH plus faible.

EXEMPLE 3

En suivant le mode opératoire de l'exemple 1, on a obtenu un jus vert à partir de très jeunes plants de tabac de hauteur inférieure à 30,5 cm. Le jus obtenu de cette 5 manière avait un pH de 6,0. Le jus total obtenu a été divisé en deux parties égales et chaque partie a été subdivisée en quatre portions aliquotes en vue d'un traitement subséquent. L'une des portions aliquotes de chacune des parties d'origine ayant un pH de 6,0 a été utilisée comme témoin. Une portion 10 aliquote de chaque partie a été traitée à l'acide chlorhydrique afin d'ajuster son pH à 5,8 ; une autre a été ajustée à un pH de 5,6 et une autre a été ajustée à un pH de 5,4. Les quatre portions aliquotes d'une partie ont été chauffées à 50°C pendant 10 minutes. Ces quatre portions 15 aliquotes et les quatre portions aliquotes de l'autre partie ont été centrifugées en vue de séparer la matière verte en fines particules.

Toutes les portions aliquotes ont été laissées au repos à 8°C pour permettre la formation de cristaux de la 20 protéine de la fraction I. On a noté le moment où les cristaux ont commencé à apparaître et lorsque la cristallisation a été terminée, on a noté la quantité de cristaux obtenue. Le jus brun a été analysé par spectrophotométrie en vue de déterminer la quantité de matière verte en particules 25 finement divisées contaminant le jus brun. Les résultats sont indiqués sur le tableau suivant :

	Condition du jus vert	pH du jus vert	Nombre d'heures avant l'ap- parition de cristaux	$\mu\text{g}/\text{ml}$ de matière verte dans le jus brun	mg/ml de cris- taux de pro- téine dans le jus brun
5	Non chauffé	6,0	8	10	6
10	"	5,8	6	5	6
	"	5,6	3	1	6
	"	5,4	3	0	6
	Chauffé à 50°C	6,0	48	0	3
15	"	5,8	48	0	3
	"	5,6	16	0	5
	"	5,4	3	0	6

Ces résultats démontrent encore qu'un chauffage
 20 n'est pas nécessaire pour provoquer la cristallisation de la protéine de la fraction 1, mais qu'il réduit en fait la vitesse de cristallisation et la quantité de protéine obtenue dans la plupart des cas. L'effet de la réduction du pH est d'élèver nettement la vitesse à laquelle la cristallisation a lieu. En outre, tandis que le chauffage des échantillons facilite la séparation de la matière verte en fines particules, une séparation totale de la matière verte a lieu pour des échantillons non chauffés dont le pH a été ajusté à 5,4-5,6.

30 On a déterminé le rendement de séparation de la protéine de la fraction 1 d'un jus vert dont le pH a été ajusté dans la plage désirée par comparaison des diagrammes de zones obtenus par centrifugation analytique du jus vert et du jus brun après cristallisation de la protéine de la fraction 1.
 35 Le premier montre deux types bien différenciés dont l'un correspond à la protéine de la fraction 1 et l'autre aux protéines de la fraction 2. Dans le second, on n'observe qu'un seul pic correspondant aux protéines de la fraction 2. Etant donné que la méthode de centrifugation analytique est capable de détecter une quantité aussi faible que 0,1 mg/ml de protéine de la fraction 1, on peut considérer en toute

confiance que lorsque la cristallisation est achevée, la concentration de protéine de la fraction 1 en solution est inférieure à 1 %. Au contraire, la liqueur-mère obtenue par le procédé antérieur de chromatographie sur colonne de 5 "Sephadex" contenait, en plus des protéines de la fraction 2, environ 30 % de protéines non cristallisées de la fraction 1.

Il ressort de la description ci-dessus que la présente invention constitue un procédé pratique pour extraire une protéine, notamment la protéine de la fraction 1, 10 d'une matière végétale. Ainsi, le procédé de la présente invention remédie à la nécessité d'utilisation d'une filtration moléculaire coûteuse et compliquée et de colonnes "Sephadex" comme en nécessitent les procédés de l'art antérieur. De plus, il ne doit pas y avoir d'autre agent 15 chimique que l'agent réducteur qui, dans le cas du 2-mercaptopropanoïde, s'évapore pendant le traitement ou est chassé dans l'étape éventuelle de chauffage, en vue d'obtenir la protéine de la fraction 1 et l'acide utilisé pour ajuster le pH du liquide. Du fait qu'il est inutile de diluer le 20 liquide, l'obtention des protéines de la fraction 2 est également simplifiée. Enfin, après l'enlèvement des protéines de la fraction 2 et de la protéine non cristallisée de la fraction 1 de la portion liquide, cette dernière contient encore des composés intéressants de bas poids 25 moléculaire qui peuvent être récupérés de façon plus économique qu'on ne pourrait le faire en utilisant le résidu obtenu par des procédés de l'art antérieur, attendu qu'ils sont sous la forme naturelle et non diluée. Au contraire, les résidus obtenus par les procédés de l'art antérieur sont 30 contaminés par les substances chimiques utilisées dans le procédé et ont été dilués au cours de la séparation de la protéine de la fraction 1, ce qui complique la séparation subséquente. Le procédé perfectionné de l'invention rend également inutile, dans la plupart des cas, l'utilisation du 35 chauffage décrit dans la demande de brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 78 505 précitée.

Il va de soi que la présente invention n'a été décrite qu'à titre explicatif mais nullement limitatif, et

qu'on peut y apporter de nombreuses modifications sans sortir de son cadre.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour extraire la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase d'une matière végétale comprenant les feuilles de plantes vertes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :
 - a) à réduire les feuilles en une pulpe comprenant un mélange d'une portion solide et d'une portion liquide, ladite portion liquide renfermant de la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase dissoute ;
 - b) à ajuster éventuellement le pH de la portion liquide dans une plage allant de pH 6,0 à un pH suffisamment supérieur au point isoélectrique des protéines de la portion liquide pour que lesdites protéines ne précipitent pas ;
 - c) à séparer la portion liquide de la portion solide ; et
 - d) à maintenir la portion liquide à une température à laquelle la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase cristallise.
2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que les cristaux de ribulose 1,5-diphosphate carboxylase sont séparés du liquide.
3. Procédé suivant l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la matière végétale comprend les feuilles de plants de tabac.
4. Procédé pour extraire la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase de plants de tabac, caractérisé en ce qu'il consiste :
 - a) à réduire la portion formée par les feuilles de la plante en une pulpe comprenant une portion solide et une portion liquide, ladite portion solide étant formée d'une matière en particules grossières et d'une matière en fines particules et la portion liquide contenant en solution de la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase ;
 - b) à ajuster éventuellement le pH de la portion liquide dans une plage allant de 6,0 à un pH suffisamment au-dessus du point isoélectrique des protéines de la portion liquide pour que ces protéines ne précipitent pas ;

c) à séparer la portion liquide de la portion solide ;

5 d) à maintenir la portion liquide à une température à laquelle la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase cristallise ; et

e) à séparer la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase de la portion liquide.

10 5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que la matière en particules grossières est séparée de la portion liquide avant que le pH ne soit ajusté.

6. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que le pH est ajusté avant la séparation de ladite portion solide.

15 7. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le pH est ajusté dans une plage de 5,3 à 6,0, de préférence dans la plage de 5,4 à 5,6.

8. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que la pulpe est chauffée à une température d'environ 48 à 52°C pour coaguler la matière verte en fines particules.

20 9. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que la matière en particules grossières est séparée de la portion liquide et le résidu est chauffé à une température d'environ 48-52°C pour coaguler ladite matière verte en fines particules.

25 10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 2 et 4 à 6, caractérisé en ce que, après la séparation de la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase, la portion liquide est acidifiée à une valeur égale ou inférieure au point isoélectrique des protéines dissoutes pour précipiter lesdites protéines, le pH étant ajusté de préférence dans la plage de 4,0 à 4,5.

30 11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que les feuilles et les tiges des plants de tabac sont réduites en pulpe.

35 12. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce qu'un agent réducteur, de préférence le 2-mercaptopropanoïde, est ajouté à la matière

végétale, de préférence avant sa transformation en pulpe, en une quantité suffisante pour supprimer l'oxydation des substituants aminoacides faisant partie de la structure des protéines présentes dans ladite portion liquide.

5 13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1, 2 et 4 à 6, caractérisé en ce que la ribulose 1,5-diphosphate carboxylase précipite en cristaux octogonaux.

10 14. La ribulose 1,5-diphosphate carboxylase sous la forme de cristaux octogonaux.