

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

T H E S E

DE MAGISTER PRESENTE PAR :

Mr. *BENHABLES Mohamed Salah*

THEME

HYDROLYSE ENZYMATIQUE  
DES REJETS SOLIDES  
DE POISSONNERIES

PRESENTE DEVANT :

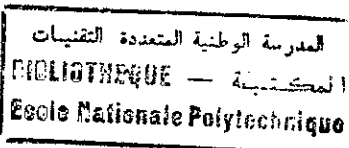
- |                 |   |
|-----------------|---|
| Mr. R. BELABBES | - Président, Professeur à l'école polytechnique           |
| Mr. N. MAMMERI  | - Rapporteur, chargé de cours à l'E. N. P.                |
| Mme D. MAMMERI  | - Rapporteur, chargé de cours à l'E. N. P.                |
| Mr. L. OUSSADOU | - Examineur, chargé de recherche au C. D. T. N            |
| Mr. H. MZALI    | - Examineur, chargé de cours à l'Université de Tizi-Ouzou |
| Mr. B. ZOUAMBI  | - Examineur, chargé de cours à l'E. N. V                  |
| Mr. M. SI AHMED | - Invité, sous-directeur à la direction environnement     |

— ANNEE : 1992 —

MINISTERE AUX UNIVERSITES

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



**T H E S E**

**DE MAGISTER PRESENTE PAR :**

**Mr. BENHABILES Mohamed Salah**

## THEME

# HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS SOLIDES DE POISSONNERIES

PRESENTE DEVANT :

- |                 |   |
|-----------------|---|
| Mr. R. BELABBES | - Président, Professeur à l'école polytechnique             |
| Mr. N. MAMMERI  | - Rapporteur, chargé de cours à l'E. N. P.                  |
| Mme D. MAMMERI  | - Rapporteur, chargé de cours à l'E. N. P.                  |
| Mr. L. OUSSADOU | - Examinateur, chargé de recherche au C. D. T. N            |
| Mr. H. MZALI    | - Examinateur, chargé de cours à l'Université de Tizi-Ouzou |
| Mr. B. ZOUAMBI  | - Examinateur, chargé de cours à l'E. N. V                  |
| Mr. M. SI AHMED | - Invité, sous-directeur à la direction environnement       |

— ANNEE : 1992 —

## R E M E R C I E M E N T S

Au terme de cette étude, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à tous ceux qui par leur aide, par leur compétence ont contribué à la réalisation de ce travail.

Que soient particulièrement remerciés

Mme et Mr MAMERI, chargés de cours à l'E.N.P, directeurs de thèse pour leurs aides prodiguées tout au long de l'étude.

Mr R. BELABBES, Professeur à l'E.N.P d'avoir accepté de présider la soutenance de cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à:

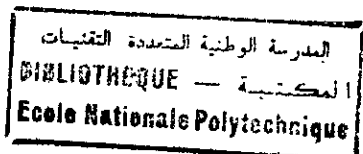
Mr ZDUAMBI, chargé de cours à l'E.N.V et Mr OUSSADOU, chargé de recherche au C.D.T.N, qui par leurs remarques et observations, ont permis la finalisation de ce travail.

Mme HELLAL, chargé de cours à l'I.N.A et Mr MZALI, chargé de cours à l'université de Tizi-ouzou, qui ont bien voulu m'honorer par leurs présences et d'avoir accepté de juger ce travail.

Enfin, je tiens à exprimer ma reconnaissance à la famille Tizi-ougdal qui m'a beaucoup aidé durant la réalisation de cette thèse.

# SOMMAIRE

\*\*\*\*\*



## INTRODUCTION

## PARTIE I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Préambule .....	03
I-1 ETUDE BIOCHIMIQUE .....	04
I-1-1 Protéines	
I-1-1-1 Protéines globulaires	
I-1-1-2 Protéines fibreuses	
I-1-1-3 Evaluation de la qualité nutritive des protéines .....	05
I-1-2 Les enzymes .....	06
I-1-2-1 Classification des enzymes	
I-1-2-2 Facteurs physiques affectant la réaction enzymatique ..	10
I-1-2-3 Cinétique enzymatique .....	12
I-1-3 Les acides aminés .....	18
I-1-3-1 Besoins qualitatifs	
I-2 PRINCIPAUX PROCÉDES DE TRAITEMENT DES PROTÉINES DE POISSON	
I-2-1 Hydrolyse chimique .....	20
I-2-2 Extraction par un solvant	
I-2-3 Hydrolyse enzymatique .....	21
I-2-4 Autolyse .....	28
I-2-5 Fabrication de la farine de poisson .....	30
I-2-6 Fabrication du surimi .....	32
I-3 INDUSTRIE HALIEUTIQUE EN ALGERIE .....	34
I-3-1 Présentation de l'usine de Dellys .....	35
PARTIE II ETUDE EXPERIMENTALE	
II-1 ETUDE DU REJET .....	38
II-1-1 Analyses chimiques	

II-1-2	Analyses microbiologiques .....	41
II-1-2-1	Prélèvement	
II-1-2-2	Préparation d'échantillons	
II-1-2-3	Standardisation de la suspension mère .....	42
II-1-2-4	Tests microbiologiques	
II-1-2-5	Etude quantitative .....	45
II-2	PARTIE BIOCHIMIQUE .....	46
II-2-1	Production de la pepsine brute	
II-2-2	Optimisation de l'activité de la pepsine brute .....	50
II-2-3	Essais d'hydrolyse .....	52
II-2-4	Détermination des paramètres cinétiques .....	53
II-2-5	Installation semi-pilote .....	55
PARTIE III RESULTATS ET INTERPRETATIONS		
III-1	ANALYSES CHIMIQUES .....	62
III-2	ANALYSES MICROBIOLOGIQUES .....	63
III-3	VALORISATION DU REJET PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE .....	66
III-3-1	Production de la pepsine brute	
III-3-1-1	Poids sec de muqueuses stomacales de mouton	
III-3-1-2	Autodigestion de la muqueuse stomacale de mouton .....	67
III-3-2	Optimisation de l'activité de la pepsine brute .....	71
III-3-2-1	Temps d'incubation	
III-3-2-2	pH d'activité	
III-3-2-3	Température .....	75
III-3-3	Facteurs affectant le taux d'hydrolyse .....	80
III-3-4	Cinétique d'hydrolyse .....	88
III-3-5	Installation semi-pilote .....	92
III-4	CONCLUSION .....	96

C O N C L U S I O N

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة — BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

# *Introduction*

Approximativement 71 millions de tonnes de poisson sont pêchés annuellement dans le monde, 20 millions de tonnes sont convertis en farine de poisson pour l'alimentation du bétail (1).

Le reste, moins de 50%, est actuellement utilisé pour la consommation humaine. De plus, ces chiffres ne tiennent pas compte des quantités de poissons rejetées en mer dès leur capture et qui peuvent atteindre 25% à 30% du total des captures (2).

Les captures traitées d'une manière ou d'une autre pour l'alimentation humaine, soit plus de 65% deviennent un sous produit ou un déchet posant de sérieux problèmes de pollution (3).

Des farines ont été produites à partir d'espèces représentant un intérêt commercial médiocre (petites espèces, poisson gras) mais aussi à partir d'espèces parfaitement utilisables pour la consommation humaine directe tels que le chinchard et le hareng.

Le remplacement au moins partiel de ces derniers, utilisés comme matière première, par les rejets de poissonnerie s'impose de plus en plus vu les quantités soustraites aux mers et aux océans qui dans certains cas ne peuvent être reproduites. Cela peut-être entrepris par la revalorisation des parties non comestibles du poisson de valeur nutritionnelle sensiblement identique aux parties comestibles.

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

L'objectif est très important : obtenir un produit peu coûteux, pauvre en lipides, de haute valeur nutritionnelle, de goût agréable, conservable longtemps et stable.

C'est dans ce cadre que vient s'inscrire le thème de notre travail consistant à la valorisation des rejets solides de poissonneries par hydrolyse enzymatique à base de pepsine. La pepsine est l'enzyme protéolytique la plus appropriée grâce à la spécificité d'hydrolyse des polypeptides et du pH acide nécessaire à son activité optimale, minimisant ainsi les contaminations bactériennes.

\* Dans une première étape nous nous sommes intéressés à la production d'une pepsine brute à partir de l'estomac de mouton et à déterminer les conditions optimales de son activité enzymatique (température, concentration, pH,...) sur un substrat standard et sur les protéines de poissons .

\* Dans une seconde étape, nous avons mis en oeuvre un processus enzymatique en vue d'hydrolyser les longues chaînes polypeptidiques et ainsi libérer les acides aminés et les petits peptides afin d'obtenir un concentré protéique de haute valeur nutritionnelle. Un tel produit pourrait résoudre partiellement la pénurie des protéines dans les pays du tiers monde. Plus particulièrement, alléger la dépendance de l'ALGERIE dans le domaine de l'alimentation du bétail. Cela conduirait à une économie de sommes considérables de devises nécessaires à l'importation des protéines de soja de l'étranger.



# **Partie I**

## *Etude bibliographique*

## Préambule

---

Les rejets solides des poissonneries constituent une portion importante de la matière première nutritionnelle marine. A titre d'exemple le volume annuel des rejets américains est environ de 1.2 millions de tonnes et seulement 50% est récupéré pour l'alimentation animale (4).

De plus ces rejets présentent une valeur nutritionnelle aussi importante que la partie comestible du poisson.

A titre indicatif, on cite sur le tableau (I.1) l'importance de la valeur nutritionnelle du poisson.

Constituants (% en poids)	Poisson entier	Fraction comestible	Fraction non comestible
Eau	80,9	83,6	81,2
Lipides	3,5	0,8	4,4
Protéines	12,5	15,2	11,7
Cendres	2,7	1,1	3,5

Tableau (I.1) " Composition approximative du poisson  
pêché au chalut " (5).

## I-1 ETUDE BIOCHIMIQUE

### I-1-1 Les protéines

Les protéines sont des hauts polymères présentes dans tous les tissus et interviennent pour une grande part dans la structure de la cellule. Du point de vue structure, on distingue les protéines globulaires et les protéines fibreuses.

#### I-1-1-1 Protéines globulaires

C'est une classe qui comprend la quasi-totalité des protéines fonctionnelles et notamment les protéines enzymatiques.

Il existe quatre types de structure de complexité croissante:

- a) Structure primaire: elle correspond à l'enchaînement linéaire des acides aminés reliés entre-eux par la seule liaison " peptidique " (6).
- b) Structure secondaire: les groupements C=O et NH de deux liaisons peptidiques disposées l'une en dessous de l'autre peuvent contracter une liaison hydrogène, on obtient, par enroulement de la chaîne une spire dont la configuration a été établie par Pauling et Crey (7).
- c) Structure tertiaire: elle est obtenue par repliement de la chaîne sur elle même et formation de liaisons de type: ponts disulfurés, liaisons hydrogènes, liaisons électrostatiques et liaisons hydrophobes. La protéine se présente alors sous la forme d'une pelote de telle manière que les groupements polaires sont à la surface et les apolaires tournés vers l'intérieur.

d) Structure quaternaire: elle est constituée par l'association de plusieurs chaînes dites monomériques. La molécule est polymérique comportant un axe de symétrie ayant souvent une masse moléculaire dépassant 100 K.Da (8).

#### I-1-1-2 Protéines fibreuses

On a deux grands groupes de structure:

- a) L'hélice  $\alpha$ : c'est exactement la structure secondaire des protéines globulaires.
- b) Les feuillets: ils correspondent à la formation de liaisons hydrogène entre les groupements C=O et NH de deux liaisons hydrogène disposées côte à côte.

#### I-1-1-3 Evaluation de la qualité nutritive des protéines

Un apport adéquat de protéines est essentiel pour les animaux supérieurs puisque seuls les organismes inférieurs sont capables de synthétiser leurs protéines à partir d'autres sources d'azote (9).

Cette évaluation est réalisée à l'aide de deux méthodes (10):

- a) Méthode chimique: C'est la caractérisation du produit par sa composition en acides-aminés supposés limitant (Lysine, Methionine et Tryptophane).
- b) Méthode biologique: elle est réalisée par des tests biologiques sur des animaux en voie de croissance, augmentation du poids de l'animal par rapport à la quantité de protéines ingérées. Cette technique est très coûteuse et lente.

## I-1-2 Les enzymes

Une enzyme est un catalyseur biologique de nature protéique complexe assurant spécifiquement la transformation d'un substrat ou d'une classe de substrats (11).

Le site actif d'une enzyme est une région localisée où se fixe et se transforme le substrat.

### I-1-2-1 Classification des enzymes

Une classification a été proposée par la commission des enzymes de l'union internationale de biochimie en 1961. Celle-ci comprend six classes principales, selon la nature des réactions (12):

- . Les oxydoréductases
- . Les transférases: un groupement fonctionnel sera déplacé d'une molécule sur une autre.
- . Les hydrolases: catalysent les réactions d'hydrolyse avec fixation d'une molécule d'eau.  
C'est la classe qui contient la plupart des enzymes utilisées en industrie.
- . Les lyases: catalysent des réactions permettant le déplacement d'un groupement sur le substrat avec apparition d'une double liaison.
- . Les isomérases: c'est le réarrangement intramoléculaire.
- . Synthétases : ce sont des réactions de synthèse qui utilisent essentiellement de l'A.T.P comme source d'énergie.

**Protéases:** les protéases sont les enzymes qui dégradent les protéines en acides aminés.

Les principales protéases sont présentées sur le tableau (I.2)

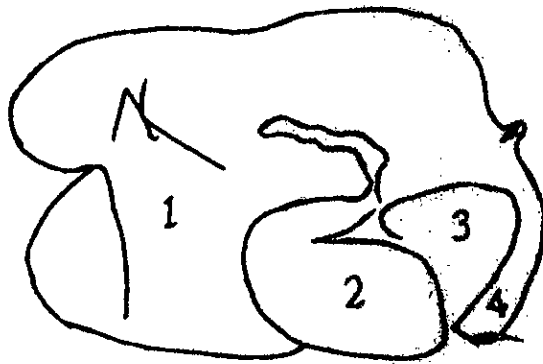
Classe et nom de l'enzyme	Microorganisme producteur ou origine	Condition optimale	
		pH	T (°c)
Protéase serine			
Chymotrypsine	Pancréas	8,5	35
Trypsine	Pancréas	8,5	45
Subtilisme	Bacillus subtilis	10,0	65
Protéase à cysteine			
Papaine	Carica papaya	6,0	65
Chymopapaine	Carica papaya	6,0	65
Bromlaine	Ananas cosmosus	6,5	55
Protéase acide			
Pepsine	Estomac	1,8	40
Chymosine	Abomassum	4,8	40

Tableau (I.2) " Principales protéases" (13).

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes, particulièrement intéressés à la pepsine que nous présentons plus en détail ci-dessous:

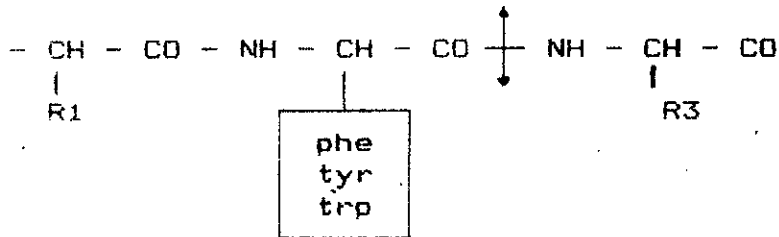
la pepsine est l'une des enzymes les plus anciennement connues résultant de l'activation d'un proenzyme inactif, le pepsinogène de poids moléculaire 40.000 et est synthétisée dans la muqueuse gastrique en éliminant 42 résidus d'acide-aminé du proenzyme, son poids moléculaire est ainsi de 3300 (14).

Le pepsinogène se trouve, comme l'indique le schéma ci-dessous, au niveau de la quatrième poche de l'estomac d'ovins appelée plus communément la caillette (63).



- (1) Panse
- (2) Caillette
- (3) Feuillet
- (4) Réseau

La pepsine hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques dans lesquelles un résidu d'acide aminé aromatique (phenylalanine, tyrosine, tryptophane) est impliqué par son groupement carboxylique selon le schéma suivant (15):



De plus, elle hydrolyse lentement les liaisons peptidiques impliquant les résidus suivants: Leucine et Valine

On distingue trois types de pepsines:

- \* pepsine A: hydrolyse les liaisons peptidiques de préférence au niveau de la phenylalanine et leucine.
- \* pepsine B: ayant une spécificité plus étroite que A, dégradation plus faible de la gélatine et l'hémoglobine.
- \* pepsine C: haute activité vis à vis de l'hémoglobine.



## I-1-2-2 Facteurs physiques affectant la réaction enzymatique

### a) Température:

L'élévation thermique accroît l'agitation moléculaire d'où une forte rencontre des différents composés du milieu (16).

La vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la température selon la loi d'Arrhénius, mais au-delà de la valeur optimale, il y a désactivation de la chaîne protéique considérée comme une modification de la conformation (au niveau des structures secondaires, tertiaires et quaternaires) qui n'est pas accompagnée par la rupture des liaisons peptidiques impliquées dans la structure primaire (17).

### b) Le pH :

L'influence du pH peut s'exercer de la manière suivante:

- sur le substrat, dont le degré d'ionisation permet ou non sa combinaison avec l'enzyme. Ce n'est que dans une zone restreinte de pH que les groupes ionisables sont dans l'état convenant à la formation du complexe enzyme-substrat.
- sur la protéine enzymatique, et ceci à deux niveaux:
  - au niveau du site actif, en réglant le degré d'ionisation des groupes fonctionnels des acides aminés impliqués dans la réaction et au niveau des acides aminés participant au maintien de la structure tertiaire active de la protéine (18).

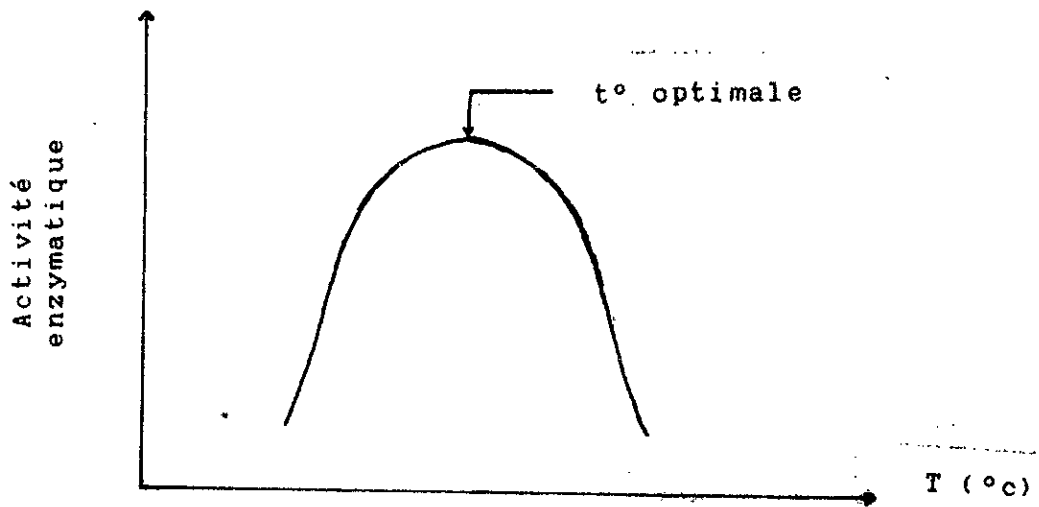


Figure (I.1) " Effet de la température sur la réaction enzymatique "

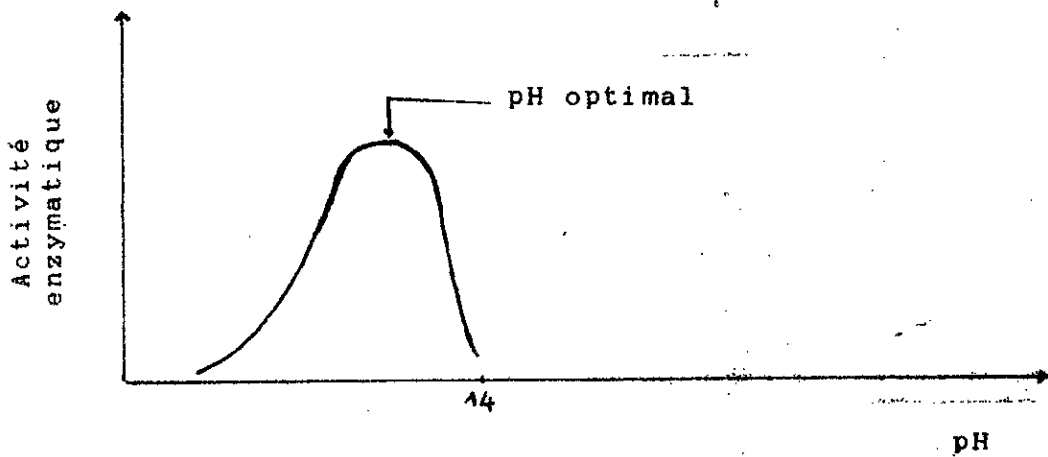


Figure (I.2) " effet du pH sur la réaction enzymatique "

### I-1-2-3 Cinétique enzymatique

Soit le modèle simplifié d'une réaction enzymatique à un substrat et un complexe Enzyme-Substrat (19):



E : enzyme ; S : substrat ; ES : complexe enzyme-substrat

P : produit de la réaction enzymatique.

Aux conditions initiales on a :

- la concentration du produit est négligeable car peu de substrat ayant été transformé, on obtient donc:



$k_1$  ;  $k_2$  ;  $k_3$  les constantes de vitesse.

- pour la plupart des enzymes  $k_3$  est la constante de vitesse la plus faible, la décomposition de ES en E + P est donc l'étape limitante.

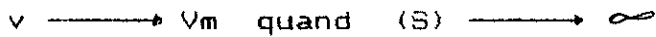
On écrit alors:  $v = k_3 (ES)$  où  $v = dP/dt$  vitesse de la réaction enzymatique.

- établissement d'un état stationnaire, ce qui signifie que la concentration du complexe ES est constante, la vitesse de la réaction enzymatique s'écrit donc:

$$v = k_3 (ES) = \text{cste}$$

### 1) Activité de l'enzyme " $V_m$ "

C'est la vitesse initiale d'une réaction enzymatique à concentration " saturante " de substrat.



L'activité de l'enzyme est proportionnelle à sa concentration:

$$V_m = k_3 (E_t)$$

mais pour une concentration d'enzyme donnée, elle varie avec la nature du substrat et dépend de la température et du pH.

### 2) Constante de Michaelis " $K_m$ "

Dans l'équation de Michaelis, lorsque  $v = V_m/2$ ,  $K_m$  prend une valeur importante:

$$K_m = (S), \text{ exprimée en mole/l}$$

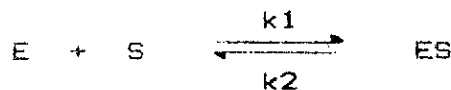
Par ailleurs,  $K_m$  peut être assimilée à l'inverse de la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat.

$$\text{On sait que : } K_m = (k_2 + k_3) / k_1 = (k_2/k_1) + (k_3/k_1)$$

or l'étape limitante de la réaction est généralement:



ceci parce que, pour la plupart des enzymes,  $k_3$  est petit devant  $k_1$  et  $k_2$ . Donc le rapport  $k_3/k_1$  est négligeable et on assimile  $K_m$  à  $k_2/k_1$ . Si l'on considère la seule association entre l'enzyme et le substrat:



la constante d'affinité est:

$$K_a = (ES) / (E)(S) = k_1/k_2$$

$$\text{donc: } K_m = 1/K_a = K_d$$

$K_d$  est la constante de dissociation du complexe ES, l'affinité de l'enzyme pour le substrat est d'autant plus grande que la constante de Michaelis  $K_m$  est faible.

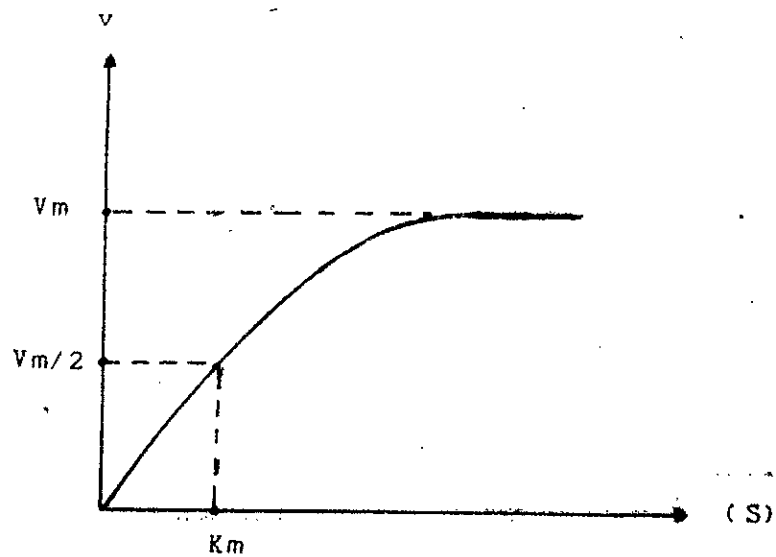


Figure (I.3) " Représentation de  $v = f(s)$  "

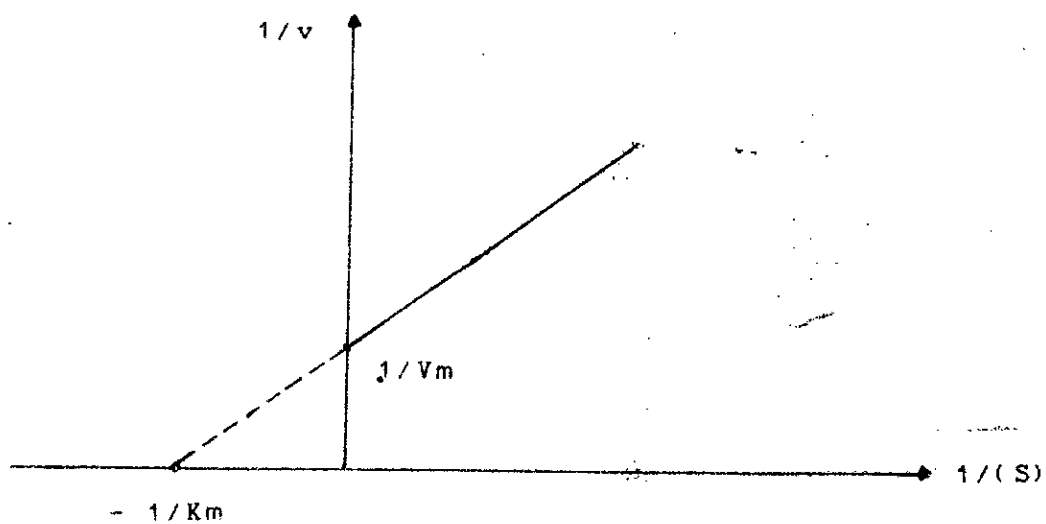


Figure (I.4) " Linéarisation de Line Weaver et Burk "

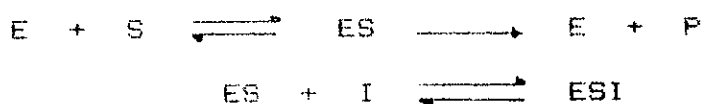
Enfin, Line Weaver et Burk, ont linéarisé cette courbe,  $v = f(S)$ , en portant sur un graphe  $1/v$  en fonction de  $1/S$ . Ce qui a permis de déterminer, par simple extrapolation, la valeur de la constante  $K_m$  et de la vitesse maximale  $V_m$  (figure I.4).

Toute fois, il s'avère que dans des milieux complexes que des phénomènes d'inhibitions perturbent la cinétique enzymatique.

Dans ce cas au lieu d'obtenir une droite en portant  $1/v = f(1/S)$  comme le prévoit la loi de Michaëlis, nous obtenons une hyperbole du type présentée à la figure (I.5). Il existe différents types d'inhibition. Nous nous contentons de présenter l'inhibition de la réaction enzymatique par le substrat.

Inhibition par excès de substrat:

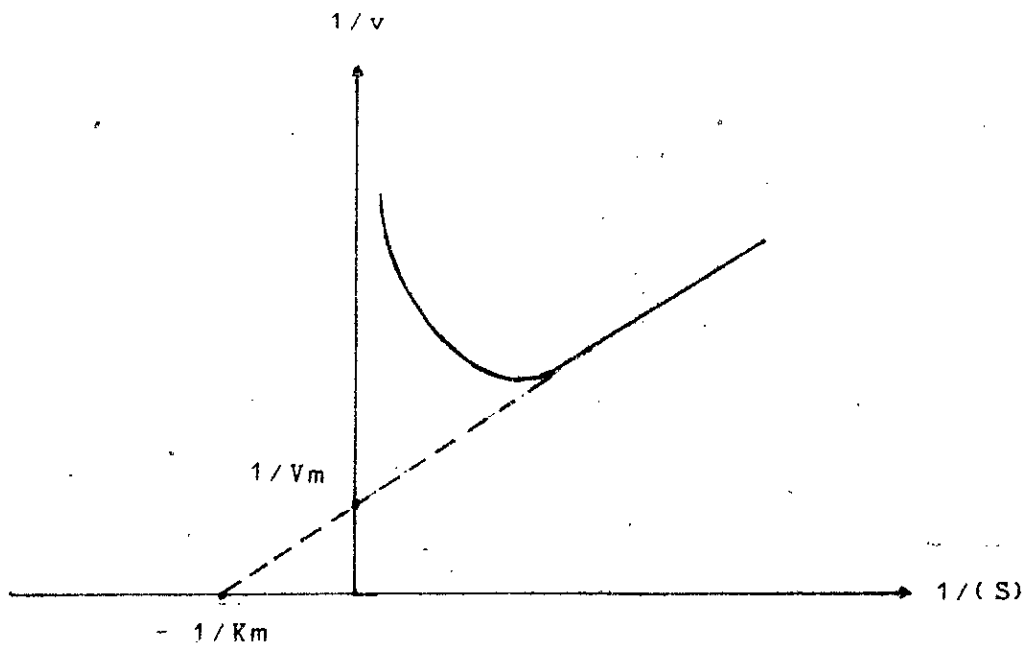
Les réactions regissant le phénomène sont les suivantes:



une deuxième molécule du substrat se fixe sur le complexe ES et le rend inactif. Dans ce cas la relation de Michaëlis n'est plus valable d'où nous faisons appel à une relation intégrant la constante d'inhibition  $K_i$ :

$$1/v = 1/V_m \left[ 1 + \frac{K_m}{(S)} + \frac{(S)}{K_i} \right]$$

D'où, en portant  $1/v$  en fonction de  $(S)$ , nous pouvons déduire la valeur de  $K_i$  par extrapolation graphique (figure I.6).



• Figure (I.5) " Inhibition de la réaction enzymatique "

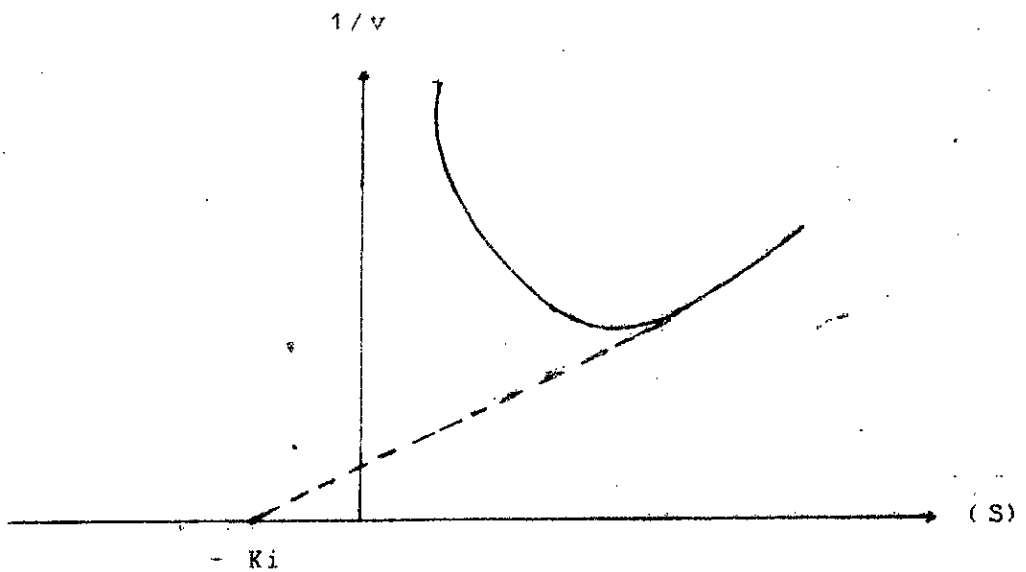


Figure (I.6) " Détermination graphique de  $K_i$  "

### I-1-3 Les acides aminés

---

Les acides aminés des protéines proviennent principalement de la digestion des protéines alimentaires. Certains peuvent être synthétisés par l'animal: ils sont dits acides aminés non essentiels tandis que les autres, acides aminés essentiels, doivent être apportés par l'alimentation (20).

#### I-1-3-1 Besoins qualitatifs

Certains acides aminés doivent obligatoirement être présents dans la ration alimentaires pour assurer une croissance normale. Ce sont les acides aminés indispensables, chez l'homme ils sont au nombre de huit (21):

Leucine, Isoleucine, valine, Lysine, Methionine,  
Thréonine, Phénylalanine, Tryptophane.

Mary Clegg (22) , montre que la bonne santé peut-être maintenue par un régime complètement synthétique:

- . acides aminés
- . glucose
- . acides gras essentiels
- . sels minéraux
- . vitamines
- . eau

Enrique Yanez (23) a réalisé une hydrolyse enzymatique des protéines de poisson (Merlu) par l'enzyme " Bromlaine ".

L'analyse du produit obtenu a montré que tous les acides aminés



essentiels sont présents en forte quantité comparée au modèle F.A.O / W.H.O établi pour l'homme en 1973 figurant sur le tableau (I.3).

De plus, des résultats expérimentaux ont montré qu'une fortification des céréales par un tel produit a fortement amélioré la qualité des protéines céréalieres et ceci après la réalisation d'une série de tests biologiques dans la croissance de rats.

Acides aminés	g / 16g d'azote	
	Hydrolysats	Modèle F.A.O/W.H.O
Isoleucine	4,4	4,0
Leucine	9,5	7,0
Lysine	11,8	5,5
Meth. + Cystéine	4,2	3,5
Phen. + Tyrosine	6,6	6,0
Thréonine	3,7	4,0
Tryptophane	1,3	1,0
Valine	5,7	5,0
Total	47,2	36,0

Tableau (I.3) " Composition en acides aminés d'un hydrolysats enzymatique de poisson (merlu) comparée au modèle de la F.A.O/W.H.O en 1973 " (23).

F.A.O : Food and Agriculture Organisation

W.H.O : World Health Organisation

## I-2 PRINCIPAUX PROCÉDES DE TRAITEMENT DES PROTÉINES DE POISSON

Au cours des dix à vingt dernières années, il y a eu de nombreuses tentatives de valorisation des rejets solides des poissonneries et des espèces non consommables.

Nous citons ci-dessous les méthodes les plus usuelles.

### I-2-1 Hydrolyse chimique

Elle est obtenue par action d'un acide (chlorhydrique, sulfurique ou phosphorique) ou d'une base (hydroxyde de sodium).

Ces méthodes ont pour principal inconvénient de conduire à la destruction partielle ou totale de certains acides-aminés et le produit obtenu renferme des matières humiques (24).

### I-2-2 Extraction par un solvant

C'est le processus le plus conventionnel utilisant un solvant organique tel que l'isopropanol pour éliminer les lipides par extraction (25).

cette méthode est complexe, nécessitant du matériel coûteux et induit des problèmes de récupération du solvant et de sa contamination par le rejet.

le produit ainsi obtenu est une protéine non fonctionnelle, non réhydratée par l'eau et ayant un potentiel d'utilisation comme additif alimentaire limité (26).

### I-2-3 hydrolyse enzymatique

---

Cette méthode consiste à l'utilisation d'une enzyme spécifique, ou plus fréquemment, d'un mélange d'enzymes pouvant solubiliser les protéines et libérer les lipides.

Le produit final est une protéine fonctionnelle pouvant être immédiatement commercialisée comme additif solide pour l'alimentation humaine ou animale (27).

A titre d'exemple, nous présentons sur la figure (I.7) un processus classique de traitement des protéines de poissons par hydrolyse enzymatique. Dans ce cas, le poisson broyé est mélangé avec une quantité déterminée d'eau. Il est ensuite homogénéisé par simple agitation. Le pH désiré est ajusté par ajout d'acide ou de base concentré. La température est maintenue à sa valeur optimale à l'aide d'un échangeur de chaleur.

L'enzyme, ramenée préalablement aux conditions optimales d'hydrolyse est ajoutée en quantité bien déterminée par rapport au mélange eau-poisson et un mélangeage correcte est maintenu jusqu'à la fin de l'opération.

Quand le taux d'hydrolyse désiré est atteint, la réaction est stoppée par désactivation thermique de l'enzyme qui se fait généralement à une température comprise entre 80°C et 100°C.

De plus, cette étape éliminera l'humidité et concentrera l'hydrolysate à environ 70% en solide (28).

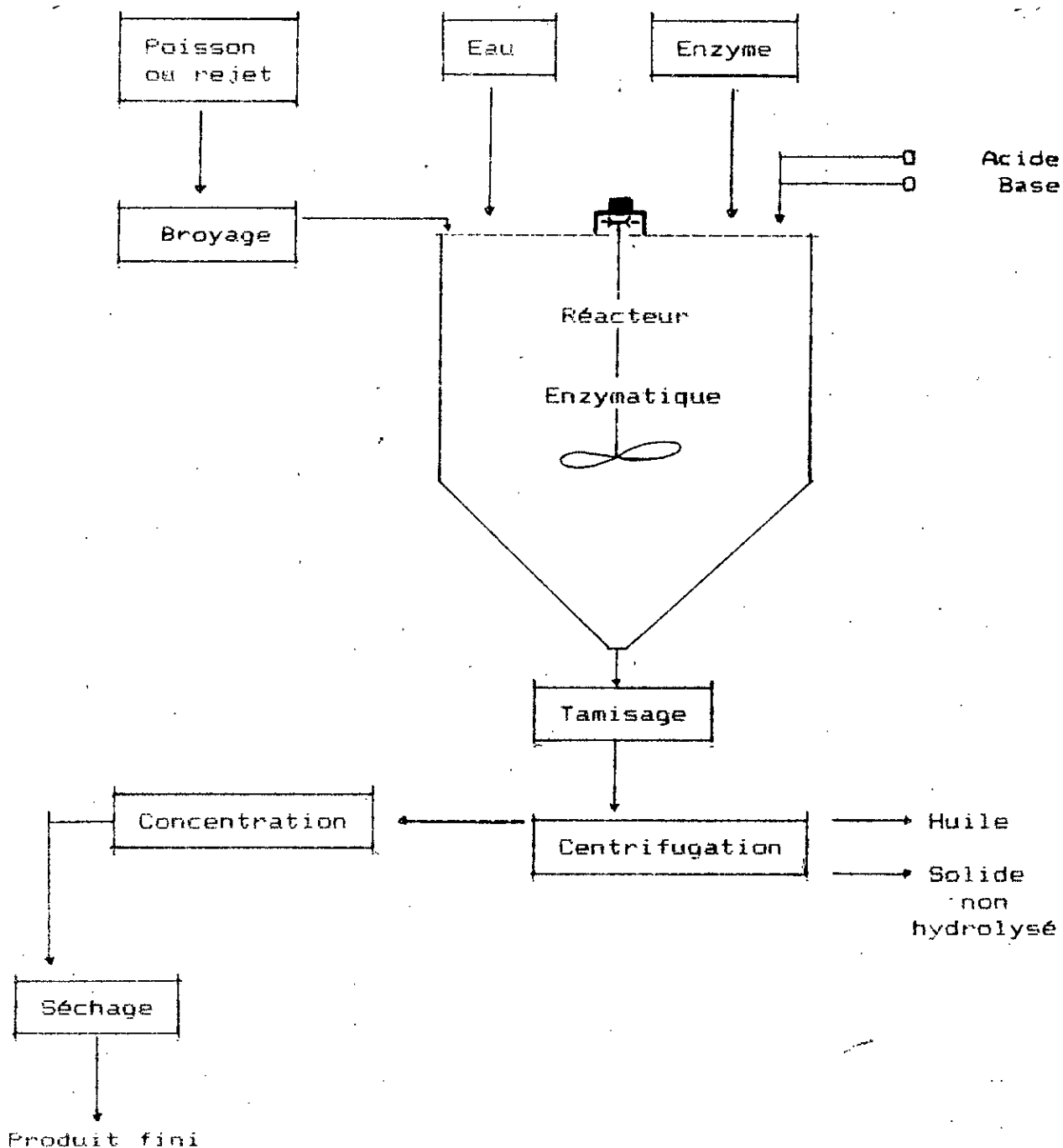


Figure (I.7) " processus classique de valorisation des protéines de poissons par hydrolyse enzymatique " (29).

Pigott et Bucove (5) ont réalisé une hydrolyse enzymatique à l'échelle pilote des rejets de merlu par une enzyme commerciale " pepsine " .

Les conditions opératoires utilisées ont été les suivantes :

- rapport eau/substrat = 1/2 en poids
- température T = 45 - 50°C
- pH = 2,0

L'évolution du taux d'hydrolyse en fonction du temps obtenue au cours de leurs expériences est présentée sur la figure (I.8).

On remarque que les taux d'hydrolyse sont nettement améliorés après l'ajout de 0,15% et 0,3% d'enzyme en augmentant d'une valeur de 10% (sans ajout d'enzyme) à environ 73% après quatre heures d'hydrolyse.

En fin d'opération, la réaction est stoppée par désactivation de l'enzyme à 100°C durant quelques minutes. Après refroidissement de l'hydrolysate à l'air libre, les opérations suivantes sont effectuées:

- centrifugation: cette opération permet l'élimination des matières grasses.
- échange ionique: il sert à la neutralisation de l'hydrolysate.
- concentration: elle permet l'élimination partielle de l'humidité.
- séchage: un séchage par pulvérisation permet d'obtenir une poudre blanche sans perte de nutriments.

L'analyse en acides aminés du produit final comparée à celle de la caséine a été effectuée par Pigott et coll. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau (I.4).

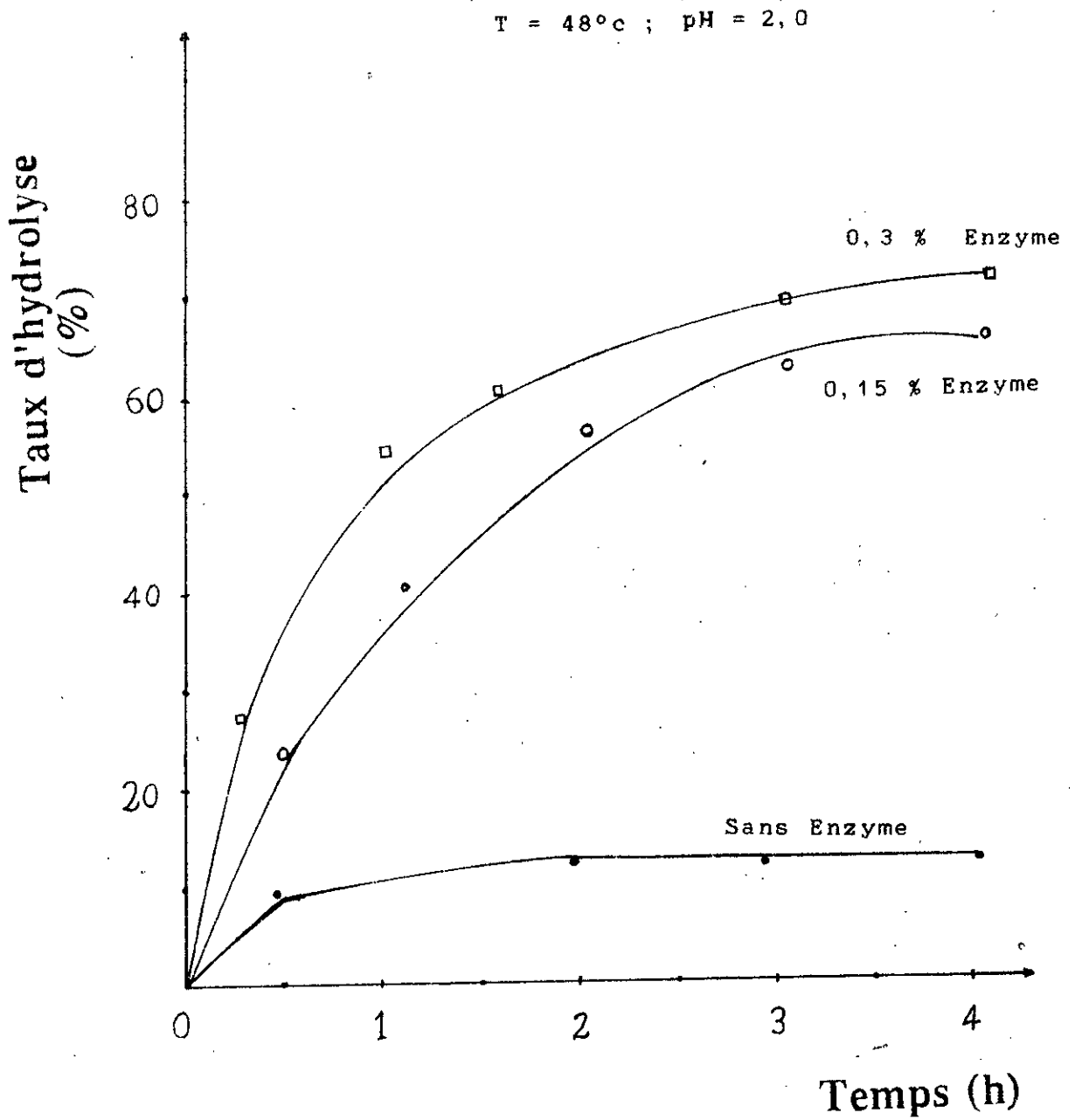


Figure (I.8) " Evolution du taux d'hydrolyse des protéines de poisson (merlu) par la pepsine " (5)

Acides aminés	Teneurs en (%)	
	Hydrolysats	Caséine
Isoleucine	3,9	5,0
Leucine	7,3	7,5
Lysine	8,5	6,7
Phénylalanine	3,3	4,0
Tyrosine	2,7	5,2
Cystéine	1,0	0,3
Méthionine	2,8	2,3
Thréonine	3,8	4,0
Tryptophane	1,1	1,0
Valine	4,5	5,9
Total	38,9	41,9

Tableau (I.4) " Composition en acides aminés d'un hydrolysats enzymatique des protéines de poisson (merlu) comparée à celle de la caséine " (5).

Nous constatons que la composition de l'hydrolysats en acides aminés est pratiquement aussi riche que la caséine, sauf que la teneur en lysine est légèrement plus élevée, tandis que celle des acides aminés aromatiques est moindre.

Vega et Brennan (62) ont réalisé une hydrolyse enzymatique des rejets de la Morue par une enzyme commerciale " papaine " dans un réacteur de capacité 80 litres.

Les conditions opératoires utilisées ont été les suivantes:

- enzyme/substrat = 0,05/100 en poids
- température T = 65°C
- pH = 7,0

L'évolution du taux d'hydrolyse en fonction du temps obtenue au cours de leurs expériences est présentée sur la figure (I.9).

On remarque dans les deux cas (hydrolyse avec addition d'eau et sans addition d'eau) que le taux d'hydrolyse obtenu à la fin de la réaction est du même ordre, environ 62% .

Donc, du fait que la viscosité du rejet broyé est considérablement réduite à 65°C, il devient alors possible d'effectuer l'hydrolyse sans apport d'eau. Par conséquence, une réduction de la taille de l'équipement, ainsi, que le coût nécessaire au séchage de l'hydrolysate.



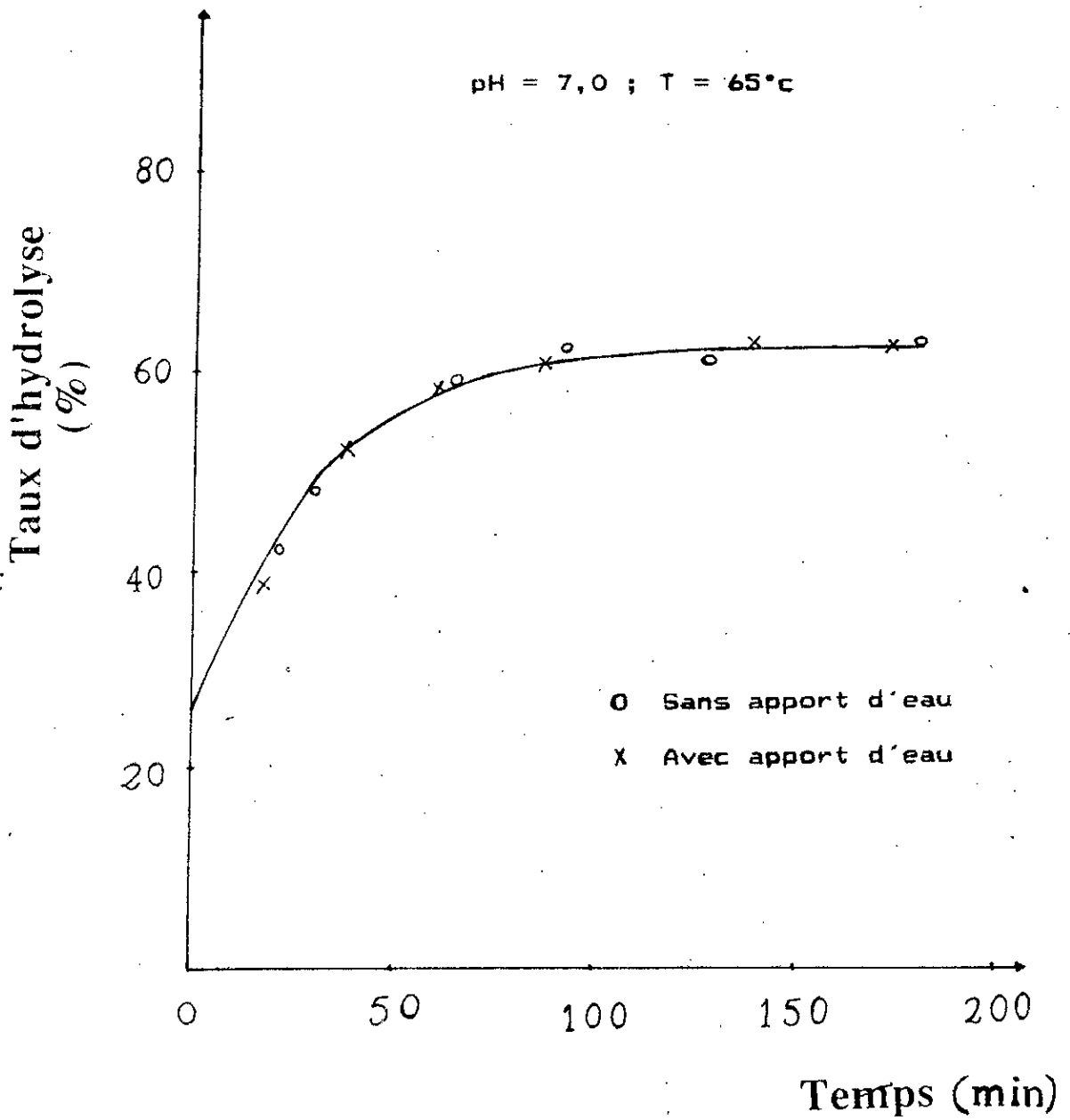


Figure (I.9) " Evolution du taux d'hydrolyse des protéines de poisson (morue) par la papaine " (62).

#### I-2-4 Autolyse

---

L'autolyse est une hydrolyse enzymatique sans addition d'enzyme, c'est à dire, le système enzymatique utilisé est déjà contenu dans le poisson en particulier dans les viscères (30). L'autolyse aboutit à un surnageant riche en protéines et en lipides. Elle donne aussi un sédiment insoluble composé de protéines non hydrolysées et de lipides (31), (32). L'autolyse n'est cependant jamais complète, même après des incubations de quelques mois, ce qui a freiné son succès au-delà du laboratoire (33).

En revanche, certains chercheurs ont utilisé l'autolyse non seulement pour produire un concentré de protéines de poisson mais aussi pour préparer un milieu de croissance pour les bactéries et des enzymes protéolytiques tels que la pepsine à partir des viscères de la morue. Le schéma du principe d'un tel procédé est présenté sur la figure (I.10).

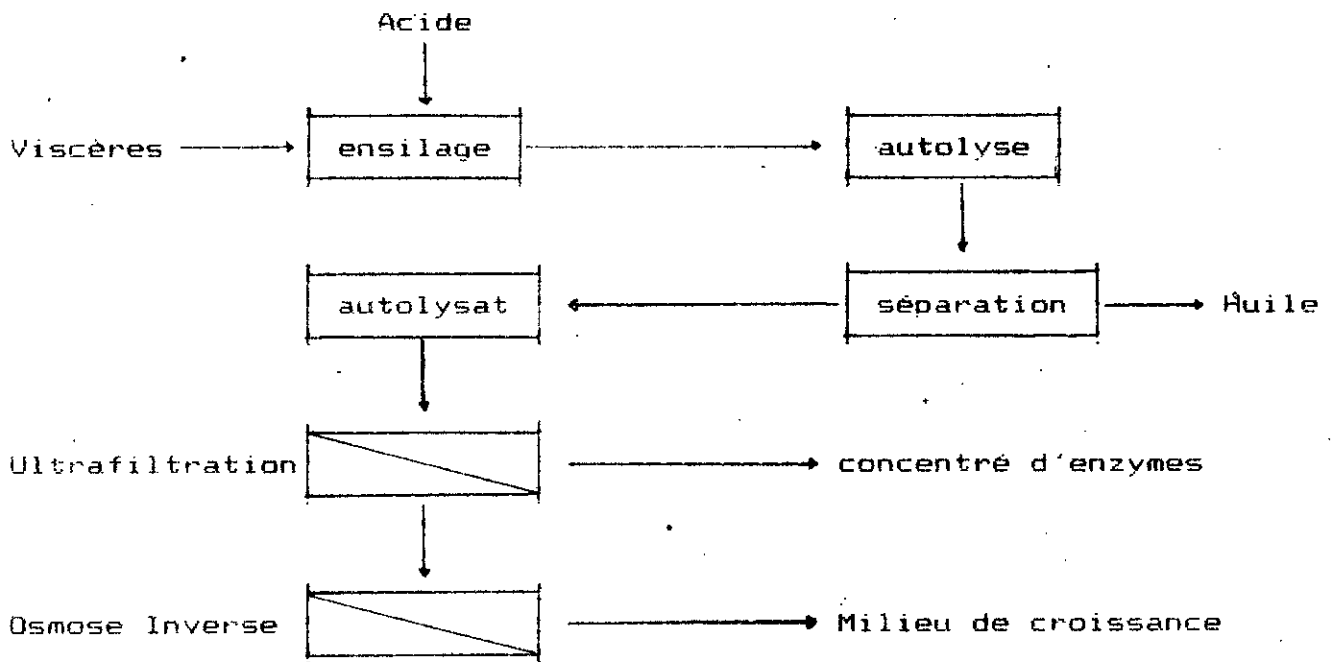


Figure (I.10) " Production d'enzymes protéolytiques à partir des viscères de la morue " (34).

Ensilage: les viscères du poisson sont broyés ensuite additionnés au mélange d'acide formique et propionique à une concentration finale de 1,5% (poids/volume) (35).

## 1-2-5 Fabrication de la farine de poisson

---

La farine de poisson est l'une des principales sources de protéines utilisée pour l'élevage d'animaux et ceci quelque soit son origine. Nous présentons sur le tableau (1.5) les compositions de différents types de farine de poisson.

On constate que les farines de poisson, en raison de leurs teneurs élevées en protéines de bonne qualité, non dégradables dans le rumen, constituent une source très efficace de protéines pour les ruminants (36). Ceci est particulièrement vrai pour les farines fabriquées à partir de matière première très fraîche dans lesquelles ne sont incorporées, en cours du process que de faibles quantités de solubles protéiques (37).

D'une manière générale, la technique de préparation d'une farine de poisson destinée à l'alimentation animale comprend les étapes suivantes:

- \* cuisson à 95°C - 100°C dans un cuiseur à double paroi chauffée par vapeur
- \* passage dans une presse d'un séchoir cylindrique rotatif dans lequel est injecté de l'air à 600°C
- \* tamisage grossier
- \* broyage
- \* ensachage et pesée

Une phase liquide est récupérée en deux points de la chaîne de fabrication: d'abord entre le cuiseur et la presse puis à la sortie de la presse. Le traitement de cette phase est particulièrement important et conduit à l'obtention d'huile de poisson par centrifugation.

Cette huile constitue une matière première pour diverses industries:

- industrie de la margarine
- industrie de la vitamine A et B
- industrie du vernis et de lubrifiants

Constituants (% en poids)	Farine du sud Américain	Farine du rejet de la morue	Farine du hareng scandinave	caséine (39)
Matière sèche	90,0	91,5	92,0	93,0
Cendres	17,7	21,8	11,2	4,3
Protéines	66,2	65,2	75,8	86,9
Graisses	5,8	6,3	6,9	1,0

Tableau (I.5) " Compositions des farines de poisson comparée à celle de la caséine en tant qu'additif alimentaire" (38).

## I-2-6 Fabrication de surimi

Le surimi industriel est une pâte semi-finie se présentant sous forme d'une masse protéique humide, sucrée et presque sans saveur de poisson. Il est fabriqué à bord des bateaux de pêche et est conservé à (-25°C) après lavage intensif et traitement aux cryoprotecteurs (40).

La figure (I.11) montre les différentes étapes de fabrication du surimi industriel. Cette technologie est très développée au Japon en Corée et aux Etats-Unis. Elle consiste à préparer une pâte de poisson après broyage et lavage répétés de la chair d'espèces à faible valeur commerciale.

Les lavages successifs ont pour but d'éliminer les composés aromatiques, le sang, les lipides, les pigments, les enzymes (protéases) et les protéines sarcoplasmiques solubles qui sont défavorables à la gélification mais ils consomment une grande quantité d'eau se traduisant par des rejets fortement polluants.

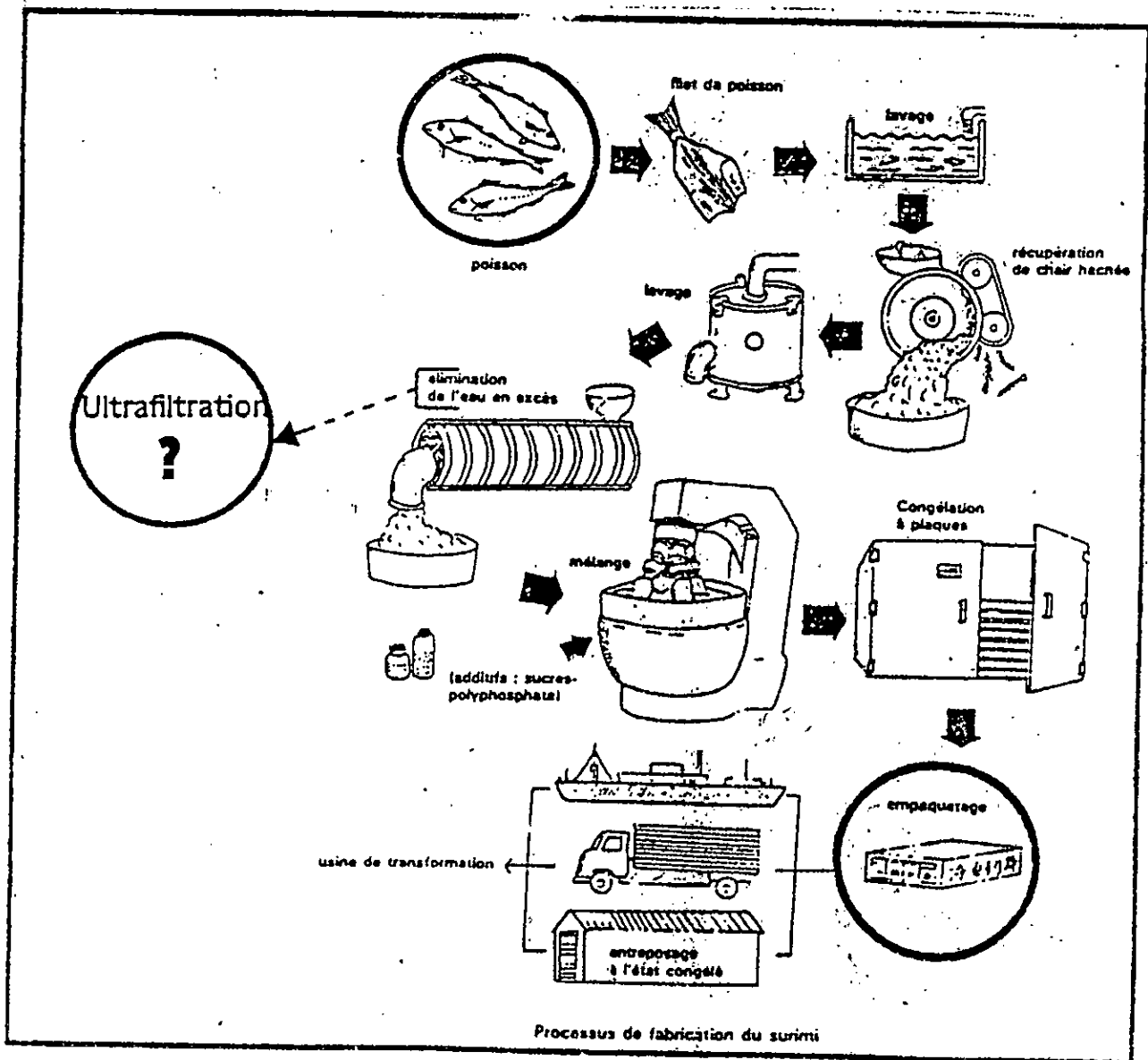


Figure (I. 11) " Processus de fabrication de surimi " ( 41)

### I-3 INDUSTRIE HALIEUTIQUE EN ALGERIE

En Algérie, malgré les grandes possibilités d'exploitation qu'offrent nos 1200 Km de côtes, l'industrie halieutique reste un secteur peu développé. Le tableau (I.6) indique l'activité halieutique en Algérie.

Espèces	Secteur privé	Secteur publics
Blancs	1659	13
Bleus	3769	93
Total	5428	106

Tableau (I.6) " Production halieutique en tonnes en Algérie, 1990 " (42).

On remarque la faiblesse de la production du secteur public qui est due à l'exploitation irrationnelle des cinq unités de pêche dont quatre sont en activité partielle et une autre non fonctionnelle durant toute l'année.

D'autre part, en Algérie, il existe huit conserveries étatiques et quelques entreprises privées de moindre importance.

Les conserveries étatiques sont situées comme suit:

Ghazaouet, Beni-saf, Oran, Ténès, Jijel, Khemisti, Collo, Dellys. La plupart d'entre elles traitent l'anchois, la sardine ou le thon. Ce sont, en général, des industries traditionnelles qui emploient une main d'oeuvre peu qualifiée.



Le tableau (I.7) indique l'ordre de grandeur de la production nationale par espèces durant toute l'année.

### I-1-3 Présentation de l'usine de Dellys

---

La conserverie de Dellys assure la production des conserves de thon et de sardine, sa production théorique est de 10 tonnes par jour. Ces taux n'ont, cependant, jamais été atteints jusqu'à présent et ceci en raison du manque de matière première et d'eau. En effet, la production de conserves de sardine est dépendante des quantités pêchées localement. Quant au thon, il est importé. Le rendement est donc de l'ordre 30% à 40% de la production théorique.

Les différentes étapes de la fabrication des conserves ( cas de la sardine ) sont présentées sur la figure (I.12).

Il est important de signaler la forte consommation de la conserverie en eau, en effet le rejet solide est entraîné par pression d'eau; cette opération nécessite environ 15 m<sup>3</sup> d'eau par jour.

Enfin, On estime que 25% du poids de la matière première est perdu sous forme de rejet solide justifiant ainsi amplement la nécessité de valoriser ces rejets. De plus, ces derniers sont rejetés directement dans la nature causant ainsi un dégagement d'odeur très désagréable et provoquant une pollution du port de Dellys. D'où l'impact écologique sur le site qu'entraînerait une valorisation de ces rejets.

Espèces	Poisson	Poisson	Crustacés	Espadon	Total
Mois	blanc	bleu			
Jan.	596,85	3641,45	220,80	30,50	4489,61
Fev.	689,62	3963,99	222,16	35,92	7911,70
Mars	770,60	3782,33	204,28	33,84	5791,00
Avr.	954,15	4310,63	343,99	26,12	5634,90
Mai	1157,20	9806,66	275,53	31,80	11271,19
Juin	731,37	7156,94	279,69	38,06	8206,08
Juil.	929,70	7479,37	236,47	38,16	8683,67
Aout	671,56	8921,27	282,42	52,78	9928,05
Sept.	905,55	7216,80	211,13	46,84	8380,32
Oct.	993,66	7000,38	112,44	32,04	8138,54
Nov.	806,80	6583,94	103,80	63,70	7558,25
Dec.	714,55	4166,22	142,02	41,87	5064,67
Total	9921,63	78030,03	2634,65	473,65	91060,07

Tableau (I.7) " Production nationale par espèces et par mois durant l'année 1990 en tonne" (42).

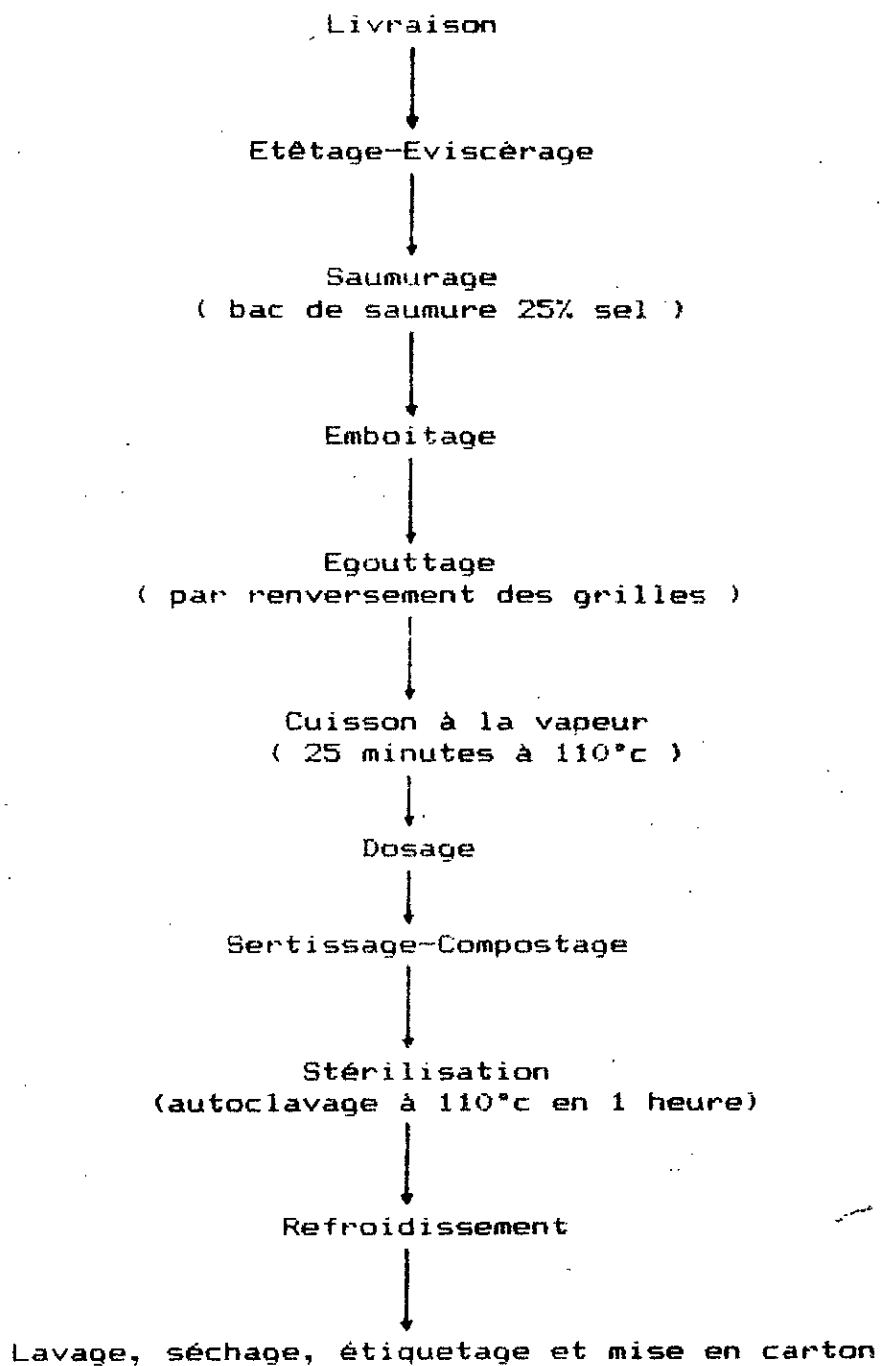


Figure (I.12) " Chaîne de production de conserves à l'usine de Dellys ".

## *Partie II*

*Etude Expérimentale*

## II-1 ETUDE DU REJET

Le rejet solide de l'industrie de transformation du poisson consiste en un mélange complexe de déchets issus des chaînes de nettoyage et d'évidage des poissons (têtes, viscères, arêtes et espèces pélagiques) présentant une valeur nutritionnelle importante.

Dans ce sens, des analyses chimiques et microbiologiques du rejet de la poissonnerie de Dellys (cas de la sardine) seront effectuées dans cette partie.

### II-1-1 Analyses chimiques

Les paramètres chimiques déterminés au cours de cette étude sont inspirés en grande partie du travail réalisé par

Mackie et Ritchie (43) lors de l'analyse chimique d'un rejet solide de poisson blanc.

Les paramètres chimiques retenus lors de notre étude sont présentés brièvement ci-dessous:

- a) Humidité: par passage à l'étuve (105°C) durant 24 heures.
- b) Cendres: par incinération du résidu sec dans un four à moufle (550°C) durant 24 heures.
- c) Graisse: le dosage de la graisse se fait par la méthode de détermination de la partie extractible de la matière grasse libre du déchet (44). Le principe de la méthode est basé sur l'extraction de la matière grasse libre avec de l'hexane ou de l'éther de pétrole pendant quelques heures (6 à 8 h). Après extraction, le

solvant est éliminé par évaporation ensuite séchage du résidu à l'étuve puis pesée après refroidissement à température ambiante dans le dessiccateur.

La teneur en matière grasse libre, en pour cent en masse de l'échantillon est égal à:

$$(M_1 - M_0) \cdot 100/E$$

M<sub>0</sub> : masse de la fiole et des régularisateurs d'ébullition de l'appareil d'extraction

M<sub>1</sub> : masse de la fiole, des régularisateurs et de la matière grasse après séchage

E : masse de la prise d'essai

#### d) Protéines:

le dosage de l'azote total est effectué par la méthode Kjeldahl (45), (46) ayant pour principe la destruction de la matière organique par ébullition en présence de l'acide sulfurique et la transformation des matières organiques azotées en ammonium.

L'alcalinisation de la solution obtenue transforme l'ammonium en ammoniaque qu'on entraîne par un courant de vapeur d'eau et que l'on dose par acidimétrie.

La quantité en protéines de l'échantillon Q<sub>p</sub> s'exprime par la relation suivante:

$$Q_p = Q_n (6,25)$$

Qp : quantité en protéines de l'échantillon

Qn : teneur en azote Kjeldahl de l'échantillon

6,25: correspond à la teneur en azote protéique  
des protéines animales

Dans le but d'aboutir à des résultats représentatifs, l'analyse de chaque paramètre est réalisée en double afin de présenter une composition moyenne du rejet de la conserverie de Delliys.

## II-1-2 Analyses microbiologiques

---

Au niveau de la conserverie de Dellys le vidage du poisson se fait à l'air libre, d'où l'exposition du rejet à une contamination microbienne, ce qui nous a conduit à effectuer les tests suivants:

- dénombrement des germes totaux
- recherche des germes témoins de contamination fécale
  - \* coliformes totaux et fécaux
  - \* streptocoques
  - \* staphylocoques
  - \* clostridium sulfito-réducteurs
- recherche de salmonelles

### II-1-2-1 Prélèvement

Le rejet est prélevé dans un flacon stérile en conditions aseptiques et transporté dans une caisse glacière assurant une température inférieure à 4°C. L'analyse est effectuée dans un délai maximal de huit heures après prélèvement (47).

### II-1-2-2 Préparation d'échantillons

Cette préparation nécessitera l'ouverture aseptique du flacon de prélèvement, ensuite une homogénéisation consistant à un broyage vigoureux du rejet dans un mixer jusqu'à l'obtention d'une pâte liquide.



### II-1-2-3 Standardisation de la suspension mère

Trois solutions mères sont obtenues par dilution du rejet dans l'eau physiologique stérile.

Les rapports (volume de la pâte/volume d'eau physiologique) utilisés sont: 1/1, 1/2, 1/3.

A partir de chacune de ces solutions des dilutions de dix en dix seront effectuées, à partir  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$ .

On réalise des ensemencements en profondeur en utilisant la gélose nutritive en surfusion ( $40^{\circ}\text{C} - 45^{\circ}\text{C}$ ) comme milieu de culture pour la flore totale.

On retient pour la suite des analyses la solution-mère dont les dilutions donnent un nombre de colonies compris entre 30 et 300.

### II-1-2-4 Tests microbiologiques

#### a) Coliformes totaux et E. Coli

Les caractères généraux des coliformes appartenant à la famille des entérobactériaceae sont les suivantes (48):

- \* fermentation du glucose
- \* aérobies facultatifs
- \* réduction des nitrates en nitrites
- \* développement facile sur milieu ordinaire.

#### Mode opératoire

\* Test présomptif: le milieu choisi est le bouillon lactosé au bromocrésol pourpre avec cloche pour détecter l'utilisation du lactose.

Deux tubes sont ensemencés par 1 ml de chaque dilution et incubés à  $30^{\circ}\text{C}$  durant 24 h à 48 h.

\* Test confirmatif: c'est la recherche d'E. Coli qui est thermophile  
le milieu choisi est l'eau peptonée exempte  
d'indole, l'ensemencement se fait à partir  
des tubes positifs du test présomptif.

Deux tubes sont ensemencés par 1 ml, puis incubés à 44°C durant 24 h.

#### b) Stréptocoques fécaux

Les caractères généraux des stréptocoques appartenant à la  
famille des stréptococcaceae sont les suivants (49):

\* Catalase - (pas de dégagement gazeux par la culture  
au contact d'eau oxygénée à 10%)

\* Anaérobie facultatif

#### Mode opératoire

\* Test présomptif: deux tubes du milieu Rothe S/C sont ensemencés  
par 1 ml de chaque dilution, puis incubés à 37°C  
durant 24 h .

\* Test confirmatif: à partir de chaque tube positif du test précédent  
on ensemence un tube du milieu Eva-Litsky par  
1 ml; incubation à 37°C durant 24 h.

#### c) Staphylocoques

Les caractères généraux des staphylocoques appartenant à la  
famille des micrococcaceae sont les suivants (49):

\* Catalase +

\* aérobie et anaérobies facultatifs

#### Mode opératoire

Le milieu Chapman-Mannitol est liquéfié, ensuite coulé en boîtes de pétri. Après refroidissement, on déposera 1 ml de chaque dilution à la surface du milieu.

L'incubation est réalisée à 37°C durant 48 h.

#### d) Clostridium sulfito-réducteur

Parmi les sulfito-réducteurs, on a essentiellement le genre clostridium appartenant à la famille des bacilliaceae dont les caractères généraux sont les suivants:

- \* Anaérobies stricts
- \* Pathogène
- \* Catalase -

#### Mode opératoire

Introduire 1 ml de chaque dilution dans un tube à hémolyse stérile, le maintenir à 80°C pendant 10 minutes, dans le but de détruire les formes végétatives et exactement la sélection des formes sporulées. Refroidir les tubes et déposer 1 ml de chaque tube dans deux boîtes de pétri, faire couler la gélose viande-foie en surfusion (40°C - 45°C) sulfitée et additionnée d'alun de fer auparavant.

Homogénéiser par des mouvements circulaires lents, après refroidissement, ajoutez une deuxième couche de gélose viande-foie pour assurer les conditions anaérobies stricts.

Incubation à 37°C durant 48 h.

#### e) Salmonelles

Elles appartiennent à la famille des entérobactériaceae

#### Mode opératoire (50)

Homogénéiser dans un vase stérile 25 g de rejet en présence de 225 ml de bouillon d'enrichissement (bouillon au sélénite), l'incuber à 37°C durant 24 h.

Effectuer un repiquage du milieu d'enrichissement vers le milieu d'isolement (milieu SS); Incubation à 37°C durant 24 h.

#### II-1-2-5 Etude quantitative

L'évaluation du nombre de micro-organismes présents dans le rejet de la poissonnerie à un intérêt considérable.

Cependant, il existe plusieurs techniques de numération:

- . numération en milieu liquide
- . numération en milieu solide

Ces techniques sont présentées en détail dans la partie annexe.

## II-2 PARTIE BIOCHIMIQUE

Notre étude consiste à produire des acides aminés et des peptides à partir du rejet solide de poissonneries pour enrichir l'alimentation animale. Cependant, l'utilisation d'une protéase de type produit pharmaceutique très coûteuse limite l'exploitation de ce processus. En revanche, la préparation d'une enzyme brute "pepsine" à partir de l'estomac de mouton permettrait d'envisager l'exploitation d'un tel procédé.

Il s'agit donc, dans une première étape, de préparer une pepsine brute, bon marché et par la suite de tester sa capacité à dégrader les protéines du rejet solide de la conserverie de Dellys.

### II-2-1 Production de la pepsine brute

---

La méthode de préparation de la pepsine brute est en grande partie inspirée du protocole expérimental développé par Pigott et Liu (51).

Aussitôt après l'égorgeage du mouton, l'estomac est vidé de son contenu puis bien nettoyé à l'eau du robinet.

La muqueuse est décollée intacte de la caillette, puis hachée dans un moulin à viande. l'ensemble est enfin congelé à (- 20°C) dans des sacs en plastique pour toutes utilisations ultérieures.

\* Poids sec de la muqueuse

Le taux d'hydratation des muqueuses étant différent, nous devons donc déterminer le poids sec de chacune d'elles avant son utilisation. Ce paramètre sera utilisé comme référence pour évaluer les quantités de muqueuse utilisée lors de l'essai d'activité de l'enzyme et lors de l'essai d'hydrolyse.

Le poids sec est exprimé en (%) et se calcule à l'aide de la relation suivante:

$$X (\%) = (M2 / M1) \cdot 100$$

M1 : le poids humide de la muqueuse

M2 : le poids sec de la muqueuse ( après 24 h à 105°C )

\* Autodigestion de la muqueuse

L'autodigestion de la muqueuse stomacale de mouton s'effectue en milieu acide pour activer le pepsinogène en pepsine brute. Cette opération est affectée par divers paramètres. Dans ce sens, nous avons étudié les plus importants tels que le pH et la durée de préparation de l'enzyme.

1) pH de préparation de la pepsine brute

L'opération d'autodigestion de la muqueuse est effectuée de la manière suivante:

- quatre masses de 50 mg de muqueuse en poids sec sont décongelées et introduites dans une série de quatre bechers (50 mg/becher) et ensuite acidifiés avec 100 ml de HCl (0,01 N).
- Le pH est ajusté respectivement pour chacun des bechers à une valeur déterminée : 1,0 : 1,5 : 1,75 : 2,0 durant les trente premières minutes de l'agitation.

- après six heures d'agitation, chacun des quatre échantillons ainsi obtenu est filtré à travers un tissu afin de retenir les boues formées.
  - les solutions, ainsi filtrées, sont mélangées à des solutions de HCl (0,01 N) pour un volume final de 500 ml.
- Les quatre solutions pepsiques brutes, ainsi obtenues sont stockées à (4°C). Les essais d'activité sont effectués durant la semaine.

## 2) Temps de préparation de la pepsine brute

L'opération d'autodigestion s'effectue comme suite:

- une part de muqueuse en poids sec (250 mg) est mélangée à 100 ml de HCl (0,01 N).
- le pH du milieu est ajusté à la valeur optimale déterminée précédemment, durant les trente premières minutes de l'agitation. Ensuite maintenir une agitation rigoureuse durant 45 h et les essais d'activité sont effectués durant ce temps.

## II-2-3 Essais d'hydrolyse

L'étude expérimentale de l'hydrolyse enzymatique du rejet consiste à suivre en fonction du temps, l'évolution du mélange réactionnel complexe en opérant aux conditions optimales préalablement déterminées.

Le rendement d'hydrolyse est évalué par quantification d'acides-aminés et de peptides solubles dans l'acide trichloroacétique.

### \* Méthode

Le protocole expérimental suivi pour mener à bien nos hydrolyses est le suivant:

- 100 g de rejet broyé sont mélangés à 100 ml d'eau, après homogénéisation, le pH du mélange est ajusté à la valeur optimale d'hydrolyse avec du HCl concentré. Ensuite, la solution est ramenée à la température optimale dans un bain marie en quelques minutes.
  - la solution pepsique préalablement chauffée à la même température est versée rapidement dans le mélange eau-rejet et une agitation modérée est maintenue durant la période d'hydrolyse.
  - des parties aliquotes de 20 ml sont soutirées du mélange réactionnel à des intervalles de temps fixés, ensuite mélangés à 10 ml d'acide trichloroacétique (20%), après 10 à 15 minutes l'ensemble est filtré à travers du papier Whatman n°3.
- Les acides-aminés et les peptides libérés dans le filtrat sont quantifiés par la méthode du Biuret.



## II-2-4 Détermination des paramètres cinétiques

---

L'étude expérimentale de la cinétique d'hydrolyse est réalisée par quantification de peptides et d'acides-aminés dans le mélange réactionnel en fonction du temps et cela dès les premières minutes de la réaction.

### \* Mode opératoire

---

L'étude cinétique a été menée en suivant ce protocole:

- préparer une solution pepsique brute (0,5 mg/ml) de muqueuse en poids sec .
- préparer des solutions de substrat en ajoutant différentes quantités de rejet broyé à 100 ml d'eau distillée.

Les concentrations en substrat étudiées sont:

50 g/l ; 100 g/l ; 200 g/l ; 300 g/l ; 400 g/l

- à  $t = 0$ , la réaction d'hydrolyse est déclenchée dans les conditions opératoires optimales préalablement déterminées.
- Des parties aliquotes de 10 ml sont soutirées du mélange réactionnel à des intervalles de temps fixés en minute, 6 ml d'acide trichloroacétique (20%) sont ajoutés à l'aliquote pour stopper la réaction. Après 5 à 10 minutes, l'ensemble est filtré à travers du papier Whatman n°3.
- quantifier les peptides et les acides-aminés du filtrat par la méthode du Biuret.
- Pour chaque concentration du substrat étudiée, on tracera le graphe donnant l'évolution de la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps en minutes.

On trace, ensuite, les tangentes à l'origine pour chaque courbe dont la pente représentera la valeur de la vitesse initiale  $V_i$  de la réaction. Ces valeurs permettent de tracer par la suite le graphe:

$$1/V_i = f(1/S_0)$$

$S_0$ : taux de protéines dans le mélange réactionnel à l'état initial,  $t = 0$

- à titre d'exemple, pour la concentration en substrat de 100 g/l, nous avons dilué 10 g de rejet en poids humide dans 100 ml d'eau distillée. Ensuite, nous avons ajouté 100 ml de solution pepsique, d'où un volume total du mélange réactionnel de 250 ml.

En saison d'été, le rejet contient 14% de protéines, alors, les 10 g contiendront 1,4 g de protéines.

Enfin, par un simple calcul, on trouve  $S_0 = 5,6 \text{ g.prot./l.}$

## II-2-5 Installation semi-pilote

---

Une fois, l'optimisation de l'hydrolyse du rejet solide est réalisée à l'aide d'une enzyme protéolytique " pepsine " préparée au sein même du laboratoire à partir de l'estomac de mouton, nous nous sommes intéressés à l'extrapolation de ce processus à l'échelle semi-pilote. Cette étape est nécessaire avant d'envisager d'opérer dans des conditions pilotes pour aboutir à l'échelle industrielle.

Pour cela, nous avons mené une hydrolyse à l'échelle semi-pilote à l'aide d'un réacteur d'une capacité de vingt litres décrit ci-dessous:

### .) Description du réacteur enzymatique

Le réacteur biologique est en verre rigide de forme cylindrique à fond plat comportant les équipements suivants:

- les appareillages de la régulation de température composés d'un thermomètre à contact de la société PROLABO, sur lequel on consigne la température désirée et des résistances de chauffage de puissance 100 W reliées au thermomètre à contact.
- les appareillages du mélangeur composés d'un agitateur électrique du fabricant IKA et d'une tige à pâles permettant, ainsi, d'homogénéiser le mélange réactionnel.
- les appareillages du chauffage d'arrêt de l'hydrolyse enzymatique composés de résistances de chauffage de 1000 W du fabricant PROLABO.

Ces dernières permettent la désactivation de l'enzyme à 100°C

Toute fois, le réacteur enzymatique n'est qu'une étape dans le procédé de production d'un hydrolysats à partir du rejet de la poissonnerie que nous proposons. Ce dernier est représenté brièvement sur la figure (II.1)

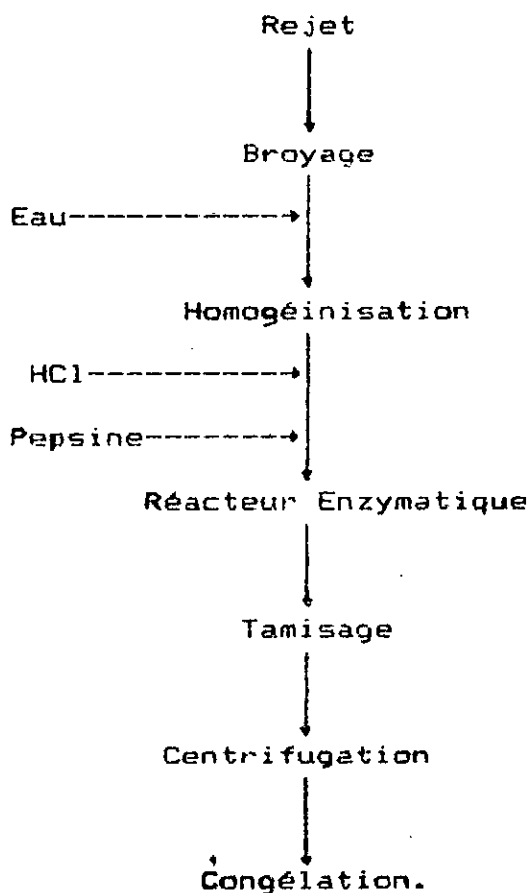


Figure (II.1) " Diagramme - valorisation du rejet solide de poissonnerie par hydrolyse enzymatique "

## Description des étapes du procédé

---

La description des diverses étapes est donnée comme suite:

### 1) Matière première

Le rejet solide de la poissonnerie de Bellys, cas de la sardine, est utilisé comme matière première dans notre processus.

### 2) Broyage

Le broyage du rejet est effectué dans un moulin à viande, le but de cette étape est d'augmenter la surface de contact entre les particules du substrat et l'enzyme durant l'hydrolyse.

### 3) Pepsine

La solution pepsique est préparée par autodigestion de la muqueuse stomacale de mouton en milieu acide durant un temps optimum.

A la fin, le pH de la solution ainsi obtenue est ajusté à pH optimal d'activité et ensuite stockée à (4°C).

### 4) Processus enzymatique

- cinq kilogrammes de rejet finement broyé sont dilués avec une quantité d'eau déterminée, le mélange est homogénéisé durant deux minutes.

L'homogénéisation intègre parfaitement le rejet et l'eau et permet une vitesse de réaction importante. Toute fois, signalons qu'une homogénéisation trop importante augmente l'émulsification des lipides et des protéines, ce qui freine l'activité enzymatique et abaisse le rendement d'hydrolyse.

- le pH du milieu est ajusté avec du HCl concentré à pH optimal de même la température est ramenée à sa valeur optimale.
- la solution pépsique préalablement ramenée aux conditions optimales d'hydrolyse est ajoutée rapidement dans le réacteur.

Au début de la réaction le mélange réactionnel est très épais, comme une pâte et l'agitation arrive difficilement à l'obtention d'un mixage parfait qui est nécessaire pour distribuer l'enzyme à travers l'ensemble du volume du réacteur.

Toute fois, après une demi-heure d'hydrolyse, le mélange devient moins visqueux et l'agitation travaille dans de meilleures conditions.

Le taux d'hydrolyse est suivi en fonction du temps en quantifiant les peptides et les acides-amino libérés dans le réacteur en utilisant toujours la méthode de dosage des protéines " Biuret".

A la fin de la réaction, la mise en marche des résistances du chauffage d'arrêt permet d'atteindre les 100°C au bout de quelques minutes dans le but de désactiver l'enzyme et, de plus, d'éliminer presque totalement les micro-organismes contenus dans l'hydrolysate.

#### 5) Tamisage

Après refroidissement de l'hydrolysate, il est soutiré du réacteur pour subir l'opération de tamisage.

L'hydrolysate traverse un tamiseur grossier (250 µm) afin de retenir les grosses fractions tels que:

les arêtes, la peau, les écailles...

#### 6) centrifugation

L'hydrolysate débarassé des grosses fractions, contient toujours une quantité importante de lipides qui seront facilement séparées des protéines par simple centrifugation. Cette opération est réalisé dans une centrifugeuse BECKMAN modèle J2-21 en opérant sous-vide à une vitesse  $v = 12.000$  tr/min durant 15 minutes.

#### Répétabilité des résultats

---

Dans le but de tester la répétabilité de nos résultats expérimentaux, on a effectué l'ensemble des manipulations au moins, en double. Lors de la présentation de nos résultats, nous avons préféré tracer des courbes moyennes tout en mentionnant pour chaque point de ces courbes l'écart obtenu lors de deux manipulations.

De même, dans le souci d'obtenir des résultats proche des conditions industrielles, nous avons utilisé, lors du test de la répétabilité, différentes muqueuses de mouton obtenant ainsi différents échantillons d'enzymes de pepsine brute.

### III-1 ANALYSES CHIMIQUES

Les résultats expérimentaux de l'analyse chimique du rejet sont reportés sur le tableau (III.1).

Constituants (% en poids)	Date d'échantillonnage		
	Juin 1991	Nov. 1991	Mars 1992
Humidité	79,5	80,4	80,2
Cendres	5,2	4,2	4,9
Graisse	1,5	4,0	1,0
Protéines	14,0	13,0	14,0

Tableau (III.1) " Composition moyenne du rejet solide de la poissonnerie de Delys ".

On remarque la variation saisonnière du taux de graisse du rejet solide de la poissonnerie. Ceci a été constaté par I.M.Mackie (1) qui donne l'exemple du " Maquereau " dont la teneur en graisse présente moins de 1% de son poids au printemps et excède les 35% durant les autres saisons.

Le taux de protéines est relativement élevé en comparant à celui donné par la bibliographie (tableau I.1), ce qui indique la présence de proportions comestibles dans le rejet qui est une conséquence directe de la main d'oeuvre non qualifiée.



### III-2 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Les résultats obtenues lors de ces analyses sont présentées ci-dessous:

- \* Coliformes totaux: le test positif est reconnu par un virage du milieu (souvent au jaune) et dégagement gazeux suffisant (1/10<sup>ème</sup> du volume de la cloche) (53).
- \* E. Coli: quand le milieu de culture devient trouble, on ajoutera 5 à 6 gouttes de réactif de Kovacs qui donnera l'apparition d'un anneau en surface, d'ou production d'indole (54).
- \* Staphylocoques: apparition de colonies entourées d'un halo clair-jaunâtre résultant de l'hydrolyse du mannitol.

#### Flore totale

- pour les germes incubés à 22°C durant 72 h, on obtient 233.000 ger/ml pour la suspension mère dont le rapport (volume de la pâte/volume d'eau physiologique) = 1/3 on déduit, enfin, le nombre de germes par gramme de rejet égale à:  
54186 ger/g. de rejet
- pour les germes incubés à 37°C durant 24 h, on obtient 57.00000 ger/ml pour la même suspension mère. De même, on déduit, le nombre de germes par gramme de rejet égale à:  
1325.000 ger/g. de rejet

- Le dénombrement des germes totaux révèle une contamination très poussée du rejet solide de la poissonnerie, que ce soit par les bactéries de l'environnement (54186 ger/g. de rejet) ou par les bactéries rencontrées dans les corps des humains et des animaux (1325.000 ger/g. de rejet).
- Quant aux autres micro-organismes, les plus importants sont:
  - \* les staphylocoques dus à leur pathogénicité
  - \* les coliformes fécaux pouvant provoquer des intoxications alimentaires (55).
  - \* les salmonelles sont des parasites de l'intestin de l'homme et de l'animal; malheureusement, le test microbiologique de ces dernières n'a pas été réalisé pour des raisons pratiques.

A partir du tableau (III.2), nous constatons, d'une manière générale, que le nombre de micro-organismes présents dans le rejet de la poissonnerie de Dellys subit une variation presque saisonnière vue la forte présence de la plupart des bactéries durant la saison chaude assurant des températures favorables au développement normal de ces dernières.

Par exemple, le nombre d'E.Coli est de l'ordre de 1628 germes par gramme de rejet en mois de juin, alors, qu'il est de l'ordre de 302 germes par gramme de rejet en mois d'avril.

Date de prélèvement	nombre de germes par gramme de rejet				
	Col. totaux	E.Coli	Strept. fécaux	Staphylo- coques	Clost. sulfito- réducteurs
05-06-91	4651	3023	5814	437	473
15-12-91	465	465	1395	204	186
22-12-91	582	/	302	930	174
28-02-92	1395	/	3023	558	744
26-04-92	1628	302	1163	837	349
11-05-92	1628	/	1395	418	581
17-05-92	2558	302	1395	1046	907
13-06-92	3023	1628	3023	542	567

Tableau (III.2) " Résultats expérimentaux des tests microbiologiques du rejet de la poissonnerie de Delliys ".

### III-3 VALORISATION DU REJET PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE

#### III-3-1 Production de la pepsine brute

##### III-3-1-1 Poids sec de muqueuses

La détermination du poids sec des différentes muqueuses nous a permis de constater que la valeur du rapport X (%) évolue de 20% à 25%. Cela est la conséquence de différents taux d'hydratation des muqueuses dus aux facteurs suivants:

- l'âge du mouton
- la manière de la préparation

Le tableau (III.3) présente les valeurs du rapport X (%) d'une partie de nos échantillons

X (%)	n° d'échantillon
20	1
22	2
23	3
25	4

Tableau (III.3) " Evolution du rapport X en %  
suivant les échantillons ".

### III-3-1-2 Autodigestion de la muqueuse

#### a) pH de la préparation de la pepsine brute

L'évolution des activités des solutions pepsiques brutes, préparées à différents pH, durant les huit jours de stockage à (4°C) est présentée sur la figure (III.1).

La solution pepsique préparée à pH = 1,0 présente la plus forte activité, en particulier, durant les trois premiers jours de la conservation à partir desquels son activité, exprimée en intensité (D.O), chute de 0,35 à 0,25 (valeurs moyennes) tandis que les activités des autres solutions pepsiques restent relativement stables durant toute la période de conservation. Par exemple, la solution préparée à pH = 1,5 son activité atteint une valeur maximale de 0,28 et une valeur minimale de 0,18 durant les huit jours de stockage.

Il sera, donc, plus intéressant, de préparer la pepsine brute à pH = 1,0 quand on l'utilisera au cours des trois premiers jours de sa conservation.

Des résultats similaires ont été obtenus par Pigott et Liu (51). En effet, lors de la préparation d'une pepsine brute à partir de l'estomac du porc, ces auteurs ont trouvé que la plus forte activité de l'enzyme était obtenue à pH = 1,0 et cela durant les dix jours de stockage à (4°C).

b) Temps de préparation de la pepsine brute

Les profils d'activité des deux pepsines brutes préparées respectivement à  $\text{pH} = 1,0$  et  $\text{pH} = 0,5$  sont montrés sur la figure (III.2) .

L'autodigestion de la muqueuse stomacale à  $\text{pH} = 1,0$  présente une activité plus élevée que celle à  $\text{pH} = 0,5$  et cela durant les 40 heures d'autodigestion. De plus, l'activité maximale est atteinte au bout de 12 heures et cela aussi bien pour la pepsine préparée à  $\text{pH} = 1,0$  que celle à  $\text{pH} = 0,5$ .

Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Pigott et Liu (51) où ils utilisent la muqueuse d'estomac de porc comme matière première.

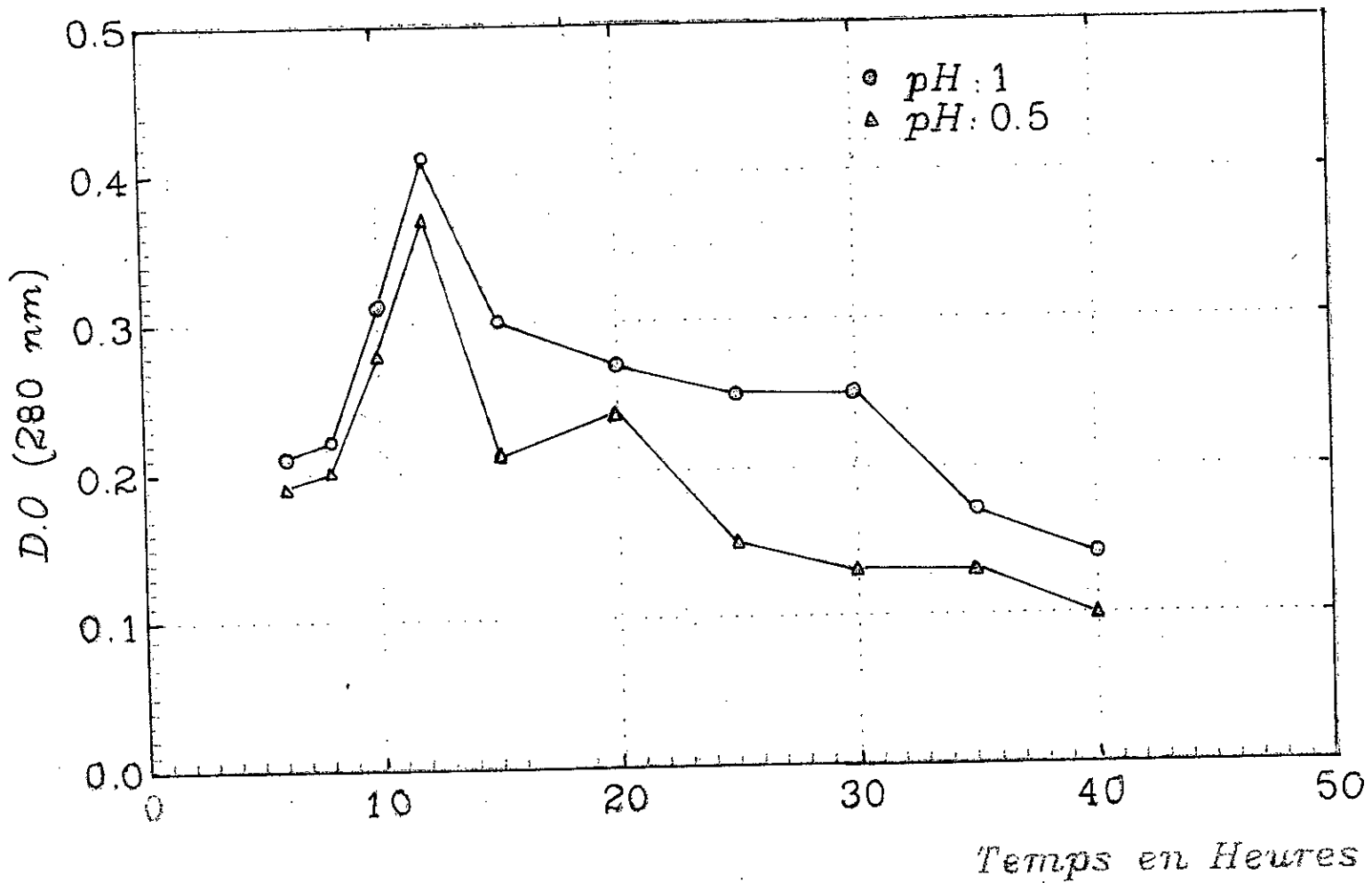


Figure (III. 2). " Comparaison des profils d'activité durant l'autodigestion de la muqueuse stomacale du mouton. essais à 20°C et pH 1,55 sur B. S. A (25 g/l) "

### III-3-2 Optimisation de l'activité de la pepsine brute

---

#### III-3-2-1 Temps d'incubation

La variation de l'activité de la pepsine brute en fonction du temps de contact entre l'enzyme et la protéine standard (B.S.A) est présentée sur la figure (III.3).

On constate qu'un temps d'incubation de l'ordre de dix minutes permet à l'enzyme d'hydrolyser le maximum de protéines.

Nous déduisons ainsi que l'optimum du temps de contact entre l'enzyme et le substrat correspond à la période de dix minutes.

#### III-3-2-2 pH d'activité

L'évolution de l'activité des pepsines (brute et commerciale) en fonction du pH du milieu réactionnel est présentée sur les figures III.4 et III.5 .

La pepsine commerciale est très active à pH = 2,0 cette valeur est déjà indiquée par le fournisseur. Quant à la pepsine brute la plus forte activité est obtenue dans la zone de pH (1,5 - 2,0) avec comme substrat la B.S.A. Cette dernière zone de pH se concentre sur une valeur proche du pH = 1,5, quand on utilise les protéines de poisson comme substrat. Au-delà de cette valeur optimale de pH, l'activité de la pepsine commence à chuter à des valeurs de pH situées entre 2,5 et 3,5. Ce résultat a déjà été obtenu par A.J.Corniche (56). La plupart des protéines activées et dénaturées sont hydrolysées au maximum à pH = 1,5 - 2,5.

Baker (57), note que les analogues des peptides composés de deux acides aminés aromatiques: Tyrosine et Phenylalanine sont hydrolysés rapidement à un optimum de pH = 1,8 - 2,0.



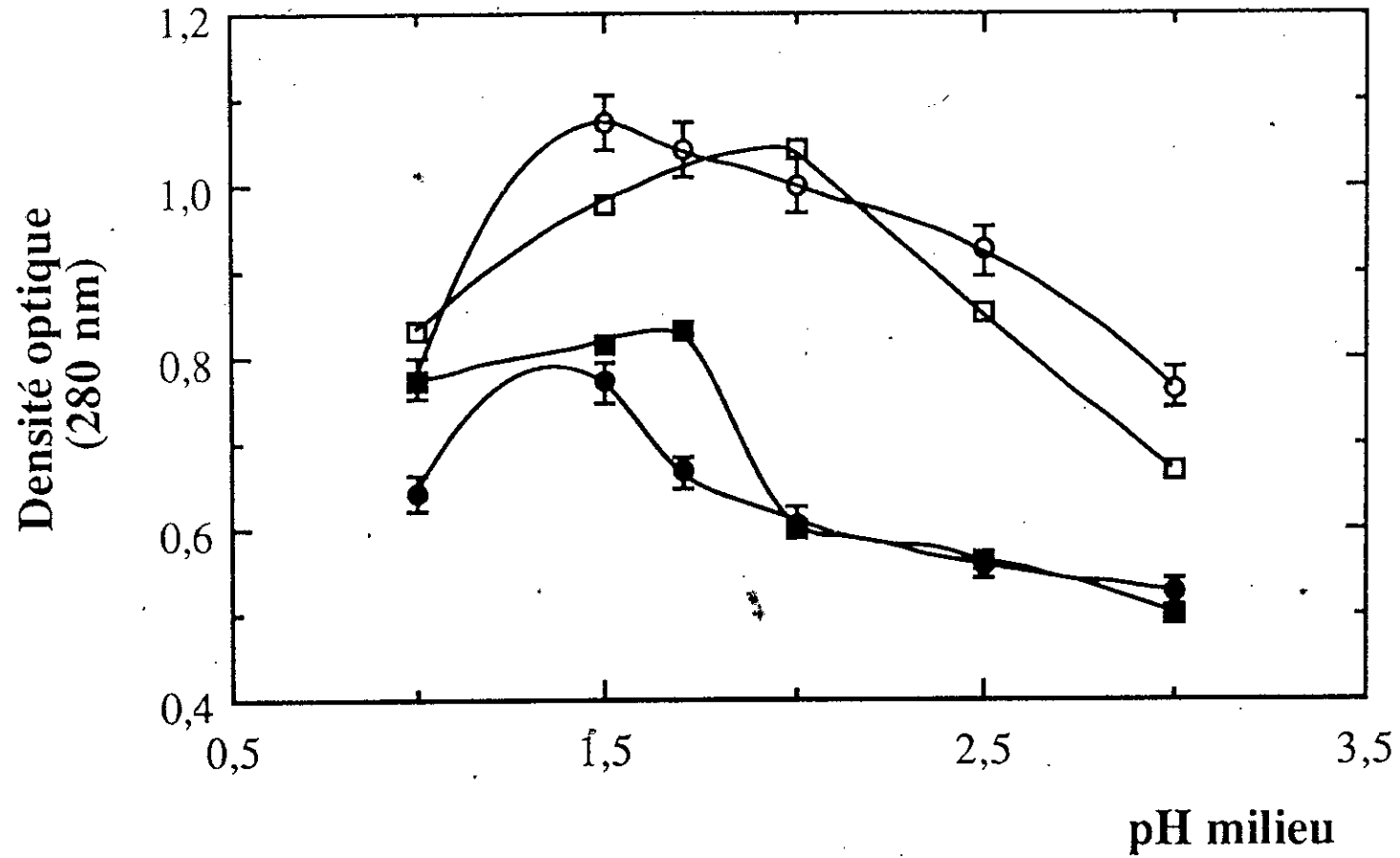


Figure (III.4) " Effet du pH sur l'activité de la pepsine à 25°C "

- 0,5 mg/ml muqueuse sèche sur protéines de poisson (17,5 g/l)
- 0,3 mg/ml " " " " " " (7 g/l)
- 0,5 mg/ml pepsine commerciale " " " " (17,5 g/l)
- 0,3 mg/ml " " " " " " (7 g/l)

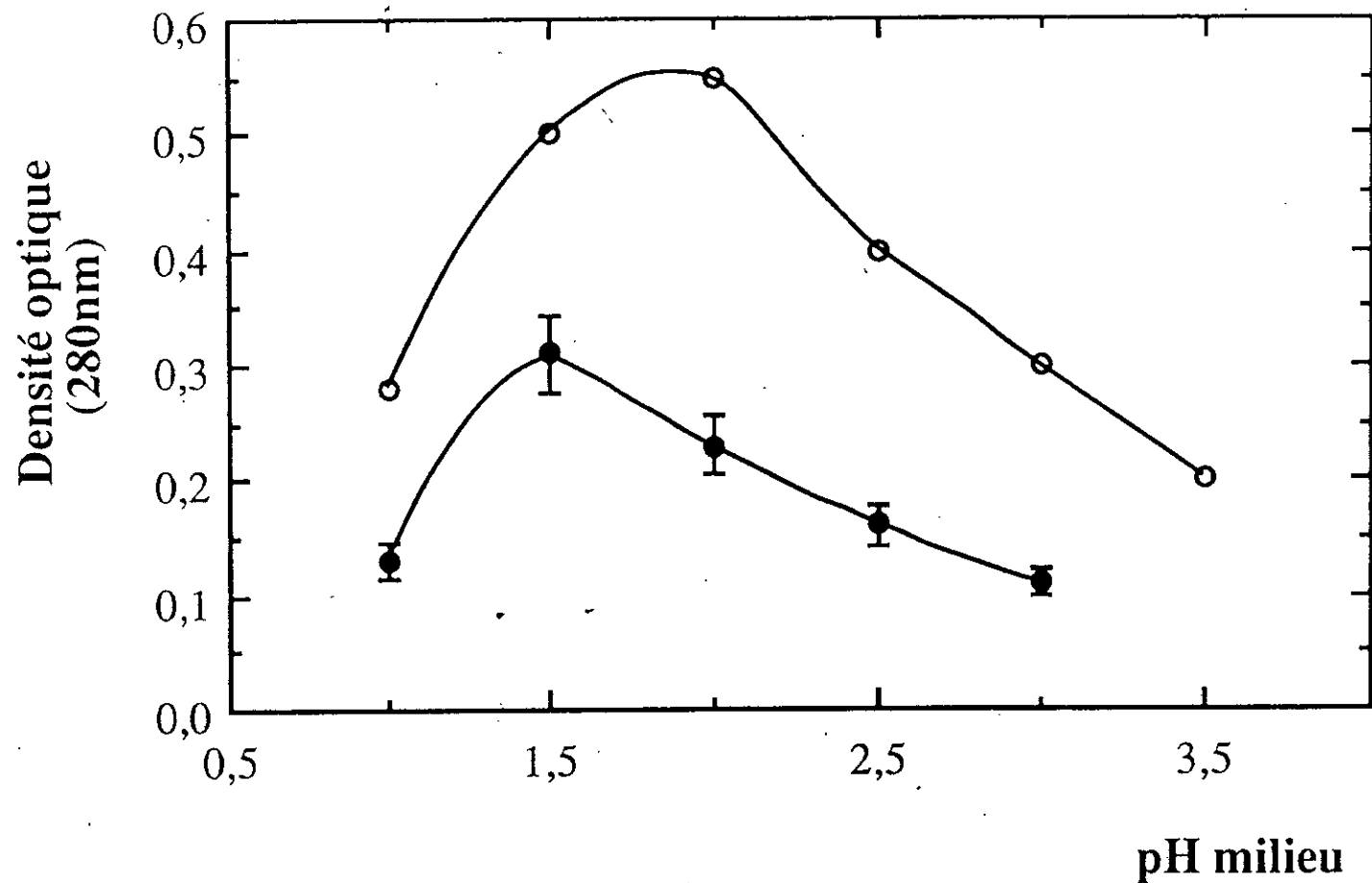


Figure (III.5) " Effet du pH sur l'activité de la pepsine brute".

Essai à 25 °c sur B. S. A (25 g/l)

- 0,5 mg/ml muqueuse sèche
- 0,1 mg/ml

### III-3-2-3 Température

L'évolution de l'activité des deux enzymes (pepsine brute et commerciale) en fonction de la température avec comme substrat la B.S.A est présentée sur la figure (III.6).

Des expériences ont été menées avec ces deux enzymes en utilisant cette fois-ci, le rejet de la poissonnerie comme substrat. Les résultats de ces manipulations sont reportés sur la figure (III.7) Nous constatons que pour l'ensemble des manipulations, reportées sur les deux figures préalablement citées, que la température influence considérablement les activités des enzymes utilisées et cela quelque soit le substrat.

La température optimale pour la pepsine commerciale est de l'ordre  $T = 37^{\circ}\text{C}$  et cela pour les deux substrats utilisés. Cette valeur est aussi indiquée par le fournisseur.

Quant à la pepsine brute, la plus grande activité est obtenue pour des valeurs de température comprises entre  $35^{\circ}\text{C}$  et  $45^{\circ}\text{C}$  avec comme substrat la B.S.A. Cette zone de température serait entre  $45^{\circ}\text{C}$  et  $50^{\circ}\text{C}$  quand on utilise les protéines de poisson comme substrat. Cela est mieux mis en évidence, sur la figure (III.8) où l'on présente l'évolution de l'activité de la pepsine brute en fonction de la température pour les deux substrats (B.S.A et protéines de poisson).

Ce décalage de domaine de la température optimale peut-être la conséquence directe d'une meilleure résistance des protéines brutes aux fortes températures par rapport à la protéine standard (5B).

Dans les deux cas la pepsine brute tend à être dénaturée au-delà de 55°C et son activité chute à des températures situées entre 65°C et 70°C.

Notons, enfin, qu'à des valeurs de températures comprises entre 20°C et 30°C, la variation d'activité est faible et reste relativement constante.

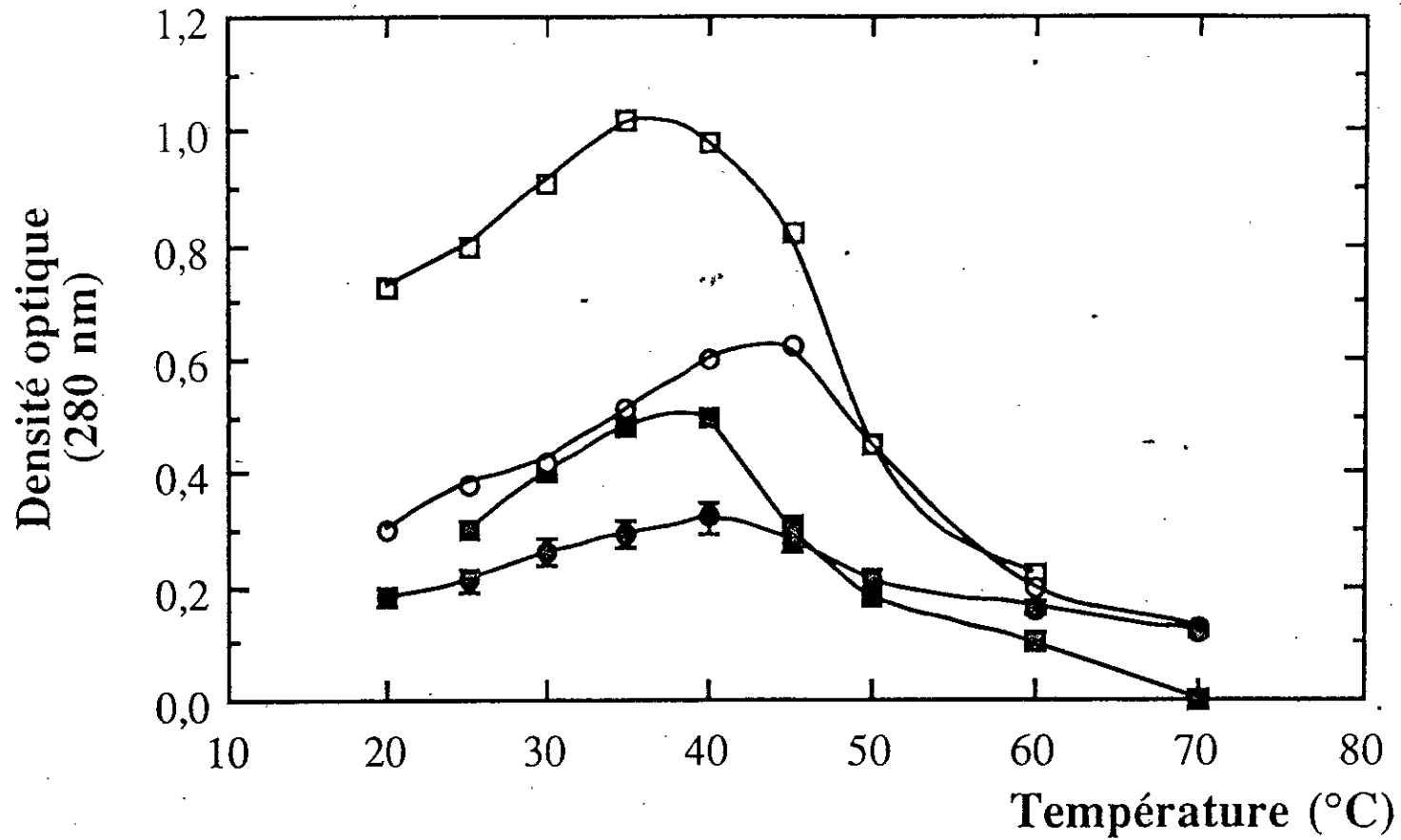


Figure (III.6) " Evolution de l'activité de la pepsine en fonction de la température sur B. S. A (25 g/l) "

Essai à pH:1,7 pour la brute et pH:2 pour la commerciale

□ 0,5 mg/ml pepsine commer.      ○ 0,5 mg/ml muqueuse sèche  
 0,1 mg/ml      "      "      ● 0,1 mg/ml      "      "

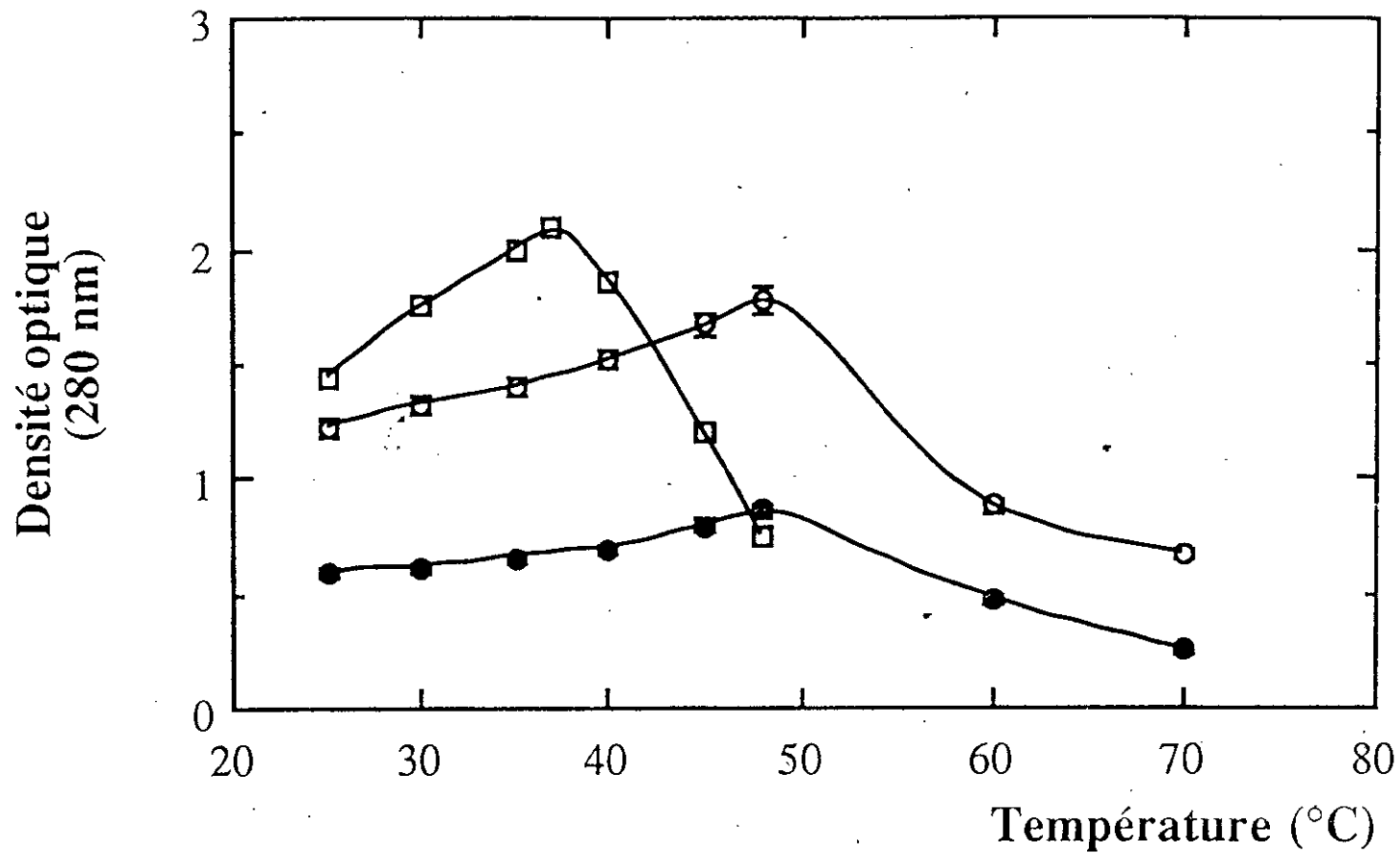


Figure (III.7) " Evolution de l'activité de pepsine avec la température ".

- 0,5 mg/ml enzyme commer. sur protéines de poisson (17,5 g/l)
- 0,5 mg/ml muqueuse sèche " " "
- 0,3 mg/ml " " " " "

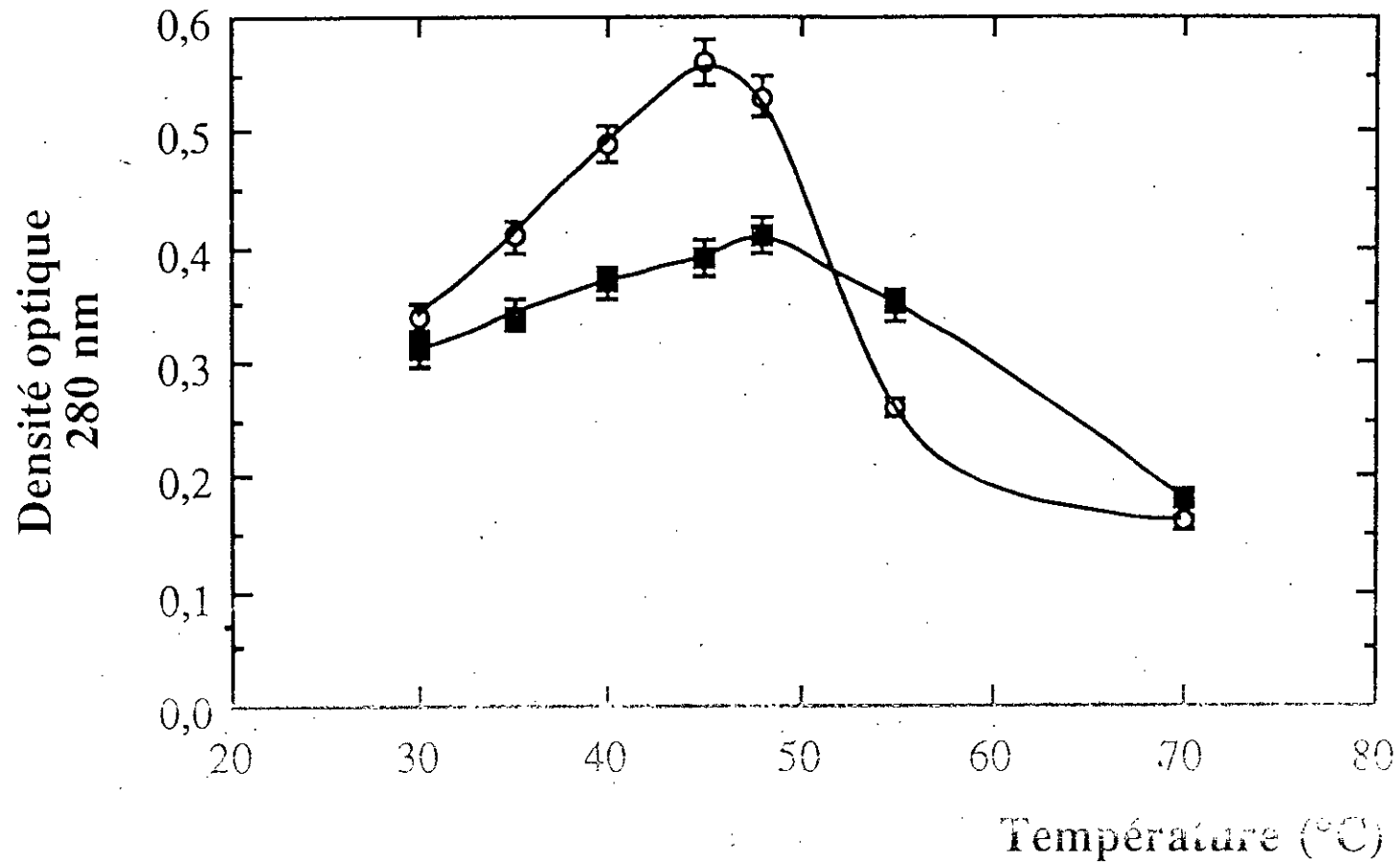


Figure (III.8) " Evolution de l'activité de la pepsine brute (0,3 mg/ml muqueuse sèche) avec la température ".

- sur B.S.A (25 g/l)
- sur protéines de poisson (7 g/l)

### III-3-3 Facteurs affectant le taux d'hydrolyse

---

Le taux d'hydrolyse des protéines de poisson (sardine) est affecté par un ensemble de facteurs. Il est exprimé par la relation suivante:

$$T.H (\%) = (S/S_0).100$$

$S_0$  : quantité de protéines dans le réacteur à l'instant  $t = 0$

$S$  : " " hydrolysées " " "  $t$

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'influence du rapport enzyme/substrat, au régime de mélange et à la qualité du substrat.

#### 1- Rapport enzyme/substrat

L'effet du rapport enzyme/substrat sur le degré d'hydrolyse est présenté sur la figure (III.9).

Le rapport (muqueuse en poids sec/rejet en poids humide): 2/100 permet d'atteindre des taux d'hydrolyse les plus élevés comparativement aux autres rapports étudiés (1/100 ; 3/100 ; 6/100).

De plus, le taux d'hydrolyse maximal, pour l'ensemble des manipulations, est atteint au bout de quatre heures.

Ces manipulations ont été menées aux conditions optimales déterminées au paragraphe précédent. La température optimale,  $T = 48^\circ\text{C}$  du mélange réactionnel, est maintenue constante durant toute la période d'hydrolyse. Quant au pH, sa fixation est difficile. Cela est dû au manque de moyens. Toute fois, on a noté que sa variation durant les quatre heures d'hydrolyse n'était pas importante.

Ceci est montré sur le tableau (III.4).



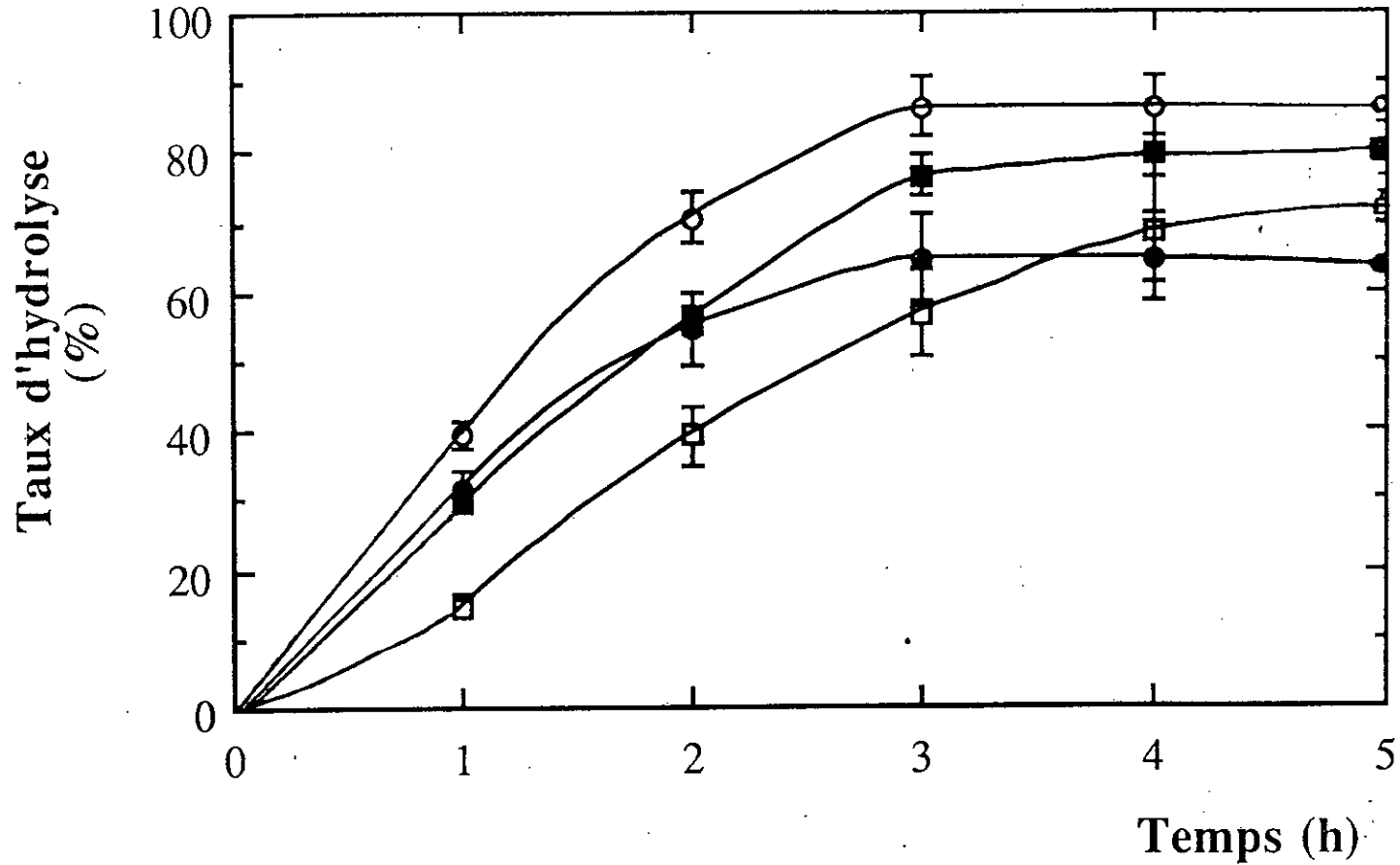


Figure (III.9) " Influence du rapport enzyme/substrat sur le taux d'hydrolyse "

Essais à pH = 1,5 ; T = 48°C ; eau/rejet = 1/1

□	poids sec de muqueuse/	poids humide du rejet	= 6/100
■	" "	" "	= 1/100
○	" "	" "	= 3/100
●	" "	" "	= 2/100

muqueuse sèche/rejet humide ( en poids )	pH initial	pH final
1/100	1,50	1,70
2/100	1,50	2,00
3/100	1,50	1,80
6/100	1,50	1,65

Tableau (III.4) " Variation du pH durant  
l'essai d'hydrolyse ".

## 2- L'agitation

Le taux d'hydrolyse varie fortement avec le degré d'agitation du mélange réactionnel. Cette variation est représentée sur la figure (III.10). Nous constatons qu'une hydrolyse sans agitation atteint un taux d'hydrolyse de l'ordre de 34% au bout de cinq heures. Après quinze heures d'hydrolyse, le rendement est pratiquement du même ordre de grandeur puisqu'il atteint une valeur de 38%. Par contre une hydrolyse où l'agitation est fixée à :  $v = 300 - 400$  tr/min, le rendement est de 78% à 80% au bout de quatre heures.

Vue la nette différence constatée entre les deux expériences d'hydrolyse avec ou sans agitation, nous sommes amenés à affirmer que l'agitation est indispensable pour notre processus.

Enfin, signalons que nous avons évité d'opérer à des régimes

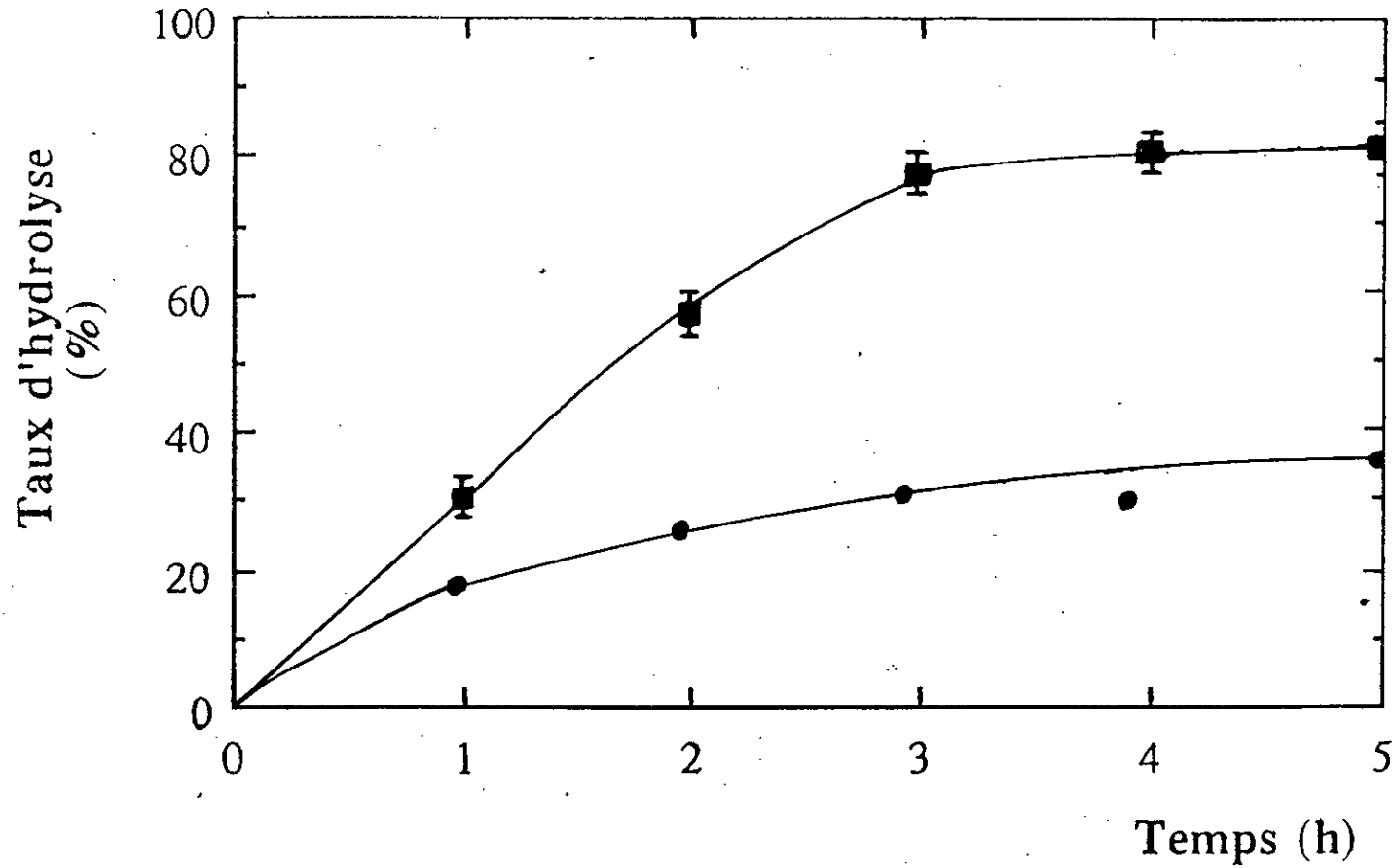


Figure (III.10) " Influence de l'agitation sur taux d'hydrolyse "

Essais à pH = 1,5 ; T = 48°C ; eau/rejet = 1/1  
et muqueuse sèche/rejet humide = 3/100 en poids

● hydrolyse sans agitation  
,, avec ,, ( v = 300 - 400 tr/min)

d'agitation élevée du mélange réactionnel. En effet, une forte agitation risque d'engendrer une oxydation importante et par conséquent conduire, d'une part, à la formation de produits toxiques et d'autre part à la chute de la concentration de certains acides aminés. Tout particulièrement à ceux qui renferment les sulfures comme le mentionne G.R.Reek (59).

### 3- Qualité du substrat

L'influence du taux de graisse du rejet sur le taux d'hydrolyse est présentée sur la figure (III.11).

Pour les mêmes conditions opératoires, on remarque la chute du rendement de 86% obtenu durant la saison d'été où la teneur du rejet en graisse est de 1,0% à 1,5%, à une valeur de 76%, obtenue durant la saison d'hiver où la teneur du rejet en graisse est de 4,0%. Cette chute du rendement s'explique par la formation de complexes lipides-protéines. Ces derniers sont difficilement hydrolysables (60).

Toute fois, d'autres paramètres peuvent intervenir. En effet, Civit et Parin (61), ont constaté qu'un rejet solide de poissonnerie ayant séjourné à la température ambiante donnera un mauvais rendement d'hydrolyse par rapport à un rejet utilisé frais. Ceci est probablement dû au fait que les protéines contenues dans ce rejet perdent leurs caractéristiques suite à l'influence des agents physiques tel la température... etc. et particulièrement par l'action des micro-organismes de l'environnement qui peuvent facilement engendrer une oxydation ou toute autre dégradation des protéines.

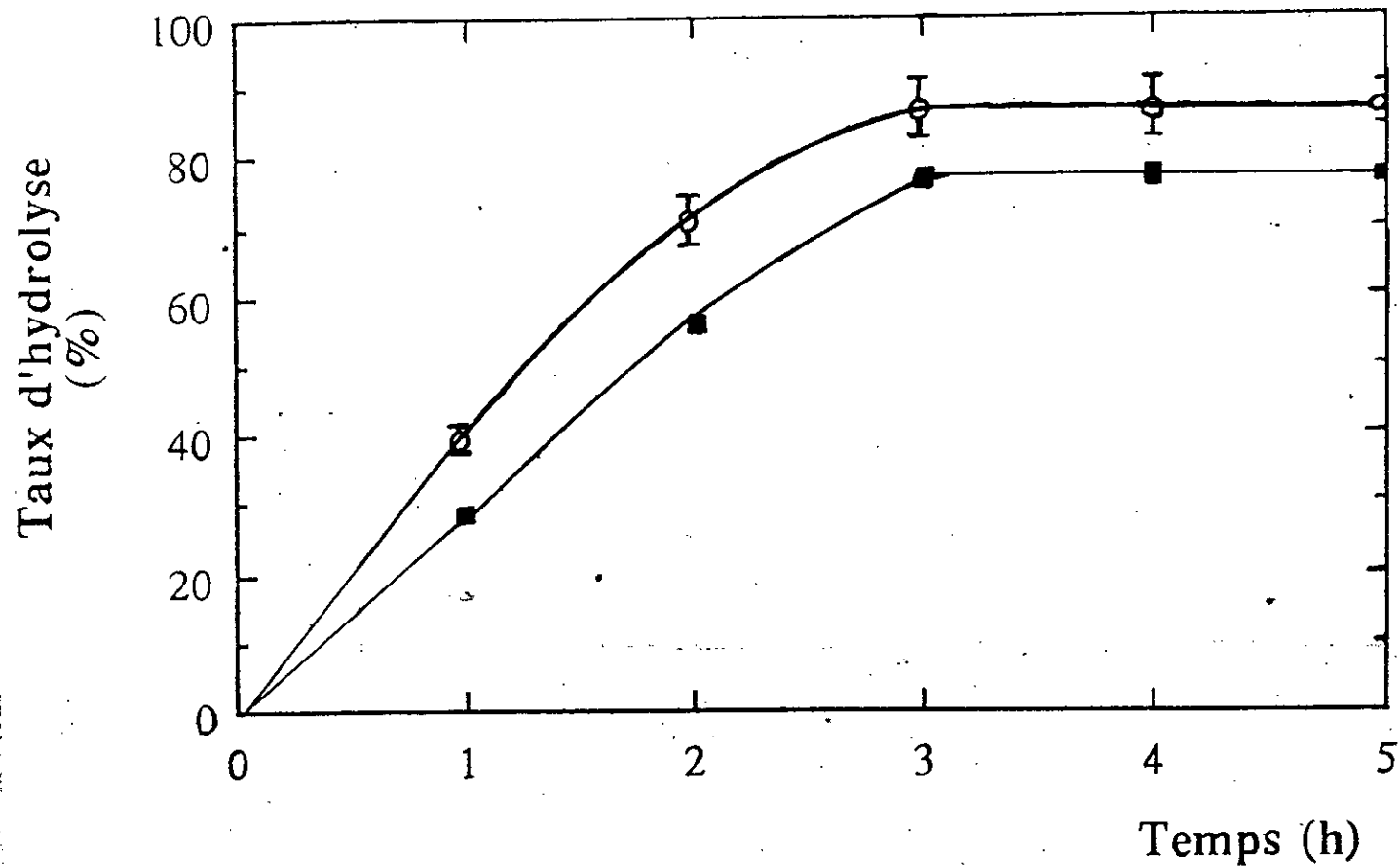


Figure (III.11) " Variation du taux d'hydrolyse en fonction du taux de matière grasse du rejet "

Essais à pH = 1,5 ; T = 48°C ; eau/rejet = 1/1  
 et muqueuse sèche/rejet humide = 2/100 en poids

○ taux de graisse: 1 - 1,5% saison d'été  
 " " : 4,0% " d'hiver

De même, d'autres équipes de chercheurs (62), mentionnent que le paramètre rapport eau/rejet influe sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique. Nous présentons l'effet de ce paramètre sur la figure (III.12).

De l'ensemble de ces résultats, nous constatons que le rapport: eau/rejet = 1/1 en poids, donne les meilleurs résultats par rapport aux autres rapports (2/1 ; 4/1 ; 8/1).

Ces résultats peuvent s'expliquer de la manière suivante:

- Aux faibles rapports eau/rejet, on a une forte concentration des molécules de l'enzyme dans le mélange réactionnel et par conséquent une présence d'un nombre de sites actifs libres important ce qui se traduit par un rendement important.

- Aux forts rapports eau/rejet, on a une faible concentration des molécules d'enzyme dans le réacteur et par conséquent une présence d'un nombre de sites actifs libres restreint, ce qui se traduit par un rendement moyen. Ces résultats ont été confirmés par Vega et Brennan (62) qui ont montré qu'une hydrolyse réalisée sans apport d'eau donne des meilleurs rendements.

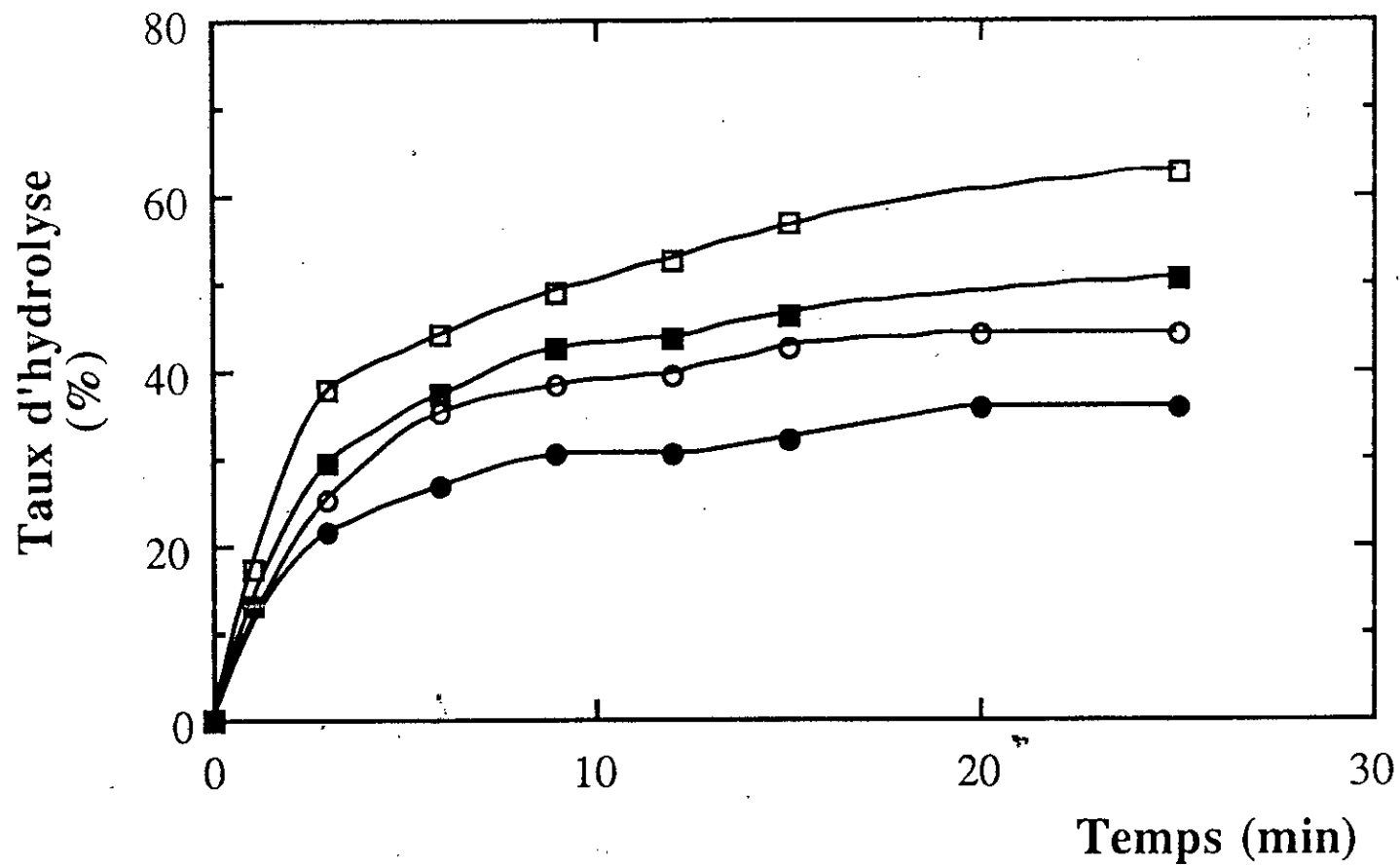


Figure (III.12) " Variation du taux d'hydrolyse en fonction du rapport eau/substrat "

Essais à pH = 1,5 ; T = 48°C; muqueuse sèche/rejet = 2/100

□ eau/rejet = 1/1 (25 g/25 ml) ; ○ eau/rejet = 4/1 (25 g/100 ml)  
 ■ eau/rejet = 2/1 (25 g/50 ml) ; ● eau/rejet = 8/1 (25 g/200 ml)

### III-3-4 Cinétique d'hydrolyse

---

Le graphe où sont portés les concentrations en protéines hydrolysées en fonction du temps est présenté sur la figure (III.13).

A partir de ces résultats, nous avons tracé le graphe:

$1/V_i = f(1/S_0)$ , présenté sur la figure (III.14).

Nous constatons que la courbe obtenue n'obéit pas à la loi de Michaëlis. En effet, elle est du type hyperbole relevant ainsi l'existence d'une inhibition de la réaction d'hydrolyse par un excès de substrat. Toute fois, aux faibles concentrations du substrat, l'inhibition n'a pas lieu, d'où nous pouvons, par simple extrapolation graphique, déterminer les valeurs des constantes cinétiques:

$$K_m = 16,7 \text{ g prot./l}$$

$$V_m = 8,3 \text{ g prot./l.min}$$

La présence du phénomène d'inhibition par le substrat nous a amené à déterminer la valeur de la constante d'inhibition  $K_i$  par extrapolation à partir du graphe donnant l'évolution de  $1/V_i$  en fonction de  $(S_0)$  (figure III.15).

La valeur ainsi obtenue est de l'ordre:

$$K_i = 1,0 \text{ g prot./l}$$

Cependant, il est difficile de commenter les valeurs des trois constantes cinétiques, ainsi obtenues. En effet, en bibliographie, on cite généralement des ordres de grandeur de ces paramètres pour un type de substrat ou d'enzyme bien déterminé. Or, dans notre cas, il s'agit d'une hydrolyse enzymatique d'un milieu très complexe qui est le rejet de la poissonnerie par une enzyme brute non purifiée "pepsine" issue de l'estomac de mouton.



Protéines hydrolysées (g/l)

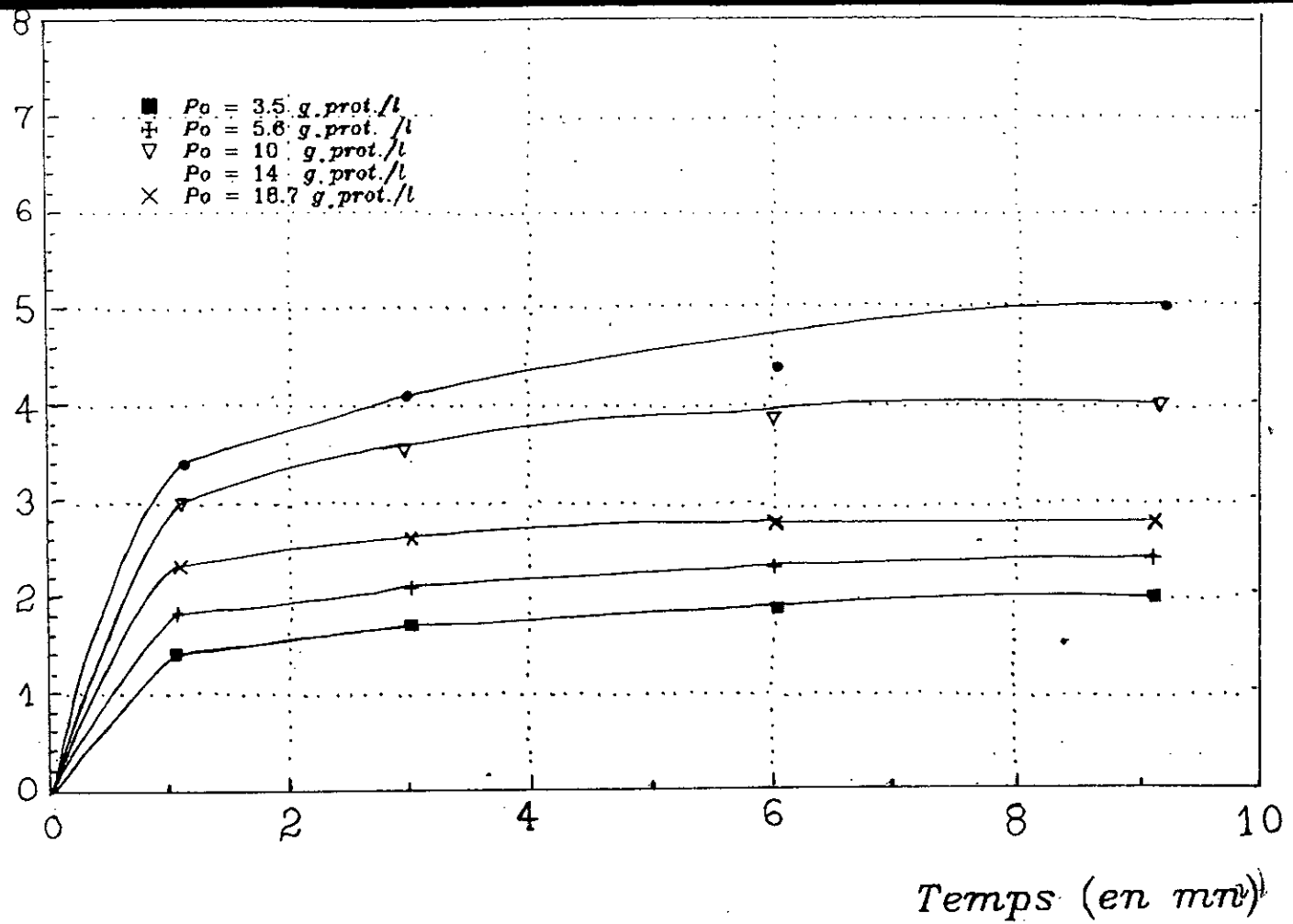


Figure (III.13) " Cinétique d'hydrolyse des protéines de poisson par la pepsine brute (0,5 mg/ml muqueuse sèche "

Essais à pH = 1,5 ; T = 48°C

$S_o$ (g prot./l)	$1/S_o$	$V_i$ (g prot./L.min)	$1/V_i$
3,5	0,28	1,4	0,72
5,6	0,18	2,0	0,50
10,0	0,10	3,0	0,33
14,0	0,07	3,5	0,30
18,7	0,05	2,5	0,40

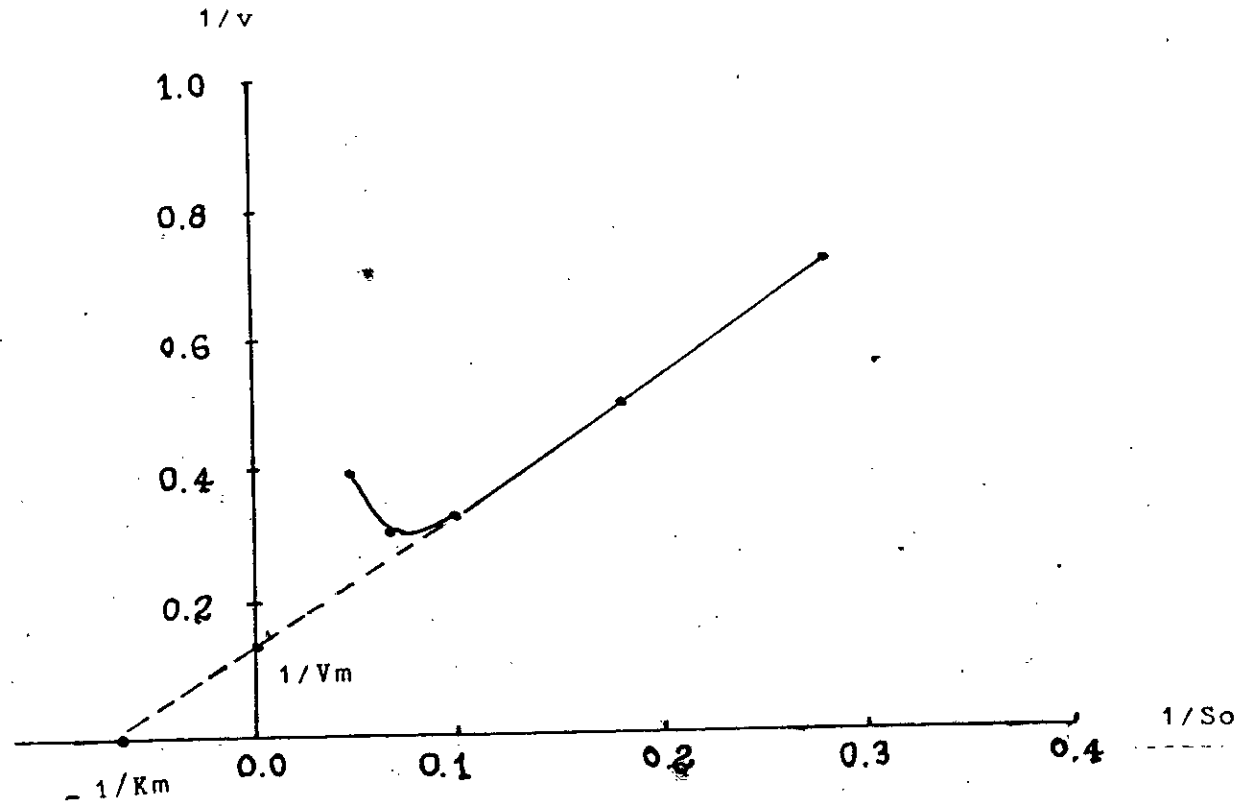


Figure (III.14) " Représentation de  $1/V_i = f(1/S_o)$  "

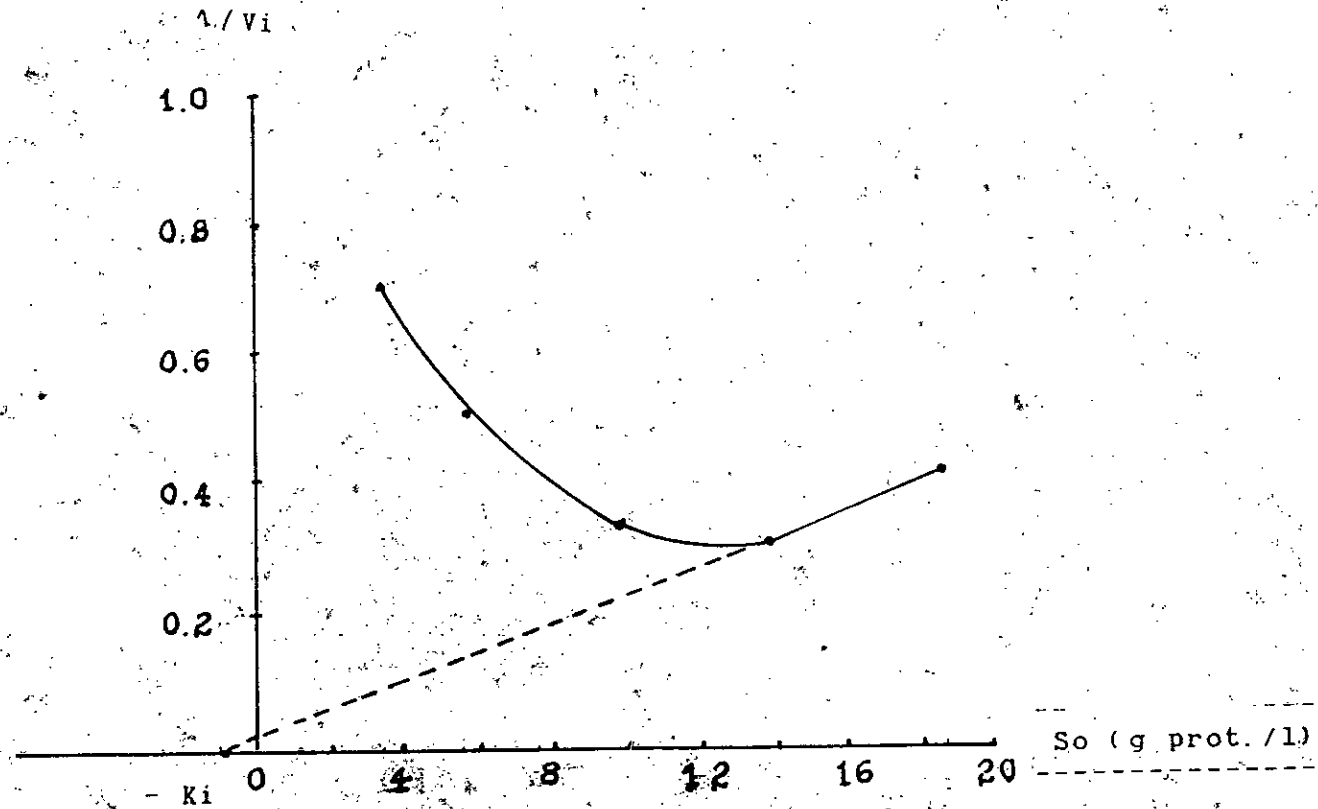


Figure (III.15) " Représentation de  $1/V_i = f(S_o)$  "

### III-3-5 Installation semi-pilote

-----

L'évolution du taux d'hydrolyse dans le réacteur semi-pilote est présentée sur la figure (III.16).

- Cette évolution est du même type que celle obtenue durant les essais à l'échelle laboratoire. En effet, ce taux d'hydrolyse croit tout au long de l'expérience. Toute fois, dans ce cas, il est plus faible que celui observé à plus petite échelle.

A la première demi-heure d'hydrolyse à l'échelle semi-pilote, le rendement est de (20%), ensuite il augmente au cours de l'expérimentation pour atteindre au bout de quatre heures, la valeur maximale (63%). Donc, on remarque nettement la chute de l'efficacité d'hydrolyse en passant d'une petite échelle à une échelle plus importante. Cela est probablement la conséquence directe de la difficulté de maîtriser les paramètres influençant le processus d'hydrolyse à cette échelle. Les paramètres les plus importants sont les suivants:

- L'agitation: le mixage de notre mélange réactionnel était réalisé grâce à deux agitateurs électriques formés chacun d'une tige métallique et de six pâles de très faibles dimensions. Donc au cours de l'agitation, il existait tout le temps des parties du mélange réactionnel où l'effet de l'agitation est presque nul appelées volumes morts. En effet, Pigott et bucove (5), lors d'une hydrolyse enzymatique du rejet de poisson à l'échelle pilote ont utilisés une agitation par recirculation du mélange réactionnel, ce qui a pour effet d'augmenter les contacts enzyme-substrat.

- Géométrie du réacteur: le réacteur assurant notre hydrolyse était de forme cylindrique et à fond plat, ce qui engendre

d'avantage la formation de volume mort, d'ou l'attenuation de l'effet d'agitation à la partie inférieure de ce dernier.

En effet, Vega et Brennan (62), lors d'une hydrolyse enzymatique de rejet de poisson à échelle pilote ont utilisé un réacteur à fond conique dans le but de réduire la formation de volume mort.

De plus, on constate que l'hydrolyse enzymatique n'est pas complète. En effet, à la fin de l'hydrolyse, il reste 32,5 g/l de protéines non hydrolysées.

- Cette manipulation nous a confirmé toute l'importance des expériences à échelle semi-pilote et pilote avant l'exploitation du procédé à l'échelle industrielle. En effet, se baser sur les résultats à l'échelle laboratoire pour exploiter le processus à grande échelle menera à des erreurs d'un point de vue économique.

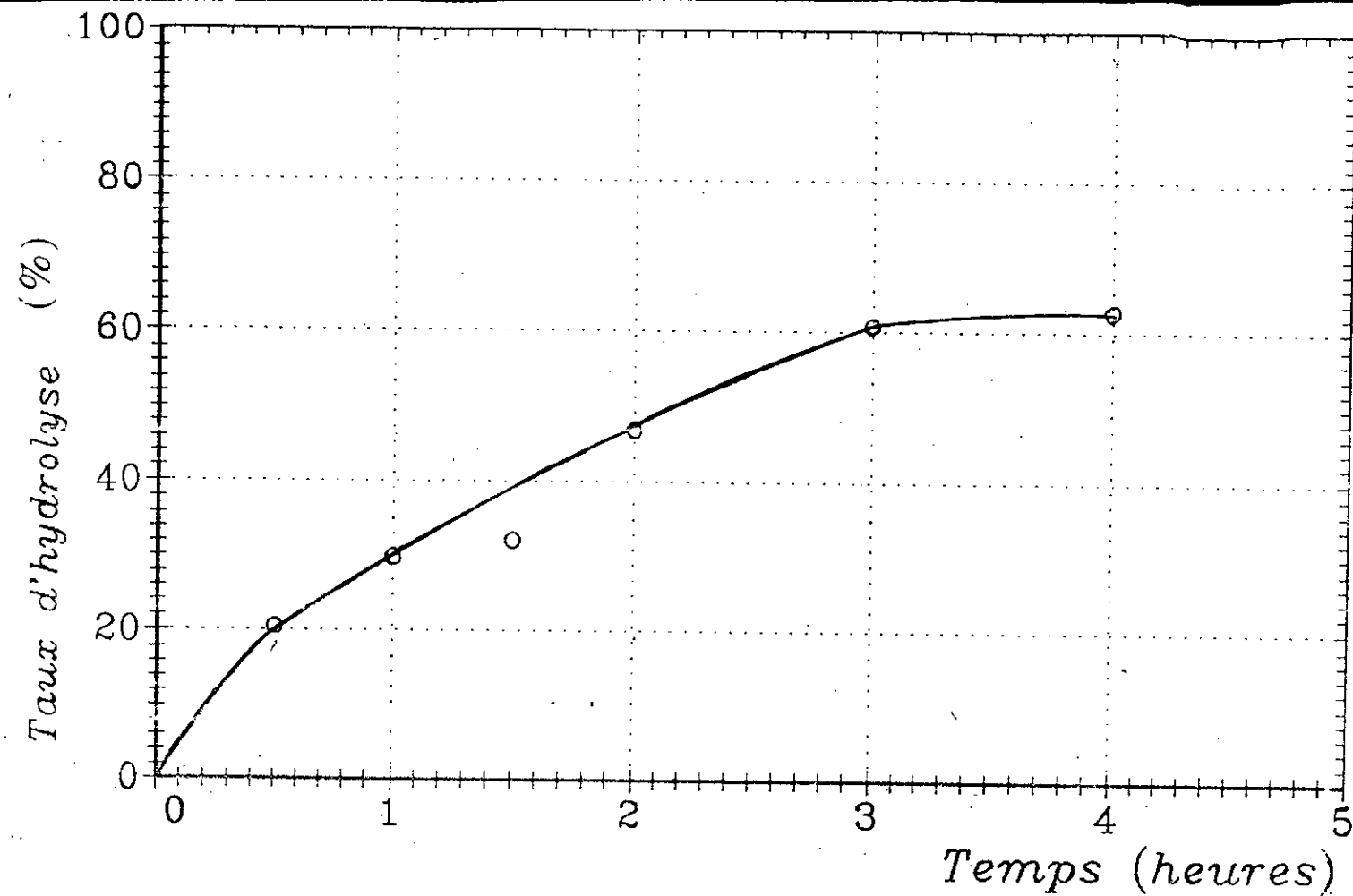


Figure (III.16) " Essai d'hydrolyse à l'échelle semi-pilote "

essai à pH = 1,5 ; T = 48°C ; eau/rejet = 1/1  
muqueuse en poids sec/rejet en poids humide = 2/100  
So = 87,5 g prot./l et Sfinal = 32,5 g prot./l

L'analyse de l'hydrolysate en acides aminés à été réalisée par le laboratoire de l'U.C.C.A.B à chateau-thierry (FRANCE) à l'aide d'un auto-analyseur d'acides aminés.

Sachant que l'hydrolyse enzymatique, particulièrement à base de pepsine brute aboutie souvent à un hydrolysate formé de petits peptides, de peptides avec une moyenne de 3 à 4 résidus d'acides aminés. Cependant, avant toute analyse, l'hydrolysate doit subir une hydrolyse chimique acide afin de libérer tout les acides aminés liés entre-eux.

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau (III.5).

Nous constatons que tous les acides aminés essentiels sont présents (à l'exception de la cysteine).

L'isoleucine, la valine, la leucine et la phenylalanine sont présentes à des teneurs élevées comparativement à la bibliographie (Tableau I.4), tandis que la thréonine et le tryptophane sont présents à des teneurs faibles, particulièrement, le tryptophane qui est estimé en p.p.m. Ceci peut s'expliquer par sa complexation et sa précipitation par les ions  $Ca^{2+}$  et  $PO_4^{3-}$  (5). Les résultats ainsi obtenus permettent d'envisager une utilisation de l'hydrolysate enzymatique comme additif alimentaire aux rations d'animaux.

Acides aminés	Teneur en (%)
Isoleucine	8,45
Leucine	17,65
Lysine	6,87
Phénylalanine	8,70
Tyrosine	2,30
Cysteine	0,00
Méthionine	1,60
Thréonine	0,67
Tryptophane (en p.p.m)	68 74 (hydrolyse chimique)
Valine	12,03
Acide aspartique	1,45
Sérine	0,67
Acide glutamique	5,30
Proline	4,90
Glycine	7,93
Alanine	19,04
Histidine	0,67
Arginine	1,72

Tableau (III.5) " Résultats de l'analyse de l'hydrolysate en acide aminés à échelle semi-pilote ".



### III-4 CONCLUSION

- L'analyse chimique de différents échantillons a montré que le rejet solide de la poissonnerie de Dellys contient environ 14% de protéines. Ainsi, la mise en évidence de l'importante valeur nutritionnelle de ce dernier, nous a amené à réaliser un essai de sa valorisation par hydrolyse enzymatique.

Pour ce faire, la préparation d'une pepsine brute par auto-digestion de la muqueuse stomacale de mouton, a été entreprise.

Les conditions optimales de préparation sont:

pH = 1,0 et temps de préparation = 12 h

- L'étude de l'activité enzymatique de cette pepsine sur un substrat standard (B.S.A) et sur les protéines de poisson a abouti aux conditions optimales suivantes:

. pH d'activité = 1,5

. température = 48°C

- La réalisation de plusieurs essais d'hydrolyse à l'échelle du laboratoire a montré que le rendement d'hydrolyse est affecté par l'ensemble des facteurs suivants:

le rapport (muqueuse en poids sec/rejet en poids humide) influe considérablement sur le rendement d'hydrolyse.

La valeur optimale de ce rapport est 2/100 donnant un taux d'hydrolyse de l'ordre T.H = 83% .

Pour le rapport en poids eau/rejet, nous constatons que plus la valeur de ce dernier est élevée, plus le taux d'hydrolyse est faible. Le rapport 1/1 donne les meilleurs résultats lors de nos essais d'hydrolyse.

Quant à la vitesse d'agitation du mélange réactionnel, une hydrolyse où l'agitation est fixée à 300-400 tr/min. on obtient un taux d'hydrolyse presque deux fois meilleur que celui obtenu lors d'une hydrolyse sans agitation.

La qualité du substrat influe aussi sur le rendement d'hydrolyse. En effet, quand le taux de graisse du rejet est important (à partir de 4%), le rendement d'hydrolyse subit une chute notable.

Enfin, le paramètre temps d'hydrolyse ou l'on constate que la variation du taux d'hydrolyse atteint son palier au bout de quatre heures.

Une fois les conditions optimales d'hydrolyse déterminées, l'hydrolyse enzymatique du rejet solide de la poissonnerie par la pepsine brute à l'échelle semi-pilote a montré la complexité du processus et la difficulté de la maîtrise des divers paramètres intervenant au cours de l'essai d'hydrolyse. En effet, la chute du taux d'hydrolyse de 83% obtenu à échelle laboratoire, à 63% obtenu à échelle semi-pilote dans des conditions semblables confirme nos précédentes remarques.

De plus, l'analyse en acides aminés de l'hydrolysate, a montré la présence de tous les acides aminés essentiels, à l'exception de la cysteine, en quantités satisfaisante. Ce qui permet d'envisager l'emploi de cet hydrolysate comme additif alimentaire pour l'élevage du bétail.

# *Conclusion*

Les objectifs assignés à ces travaux, à savoir la production d'une enzyme brute à partir de l'estomac de mouton et son utilisation dans des conditions optimales préalablement déterminées, pour l'hydrolyse des rejets de poissonneries, ont été atteints. Le changement d'échelle allant du laboratoire au semi-pilote a conduit à une chute des taux d'hydrolyse de 83% à 63%. Ces derniers résultats ont montrés toute la difficulté pour établir des bilans économiques du procédé et cela même en se basant sur des expériences à l'échelle semi-pilote.

Il apparait, ainsi, que toute étude économique ne sera représentative que si elle est menée dans des conditions assez proches des conditions industrielles. Cependant, il est important de signaler que l'enzyme préparée donnerait des résultats plus performants si elle était purifiée. Cela permettrait d'améliorer considérablement les performances du procédé. Cet axe de recherche est parmi nos prochains objectifs. De même, l'intégration d'une technique à membrane telle l'ultra-filtration dans le procédé pour, d'une part, séparer les acides aminés du mélange réactionnel et d'autre part, augmenter le rendement de l'hydrolyse est actuellement en cours d'étude. Enfin, l'analyse complète des constituants du mélange réactionnel figure parmi nos futurs préoccupations au vue de la complexité de l'opération et des

moyens matériels importants nécessaires pour mener à bien ce travail.

En parallèle, un axe de recherche aussi important que ceux préalablement cités sera entrepris, à savoir, l'hydrolysate obtenu après séchage par une méthode adéquate (pulvérisation ou autre) devra être testé sur sa valeur nutritionnelle sur des batteries d'animaux en pleine croissance pour estimer réellement l'impact de l'hydrolysate sur l'alimentation du bétail.

*Annexe*

## TECHNIQUES DE NUMERATION DES MICRO-ORGANISMES

### 1- Numération en milieu liquide " Méthode de Mac Grady "

Cette méthode utilise des dilutions et est basée sur le fait qu'après ensemencement d'un milieu liquide toute croissance microbienne indique la présence d'au moins un germe.

Deux tubes du milieu de culture sont ensemencés par 1 ml de chaque dilution. Après culture on procède à la lecture des résultats. Les tubes présentant une croissance sont comptés positifs et les autres négatifs.

Pour chaque série de cultures issues de la même dilution on compte le nombre de tubes positifs soit: 0, 1, ou 2.

On compose alors un nombre caractéristique, il est formé par les chiffres correspondant à trois dilutions successives, la première dilution étant la plus concentrée ayant donné un résultat positif pour les deux tubes.

Par exemple, soit le cas d'une dilution en double, nous obtenons les résultats suivants:

Dilution d'ensemencement :	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
Dilution dans le tube de culture :	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	-	-	-
	2	2	2	1	0	0

Le nombre caractéristique sera: 210.

Des tables élaborées par Mac Grady donnent pour chaque nombre caractéristique le nombre de cellules le plus probable dans 1 ml du tube correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique. Au nombre 210 correspond le chiffre 6,0. Donc la dilution 10 contient 6 ger/ml. D'où la suspension de départ contient 6.10 ger/ml

## 2- Numération en milieu solide

-----

cette méthode est basée sur le fait qu'une cellule, placée sur un milieu solide donnera naissance à une colonie macroscopiquement visible.

Deux boîtes de petri sontensemencées par 1 ml de chaque dilution ensuite le milieu gélosé est coulé en surfusion et mélangé uniformément avec l'inoculum.

Après culture on procède à la lecture des résultats. Le comptage de colonies se fait à l'aide d'un compteur électronique.



# *Bibliographie*

- (1) I. M. Mackie " Fish Protein Hydrolysates "   
 Process Biochemistry ; P. 26 - 29 ; jan/feb 1982.
- (2) P. Durand " Valorisation des sous-produits de la pêche:   
 réalisation et perspectives "   
 Science et pêche Bull. Inst. Pêches marit. n°330 ; jan. 1983.
- (3) G. M. Pigott et G. O. Bucove " Engineering a Plant For   
 Enzymatic Production of   
 Supplemental Fish Protein "   
 Journal of Food Processing ; vol. 2 ; P. 33 - 54 ; 1978 .
- (4) W. Tarky " Protein Hydrolysates From Fish Waste "   
 Journal of Food Processing ; vol. 38 ; P. 917 - 918 ; 1973.
- (5) G. O. Bucove et G. M. Pigott " Pilot Plant Production of a   
 Fonctionnal Protein From Fish   
 Waste by Enzymatic Digestion "   
 Proceeding of the 7 th Annual Symposium on Food Process Waste   
 Washington ; p. 66 - 81 ; 1976.
- (6) P. Chevallier " La cellule, étude structurale et moléculaire   
 Collection académique press. ; 1981.
- (7) D. Sabourault / A. M. Boudeaux " Biochimie "   
 Ed. Hermann ; Paris 1974.
- (8) J. Pelmont " Enzymes " Presse universitaire de grenoble 1989.
- (9) David. Plummer " Introduction aux techniques de biochimie "   
 Ed. Mc Graw-Hill ; Paris 1989.
- (10) B. Deymié et D. Simon " Techniques d'analyse et de controle   
 dans les industries agro-alimentaires "   
 Ed. Apria ; 1980 .
- (11) P. R. Simon " Microbiologie industrielle et génie-biochimique "   
 Ed. Masson ; Paris 1970.
- (12) Bernhard " Structure et fonction des enzymes "   
 Ed. Masson et Cie ; Paris 1974.
- (13) J. C. Collin " Actualités des industries alimentaires et   
 agro-alimentaires "   
 I. A. A ; P. 448 - 460 ; juin 1988.
- (14) Paul Louisot " Biochimie générale et médicale "   
 Vol. 4 ; Ed. Simep ; Lyon 1983.
- (15) C. Alais " Abrégé de biochimie alimentaire "   
 Ed. Masson ; Paris 1987.

- (16) M. Debatisse " Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires " Vol. 2 ; Ed. Apria ; Paris 1981.
- (17) J. C. Ceftel ; D. Lorent " Proteines alimentaires " Ed. Lavoisier ; Paris 1985.
- (18) F. Percheron " Abrégé de biochimie générale " Tome 1 ; Ed. Hermann ; 1982.
- (19) Cl. Audigié ; G. Dupont " Principes des méthodes d'analyse biochimiques " Ed. Doin ; Paris 1985.
- (20) J. Krush " Biochimie, étude médicale et biologique " Tome 1 ; Ed. Masson ; 1985.
- (21) " Biochimie, acides aminés et protéines " O. P. U ; 1982.
- (22) K. Mary Clegg " Dietary Enzymic Hydrolysates of Protein With Reduced Bitterness " Journal Food Technol. ; vol. 9 ; P. 21 -29 ; 1974.
- (23) Enrique Yanez " Enzymatic Fish Protein Hydrolysate " Journal of Food Science ; vol. 41 ; P. 1289-1292 , 1976.
- (24) O. Nettli " Protein Recovery From Food Factory Waste Using Ligno-sulfonates " Alwatech. Harbitzalleen ; n°3 ; Oslo Norway ; 1982.
- (25) P. Dupuy " Use of Enzymes in Food Technology " Ed. Lavoisier ; Paris 1982.
- (26) J. Spinelli ; B. Koury et R. Miller J. Food Sci. ; vol. 37 ; P. 599 - 605 ; 1972.
- (27) J. Sheen Shuh et T. S. Vidal " Effect of Chemical and Enzymatic Degradation on The Functionnal Properties of Fraction-1-Protein " Journal of Agricultural and Food Chemistry ; vol. 36 ; n°3 P. 445 - 449 ; may - jun 1988.
- (28) C. John Mowbray " Processing and Quality Assessment of Soluble Prepared From Dog-Fish Processing Waste " Journal of Agricultural and Food Chemistry ; vol. 36 ; P. 1329 - 1333 ; nov - dec 1988.
- (29) M. B. Hale " Using Enzymes to Make Fish Protein Concentrate " Marine Fisheries Review ; vol. 35 ; P. 15 - 18 ; 1974.
- (30) W.M. Meinke et K.F. Mattil " Fish Viscera Silage " J. Food Science ; vol. 38 ; P. 364 - 370 ; 1973.

- (31) Jan Raa " Preparation and Testing of an Autolysate of Fish Viscera as Growth Substrate for Bacteria " Applied and Environmental Microbiology ; vol. 50 ; n°6 ; P. 1556 - 1557 ; decembre 1985.
- (32) A. Gildberg " Properties of a Propionic acid/Formic acid Preserved Silage of Cod Viscera " J. Sci. Food Agric. ; vol; 28 ; P. 647 - 653 ; 1977.
- (33) J. Raa et A. Gildberg " Autolysis and Proteolytic Activity of Cod Viscera " J. Food Technol. ; vol. 11 ; P. 619 - 628 ; 1976.
- (34) K. A. Almas " Application of Cross Flow Membrane Technology in the Fishery Industry " Desalination ; vol. 53 ; P. 28 - 29 ; 1981.
- (35) I. H. Pike " Fish Meal For Ruminants " Feed Compounder ; P. 28 - 30 ; janvier 1981.
- (36) A. Z. Mehrez " Processing Factors Affecting Degradation of Fish Meal in The Rumen " J. Anim. Sci. ; vol. 50 ; n°4 ; P. 737 - 744 ; 1987.
- (37) A. P. Williams " Nutritional Value of Fish Visceral Meals " J. Sci. food ; vol.50 ; P. 282 - 285 .
- (38) International Association of Fish Meal Manufactures: " Valeur énergétique des farines de poisson " Revue de l'alimentation animale ; P. 22 - 24 ; 1987.
- (39) Sen-Shyong-Jeng " Effects of Feeding Fish Soluble and Fish Meal Produced From Small Sharks Waste on Growth of Fresh Water Prawn " J. Fish Soc. Taiwan ; vol. 12 ; P. 64 - 73 ; may 1985.
- (40) L. Hang-Ching " Valorisation du poisson et perspective de développement de nouveaux produits: la texturation de chaires de poisson " Science et pêche. Bull. Inst. pêche marit. ; n°347 ; 1984.
- (41) T. akahane et J. C. Cheftel " Surimi et analogues de produits de la mer " I. A. A ; P. 881 - 897 ; octobre 1989.
- (42) Enapêche. Ministère de l'environnement . 1990. République Algérienne Démocratique et Populaire.
- (43) A. H. Ritchie et I. M. Mackie " Preparation of Fish Protein Hydrolysates " Animale Feed science and Technol.; vol. 7 ; P. 125-132; 1982.

- (44) " Contrôle de la qualité des produits de charcuterie salaisons et conserves de viandes "  
Edité par AFNOR ; Paris 1987.
- (45) Michel Maes " Déchets industriels: mode d'emploi "  
Ed. Lavoisier ; Paris 1986.
- (46) Raymond Bourdon " Chimie analytique: analyse organique élémentaire et fonctionnelle "  
Ed. SEDES ; Paris 1981.
- (47) J. Giraud, P. Galzy " L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires "  
Ed. de l'usine ; Montpellier 1980.
- (48) A. Wibout " Le livre des produits alimentaires, commercialisation, utilisation, consommation "  
Ed. Max Brésol ; 1986.
- (49) J. P. Larpent " Memento technique de microbiologie "  
Ed. P.S.I ; Paris 1975.
- (50) Raymond S. Roy " Travaux pratiques de microbiologie "  
Ed. Maloine S.A ; Paris 1974.
- (51) G. M. Pigott et Ling Lin Liu " Preparation and Use of Inexpensive Crude Pepsin For Enzymatic Hydrolysis of Fish Protein "  
Journal of Food Science ; vol. 46 ; P. 1569-1573 ; 1981.
- (52) M. B. Hale " Relative Activities of Commercially Available Enzymes in The Hydrolysis of Fish Protein "  
Food Technology ; vol. 23 ; P. 107 - 110 ; 1969.
- (53) J. L. bourdon et N. Marchal " Techniques bactériologiques "  
Ed. Doin ; Paris 1973.
- (54) J. P. Larpent " Manuel pratique de microbiologie "  
Ed. Hermann ; Paris 1985.
- (55) P. Singleton et D. Saisbury " Abrégés de bactériologie "  
Ed. Masson ; Paris 1984.
- (56) A. J. Cornish " The pH Dependence of Pepsin Catalysed Reaction "  
Biochemistry Journal ; vol. 113 ; P. 353 - 358 ; 1969.
- (57) L. E. Baker " New Synthetic Substrates For Pepsin "  
Journal Biol. Chem. ; vol. 193 ; P. 809 - 815 ; 1951.

(58) J. Shuh Sheen et L. Volney Sheen

" Characteristics of Fraction-1-Protein  
Degradation by Chemical and Enzymatic  
Treatment "

Journal of food Chemistry ; vol. 35 ; n°6 ; P. 948 - 952 ;  
novembre-decembre 1987.

(59) G. R. Reeck " Phylogenic Variation Among Protolytic Enzymes  
Univ. of Washington Seattle ; 1971.

(60) Y. K. Soliman " Lipid-Protein Interaction During Aqueous  
Extraction of Fish Protein "

Journal of Food Science ; vol. 39 ; P. 726 - 734 ; 1974.

(61) E. M. Civit et M. A. Parin " Recovery of Protein and Oil  
From Fishery Blood Water Waste "  
Waste Res. ; vol. 16 ; P. 809 - 814 ; 1982.

(62) R. E. vega et J. G. Brennan " Enzymic Hydrolysis of Fish  
Offal Without Added Water "  
Journal of Food Engineering ; vol. 8 ; P. 201 - 215 ; 1988.