

2 BX

وزارة الجامعات
Ministère aux Universités
المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

PROJET DE FIN D'ETUDES

En Vue l'Obtention du Diplôme d'Ingénieur d'état en génie de l'environnement

SUJET

Hydrolyse enzymatique des rejets
de poissonneries et ultrafiltration
de la biomasse

Proposé par :

Dr. N. MAMERI
Dr. D. MAMERI

Etudié par :

O. GAOUAR
S. FENNOUH

Dirigé par :

Dr. N. MAMERI
Dr. D. MAMERI

PROMOTION

Juin 1991

وزارة الجامعات
Ministère aux Universités

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

PROJET DE FIN D'ETUDES

En Vue l'Obtention du Diplôme d'Ingénieur d'état en génie de l'environnement

SUJET

Hydrolyse enzymatique des rejets
de poissonneries et ultrafiltration
de la biomasse

Proposé par :

Dr. N. MAMERI
Dr. D. MAMERI

Etudié par :

O. GAOUAR
S. FENNOUH

Dirigé par :

Dr. N. MAMERI
Dr. D. MAMERI

PROMOTION

Juin 1991

Dédicaces

A toute ma famille

Ouassila

Ouassila

A ma mère, à mon père,
A mes grands-parents,
A ma soeur Nezha, à mes frères Yacine et Sammy,
A Houssein,
A tous mes amis.

Souad

Souad

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Biotechnologie du Département du Génie de l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique, sous la direction du Dr N.MAMERI directeur de ce même laboratoire et du Dr D.MAMERI chargée de cours au département.

Pour leur disponibilité, leur aide et leurs conseils, tant sur le plan méthodologique que pratique, tout au long de ce travail, nous tenons particulièrement à les remercier.

Qu'il nous soit aussi permis de remercier le Dr S.CHERID d'avoir accepté de présider ce jury. Nous remercions également le Dr B.ZOUAMBI pour les orientations et les conseils qu'il nous a apportés durant cette étude. M^{me} HELLAL a bien voulu faire partie de ce jury, nous l'en remercions.

Merci également à M^{lle} ZOUGHLACHE enseignante au département pour sa contribution à la réalisation de nos analyses microbiologiques.

Nous exprimons notre reconnaissance aux cadres de l'ENAPECHE de DELLYS, en particulier à M^r A.AISSI, directeur de l'unité pour son accueil, sans oublier, M^r Abdelhak technicien au sein de cette même entreprise pour son aide et sa sympathie.

Nous exprimons notre gratitude à Houssem pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail, ses encouragements et surtout, le soin et la rapidité avec lesquels il a assuré la frappe de ce mémoire.

Merci aussi à Toufik qui a eu la gentillesse de mettre son micro-ordinateur à notre disposition.

Enfin, nous renouvelons nos remerciements à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

الهدف من هذه الأطروحة هو تقديم طريقة اقتصادية لتحليل مخبري لميولينات السمك. لهذا الغرض، درسنا الشروط الفضلى لـ pH ودرجة الحرارة التي تشتغل فيها الخميرة (pepsine) الخشنة المشتقة من العشاء المعدى للخروف. مصدر الميولينات هو الفضائل الهامدة للسمك، التي تعرضت لتحليل مخبري بهدف إلى ثبيان درجة عدواها. أخيرا قمنا بتجارب ترشيح منطوف غايه تقديم وسيلة لتركيز الميولينات الناتجة عن التحليل المخبري.

Summary

The object of the present study was to prepare an inexpensive fish protein hydrolysate.

To this purpose, the pH and temperature conditions of activity of crude pepsin obtained from sheep stomach mucosa were optimized.

Fisheries solid wastes were used as a source of proteins and their bacteriological quality was assessed.

Ultrafiltration has also been tested as a way of recovering the peptides contained in the hydrolyzate.

Resumé

L'étude présentée dans ce mémoire vise à préparer économiquement un hydrolysate enzymatique de protéines de poisson. A cet effet, les conditions optimales (pH et température) d'activité d'une pepsine brute extraite d'estomac de mouton ont été étudiées.

La source de protéines était constituée par des rejets solides de poissonneries. Ces derniers ont aussi fait l'objet d'analyses microbiologiques visant à évaluer leur degré de contamination.

Enfin, des essais d'ultrafiltration ont été réalisés en vue de proposer un mode de récupération des peptides résultants de l'hydrolyse enzymatique.

SOMMAIRE

	<u>Page</u>
INTRODUCTION.....	1
RETROSPECTIVE DES TRAVAUX ANTERIEURS.....	5
INTRODUCTION A L'INDUSTRIE HALIEUTIQUE EN ALGERIE.....	14
1 PRESENTATION DE L'USINE DE DELLYS: 143	15
1.1 Introduction:	15
1.2 Schéma de la chaîne de production (cas des sardines):	16
1.3 Résidus liquides et solides de la chaîne de production:	16
2 VALEUR NUTRITIONNELLE DES POISSONS ET IMPORTANCE DES REJETS:	18
2.1 Valeur alimentaire des poissons: 145	18
2.2 Importance des déchets: 145	21

ETUDE I:

LA MICROBIOLOGIE

1 INTRODUCTION:	24
2 ECHANTILLON-PRELEVEMENT:	24
3 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES:	24
4 LES NORMES:	25
5 CARACTERISTIQUES GENERALES DES BACTERIES RECHERCHEES:	26
5.1 Les Coliformes, Escherichia coli et les Salmonelles: 124	26
5.2 Les Streptocoques:	27
5.3 Les Staphylocoques:	27
5.4 Les Clostridium sulfito-réducteurs:	28
6 MODE OPERATOIRE:	28

6.1 Choix de la solution mère pour les analyses microbiologiques:	28
6.2 Préparation de la solution mère et des différentes dilutions:	30
6.3 Dénombrement des germes totaux: 141	30
6.4 Recherche des Coliformes totaux et fécaux: 141	31
6.4.1 Test présomptif:	31
6.4.2 Test confirmatif:	31
6.5 Recherche des Streptocoques fécaux: 241	32
6.5.1 Test présomptif:	32
6.5.2 Test confirmatif:	32
6.5.3 Méthode de Mac Grady: 241	32
6.6 Recherche des Staphylocoques:	35
6.7 Recherche des Clostridium sulfito-réducteurs: 241	36
6.8 Recherche des Salmonella: 241 , 244	36
7 RESULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES:	37
8 INTERPRETATION DES RESULTATS:	39

ETUDE II

LA BIOCHIMIE

1 LES ACIDES AMINES:	41
1.1 Introduction:	41
1.2 Propriétés générales des acides aminés:	43
1.2.1 Propriétés optiques:	43
1.2.2 Propriétés spectrales:	43
1.2.3 Propriétés acido-basiques:	43
1.2.4 Solubilité et point de fusion:	44
1.2.5 Réactivité chimique:	44
2 LES PROTEINES:	45
2.1 Définition:	45
2.2 Les niveaux d'organisation des protéines:	45
2.2.1 Structure primaire:	45
2.2.2 Structure secondaire:	45
2.2.3 Structure tertiaire:	46
2.2.4 Structure quaternaire:	46
3 LES ENZYMES:	46

3.1 Structure des enzymes:	41
3.2 Coenzymes:	47
3.3 Site actif:	47
4 CINEMATIQUE ENZYMATIQUE: 146	48
4.1 Vitesse de réaction en fonction du temps:	48
4.2 Vitesse de réaction en fonction de la quantité d'enzyme:	48
4.3 Vitesse de réaction en fonction de la concentration de substrat:	50
4.4 Facteurs influençant la réaction enzymatique: .	53
4.4.1 La température: 146	53
4.4.2 Le pH:	55
5 PREPARATION DES SOLUTIONS DE PEPSINE:	55
5.1 Préparation de l'enzyme brute:	55
5.1.1 Remarques préliminaires:	55
5.1.2 Mode opératoire:	56
5.2 Détermination de l'équivalent en poids sec de l'enzyme:	56
5.3 Préparation des solutions de pepsine:	57
5.3.1 Préparation des solutions de pepsine brute: 146	57
5.3.2 Préparation des solutions de pepsine commerciale:	58
6 DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES D'ACTIVITE DE LA PEPSINE BRUTE:	58
6.1 Détermination du pH optimal d'activité de la pepsine brute:	59
6.1.1 Mode opératoire: 146	60
6.1.2 Exploitation des résultats:	61
6.1.3 Interprétation des résultats:	61
6.2 Détermination de la température optimale d'activité de la pepsine brute:	64
6.2.1 Mode opératoire:	65
6.2.2 Exploitation des résultats:	65
6.2.3 Interprétation des résultats:	65
7 ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE: ..	67
7.1 Mode opératoire:	67

7.1.1 Principe de la mesure:	67
7.1.2 Conditions opératoires:	68
7.1.3 Mode opératoire:	68
7.1.4 Exploitation des résultats:	70
7.2 Présentation des résultats:	70
7.3 Interprétation des résultats:	74
8 ETUDE EXPERIMENTALE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS DE POISSONNERIES:	80
8.1 Conditions opératoires:	80
8.2 Mode opératoire:	81
8.3 Exploitation des résultats:	82
8.4 Interprétation des résultats:	83
 <u>ETUDE III</u>	
L'ULTRAFILTRATION	
1 PRINCIPE DE L'ULTRAFILTRATION:	88
2 MEMBRANES ET MODULES:	89
2.1 Les membranes:	89
2.2 Les modules:	93
3 MECANISME DE L'ULTRAFILTRATION:	94
4 AUTRES PARAMETRES INFLUANT SUR L'ULTRAFILTRATION: 261	96
5 CONDITIONS OPERATOIRES EN ULTRAFILTRATION:	96
6 PRINCIPALES APPLICATIONS INDUSTRIELLES DE L'ULTRAFILTRATION:	97
7 ETUDE EXPERIMENTALE:	99
7.1 Description du dispositif expérimental:	99
7.2 Mode opératoire:	100
7.3 Présentation des résultats expérimentaux:	101
7.4 Interprétation des résultats obtenus lors des essais d'ultrafiltration:	101
7.4.1 Courbe solvant:	101
7.4.2 Courbes de polarisation:	104
CONCLUSION	107
BIBLIOGRAPHIE	i
ANNEXE	v
GLOSSAIRE	viii

Liste des abréviations

MG: matière grasse

ND: non dénombrable

UF: ultra filtration

ger: germes

p.m: poids moléculaire

INTRODUCTION

De l'analyse des statistiques de pêche, il ressort que la production mondiale des produits de la mer (environ 72 millions de tonnes par an, actuellement) connaît, depuis le début des années 70, un plafonnement de son taux d'expansion. Ce dernier n'augmente en effet, plus que faiblement et cela malgré un effort de pêche toujours soutenu.

Cette constatation ne fait que rappeler le caractère limité des ressources halieutiques et c'est dans ce contexte qu'une pleine valorisation des produits de la pêche revêt tout son intérêt. En particulier, cette valorisation permettrait de lutter efficacement contre le gaspillage actuel: on estime, en effet, qu'au niveau mondial, 37% du total des captures sont perdus ou pourraient du moins être mieux utilisés [1].

Selon les statistiques de la F.A.O (1981), sur une production annuelle mondiale de 72Mt de produits de la pêche, seuls 50Mt parviennent ^{à la fabrication} réellement aux consommateurs. En effet, 17Mt servent exclusivement de farines pour bétail et 5Mt sont retirés de la consommation humaine sous forme de déchets de transformation ou de produits altérés. De plus, ces chiffres ne tiennent pas compte des quantités de poissons rejetés en mer dès leur capture (faux-poisson). Ces quantités représentent pourtant 25 à 30% du total des captures et sont partiellement valorisables [1].

Jusqu'à présent, dans ce domaine, les principales réalisations concernent la fabrication de farines pour l'alimentation animale et la production d'huiles de poisson.

La farine de poisson est l'une des principales sources de protéines animales utilisées pour l'élevage. Or cette farine est en grande partie produite avec des espèces parfaitement comestibles pour l'homme. Un remplacement au moins partiel, de ces produits par des déchets s'avère donc nécessaire.

En ce qui concerne les huiles de poisson, elles sont produites en même temps que les farines et possèdent de nombreux débouchés: fabrication de margarine pour l'alimentation humaine, d'huiles siccatives, de vernis, de lubrifiants, d'agents hydrofuges et de composés utilisés en pharmacie.

A partir des rejets des industries de transformation des produits de la pêche, on peut aussi récupérer de la chair hachée pouvant servir à fabriquer des produits destinés à la consommation humaine (croquettes, portions congelées, pâtés, saucisses de poisson, plats cuisinés surgelés).

D'autres produits secondaires, tels que arêtes broyées, écailles et autres substances non consommables par l'homme, peuvent servir de supplément protéique pour l'alimentation du bétail ou entrer dans la fabrication d'engrais de qualité supérieure.

Au cours des années 60, la fabrication de farines de poisson destinées à l'alimentation humaine a été mise au point dans le but de lutter contre la malnutrition dans les pays du tiers-monde. Ces farines, qui portent le nom de F.P.C (fish protein concentrates), n'ont jusqu'à aujourd'hui rencontré que peu de succès auprès des consommateurs. Toutefois, une amélioration du F.P.C du type B (pour lequel il n'y a pas

d'exigence relative à l'odeur ou à la saveur) pourrait entraîner un accueil plus favorable de la part de certaines populations consommant déjà des produits de la pêche de forte saveur.

La mise au point des hydrolysats a permis un progrès notable dans la fabrication des concentrés protéiques. Dans les pays d'Extrême-Orient et du Sud-Est asiatique, on procède traditionnellement à l'autolyse de poissons entiers non éviscérés afin de produire une sauce de poisson nommée: "nuoc-man". L'ensilage, quant à lui, s'applique aussi bien au poisson entier, qu'à la chair de poisson ou aux viscères et permet de produire un concentré protéique liquide utilisable pour l'alimentation animale.

L'hydrolyse enzymatique est beaucoup plus rapide et conduit à l'obtention de concentrés protéiques à haute valeur ajoutée, ainsi que de sauces de poisson, bouillons concentrés de potage, pâtés.

L'hydrolyse chimique peut également être employée mais provoque un déclassement des protéines par destruction partielle ou totale de certains acides aminés.

Enfin, il faut souligner que dans le cadre de la recherche un grand intérêt est porté à la préparation de molécules bioactives à usage industriel et pharmaceutique (exemple de la récupération de chitine à partir des rejets des industries de transformation des crustacés) [1].

Mais si l'utilisation des sous-produits de la pêche connaît déjà de multiples débouchés, cela n'empêche en rien la poursuite de l'effort de recherche dans le domaine de la valorisation de ces produits car ils présentent incontestablement beaucoup de potentialités encore inexploitées.

C'est d'ailleurs un peu dans ce cadre que vient s'inscrire notre travail qui consiste en fait en une approche globale d'un procédé de valorisation des rejets solides de poissonneries. Ce procédé est basé sur la récupération des acides aminés, contenus dans les rejets sous forme de longues chaînes protéiques, et comporte deux étapes essentielles:

- dans un premier temps l'on fera subir au rejet une hydrolyse enzymatique en vue de couper les longues chaînes polypeptidiques et donc de libérer les acides aminés et les petits peptides;

- dans un second temps l'hydrolysate ainsi obtenu fera l'objet d'une ultrafiltration afin de séparer les acides aminés et les petits peptides du reste de la biomasse.

Des analyses microbiologiques seront en outre effectuées afin d'évaluer le degré de contamination des rejets étudiés et de déterminer dans quelle mesure ces rejets peuvent se prêter au mode de valorisation étudié ici.

Ajoutons que ce mode de valorisation se devant de présenter une rentabilité optimale, l'enzyme que nous utiliserons, lors de l'étape d'hydrolyse enzymatique des rejets, sera extraite d'une matière première facilement disponible et peu coûteuse: la muqueuse stomacale de mouton.

Pour finir, soulignons qu'en Algérie un grand pas vient d'être fait dans le domaine de la valorisation des sous-produits industriels. En effet, l'article 8-20 de la loi numéro 90-36 du 31/12/1990 portant loi de finances pour 1991, stipule que: "Les nouvelles entreprises de récupération bénéficient d'une exonération totale de l'impôt sur les bénéfices industriels et commerciaux pendant une durée de trois ans à compter de la première année d'activité." [2].

~~RETROSPECTIVE~~
~~DES~~
TRAVAUX ANTERIEURS

Dans un article paru en 1976 [3], E.YANEZ, D.BALLESTER et F.MONCKBERG rapportent que l'Institut de Recherches sur la Pêche du Chili a mis au point une méthode pour produire un hydrolysât enzymatique de protéines à partir de filets de colin du Chili (*Merluccius gayi*) en utilisant la bromélaïne comme protéase.

Les auteurs de l'article ont, quant à eux, étudié les propriétés chimiques et nutritives d'un concentré de protéines de poisson obtenu par hydrolyse enzymatique de colin du Chili. Ils ont également mené une série de tests biologiques sur des rats en phase de croissance afin de déterminer la capacité de cet hydrolysât à compléter les protéines céréalières (blé, riz et maïs).

Des analyses chimiques ont montré que l'hydrolysât obtenu contenait environ 63% (N*6.25) de protéines. De plus, son profil en acides aminés indiquait que, tous les acides aminés indispensables, (Thréonine exceptée), étaient présents à des teneurs supérieures à celles établies pour l'homme, par le modèle standard élaboré en 1973 par la F.A.O/W.H.O.

Des résultats obtenus, il est ressorti que, grâce à son apport en acides aminés essentiels (Lysine notamment), le concentré de protéines de poisson analysé permettait d'améliorer la qualité nutritive des protéines céréalières. C'est ainsi que plusieurs applications ont pu être proposées pour ce type d'hydrolysât et notamment son utilisation en vue d'améliorer le régime alimentaire des populations des pays en voie de

développement.

En 1976, G.O.BUCOVE et G.M.PIGOTT [4], ont présenté une installation pilote pour la production d'un concentré de protéines de poisson par digestion enzymatique de rejets ou de sous-produits des industries de la pêche.

Dans le procédé décrit par ces auteurs, la chair de poisson est d'abord additionnée d'eau et homogénéisée avant d'être placée dans un réacteur enzymatique. L'enzyme choisie pour l'hydrolyse est la pepsine en raison de son efficacité et de la faiblesse de son pH optimal d'activité, cette condition permettant en effet, d'éviter les problèmes de contamination bactérienne lors du processus. L'hydrolyse se fait à pH 2 et à une température de 48°C. Le taux de recouvrement est alors d'environ 84.6% pour les acides aminés, de 85% pour les protéines et de 0.8% pour les lipides.

Les petits peptides résultants de l'hydrolyse étant solubles dans l'eau, ils sont séparés mécaniquement de la fraction lipidique, les boues sont, quant à elles, éliminées par centrifugation.

La fraction contenant les protéines solubles est alors recueillie et son acidité est neutralisée par passage dans un échangeur d'ions. Le liquide obtenu est finalement concentré et séché dans un atomiseur. La résine échangeuse d'ions est, quant à elle, régénérée et recyclée.

En 1978, P.A.CARROAD et R.A.TOM [5], ont publié des résultats concernant la bioconversion de rejets de chitine provenant des industries de transformation de crevettes et de crabes.

Ce procédé est basé sur l'hydrolyse enzymatique des rejets de chitine au moyen d'une chitinase extracellulaire sécrétée par

une culture microbienne sélectionnée. Il conduit à l'obtention d'un hydrolysats pouvant être converti en un produit utilisable pour l'alimentation animale par exemple.

Les résultats expérimentaux ont fait ressortir que l'utilisation de la souche *Serratia marcescens* QMB1466 était tout à fait appropriée dans le cas du processus étudié. L'hydrolyse d'une série de préparations à base de rejets de chitine a en effet montré la bonne aptitude du filtrat de la culture bactérienne citée ci-dessus à décomposer la chitine. L'hydrolyse de préparations de chitine brute broyée ralentit après 40h. Dans le cas où la chitine est sous forme colloïdale, l'hydrolyse est pratiquement complète au bout de 60h.

L.L.LIU et G.M.PIGOTT [6], ont publié, en 1981, une étude concernant un procédé économique d'hydrolyse enzymatique de protéines de poisson. Ils ont expliqué comment produire de la pepsine à bon marché par autodigestion de muqueuse d'estomac de porc provenant des abattoirs. Ils ont également déterminé les conditions optimales de température et de pH de la digestion enzymatique.

Pour cela, des études concernant les activités enzymatiques respectives d'une pepsine commerciale et de la pepsine brute ont été effectuées, d'une part sur un substrat standard: l'hémoglobine, et, d'autre part, sur de la chair de poisson.

D'après les résultats obtenus, c'est la pepsine brute préparée à pH 1.0 qui permet d'atteindre la plus haute activité et demande le moins de temps pour l'atteindre. De plus, à la fois la pepsine brute et la pepsine commerciale présentent une activité maximale à 62°C. Par ailleurs, la concentration en protéines de l'hydrolysats obtenu par digestion enzymatique de chair de poisson par une pepsine à 9% (poids de muqueuse/poids

de chair de poisson) est semblable à celle obtenue par l'hydrolyse au moyen d'une pepsine commerciale (Laboratoire SIGMA) à 1%.

Enfin, pour ce qui est de la conservation de la pepsine, les expériences ont montré que la muqueuse (entière ou hachée) est stable à -20°C durant au moins 5 mois alors que la pepsine préparée ne se conserve que pendant 10 jours à 4°C.

En 1981 toujours, E.M CIVIT, M.A.PARIN et H.M.LUPIN [7], ont fait état d'expériences ayant pour but de déterminer les conditions de température et de pH conduisant à un taux optimal de récupération des protéines et des huiles lors de la coagulation des rejets sanguins de poissonneries.

Selon ces chercheurs, la température optimale est de l'ordre de 65°C et une augmentation de la température au-delà de 75 à 80°C n'améliore pas le taux de recouvrement. La gamme optimale de pH s'étend de 5.6 à 5.9. De telles conditions de température et de pH conduisent à une réduction maximale de la D.C.O .

Enfin, un retard dans l'application du traitement entraîne une augmentation de la teneur en azote non protéique du rejet ce qui conduit à une diminution des quantités de protéines récupérées et à une réduction moins importante de la D.C.O .

En 1984, F.W.WELSH et R.R.ZALL [8], ont décrit un système de traitement à l'ultrafiltration et au charbon actif permettant de rénover les saumures réfrigérantes utilisées à bord des bateaux de pêche tout en récupérant certains sous-produits intéressants.

Les saumures usées sont d'abord ultrafiltrées à travers des membranes ayant un seuil de coupure de 30000 Daltons puis traitées au moyen de charbon de noix de coco activé. Il est ainsi possible de réduire la demande chimique en oxygène de saumures de 64.2%, l'azote Kjeldahl de 71% et les matières volatiles de 79.4%. Le rétentat obtenu a une bonne teneur en

acides aminés et ne présente pas d'accumulation de métaux lourds. Il est utilisable en tant que supplément protéique pour l'alimentation animale.

Dans un article paru en 1984 également, L.HAN CHING [9], présentait la texturation de chair de poisson comme une perspective intéressante dans la valorisation des chutes de filetage, captures accessoires et poissons de faible valeur commerciale.

Ce procédé permet, en effet, de rendre le poisson totalement "anonyme" en éliminant les caractéristiques de saveur et de texture de l'espèce concernée. A partir de chair hachée texturée, il est possible de fabriquer des succédanés de certains mollusques et crustacés (comme l'atteste le succès remporté par le succédané de chair de crabe fabriqué au Japon), de la viande de boeuf hachée et même de la chair de poisson appertisée présentant des caractéristiques physiques et gustatives proches de celles d'autres poissons nobles.

Dans une synthèse d'études sur les rejets des industries de transformation de la viande, du poisson et de la volaille, parue en 1985, W.T.MC COMIS et G.H.LITCHFIELD [10], présentent un résumé de quatre études sur l'utilisation des procédés à membrane dans le traitement des eaux usées de poissonneries. Nous reproduisons le tableau n°1 publié par ces deux auteurs.

En 1987, P.JAOUEN, P.BELLEVILLE, J.P.SCHLUMPF et F.QUEMENEUR [11], ont publié les résultats de plusieurs tests menés sur une série de membranes organiques et minérales en vue d'optimiser un procédé à membrane pour le traitement d'eaux de lavage de pulpe de poisson issues de la technologie du surimi.

Type de traitement	Conditions opératoires	Performances % d'enlèvement
-Osmose inverse appliquée aux eaux de lavage de Menhaden (Menhadenbail water)	-Seuil de coupure: 10000 (p.m) - 0.2 MPa (30 psi) -Rejet: DBO 4600 mg/l DCO 35200 mg/l MG 0.1%	DBO 98 DCO 98 MG 90
-Ultrafiltration/ charbon actif appliqués aux saumures réfrigérantes	-Seuil de coupure: 30000 (p.m) -21093 kg/m ² -37.8°C -Rejet: DCO 8720 mg/l	DCO 64.2
-Ultrafiltration appliquée aux eaux usées provenant du traitement des crabes	-Seuil de coupure: 50000 (p.m) -Rejet: solides en suspension: 700 mg/l	Solides en suspension: 99
-Ultrafiltration appliquée aux eaux usées issues de la fabrication du surimi	-0.49 MPa -< 10°C -Débit: 1.8 l/mn	Protéines: 90

Tableau n°1: Résumé des études basées sur les procédés à membrane appliqués aux eaux usées provenant du traitement du poisson[10].

Ces essais ont montré que lors de la mise en contact de solutions protéiniques (même très faiblement concentrées) et des

membranes, il se produisait, très rapidement, une adsorption de protéines sur les membranes. La perméabilité de ces dernières se trouvait alors considérablement réduite, sauf dans le cas de la membrane cellulosique hydrophile.

Lors d'essais d'ultrafiltration de solutions protéiniques en cellules agitées (cellule AMICON, membrane PM10, pH = 7.2 avec agitation et recyclage de perméat), les auteurs de l'article ont observé que la membrane se colmatait très rapidement sous l'effet de la pression. Ils ont également pu constater que le débit de perméat diminuait d'abord rapidement, à ce niveau, un arrêt de l'agitation se traduisait par une chute irréversible du débit de perméat, dans le cas contraire, ce dernier se stabilisait. La concentration de la charge (cellule MINITAN, membranes PTGC 10 kD, sans recyclage de perméat) semblait par contre ne pas avoir d'influence marquée sur le débit de perméat.

J.B. QUAGLIA et F. PAOLETTI [12], ont publié en 1988, les résultats d'une étude concernant la purification, par des techniques à membranes, d'hydrolysats enzymatiques de protéines de sardines. Ils ont, en particulier, évalué l'efficacité de l'ultrafiltration, associée ou non à la diafiltration, pour éliminer les cendres et les petits peptides responsables du goût amer de l'hydrolysate.

Ils ont utilisé un ultrafiltre AMICON DH4 équipé de membranes à fibres creuses type H1 DIAFLO, ayant un seuil de coupure de 3000 Daltons et une surface totale de 0.06m^2 . Le taux de recirculation était de 0.5 à 0.6l/mn. En associant la diafiltration 4/1 (volume d'eau distillée/volume initial d'hydrolysate) et l'ultrafiltration 85% (volume de perméat éliminé/volume initial d'hydrolysate), ils sont parvenus à éliminer presque entièrement les peptides de poids moléculaire inférieur à 2300 Daltons. De cette manière, ils leur a également

été possible de réduire la teneur en sel du résidu tout en concentrant ce dernier au maximum, réduisant ainsi les coûts ultérieurs de séchage.

Dans le cadre de son projet de fin d'études, K.DENDENE (1990) [13], a étudié l'"optimisation du procédé d'ultrafiltration pour la récupération des protéines des eaux de lavages de poisson".

La membrane utilisée est la membrane IRIS3038, elle est organique et plane, de seuil de coupure 2000 Daltons et de surface active $2.106 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$.

K.DENDENE a ainsi fixé les paramètres opératoires à:

- un flux de perméat variant de 40 à 50 l/h.m²
- une pression transmembranaire de 1.5 bar
- une vitesse de recirculation allant de 0.044 à 0.15 m/s pour un joint de 2 mm d'épaisseur.

D'autres paramètres que ceux précités influent sur le coût économique, ce sont: les paramètres techniques (choix de la membrane ...), les paramètres qui tiennent compte du prix unitaire de l'énergie, le dernier paramètre est le prix revient du produit à traiter qui prend en considération tous les procédés utilisés, de la récolte jusqu'à l'obtention du produit fini (sous forme de poudre).

Un autre projet de fin d'études effectué la même année par L.SI AMMOUR [14], est venu compléter le précédent et a eu pour thème l'"étude microbiologique et biochimique d'un concentré de protéines obtenu par digestion enzymatique de rejets de poissonneries".

Les tests microbiologiques effectués ont permis de constater une forte contamination des rejets recueillis. Cette

contamination était due aux coliformes (E.coli notamment), aux streptocoques et aux clostridium. Aucune présence de staphylocoques ou de salmonelles n'a toutefois été décelée.

Dans le cas de l'hydrolyse enzymatique, des solutions de pepsine brute, préparées à partir de muqueuse stomacale de mouton, ont été utilisées. Ce procédé présente en effet l'avantage d'être plus économique que les procédés classiques utilisant la pepsine commerciale.

Des comparaisons portant sur l'activité enzymatique de solutions de pepsine brute préparées à différents pH (1, 1.5, 1.75 et 2) ont permis de montrer que la solution d'enzyme préparée à pH 1 était la plus active. De telles solutions ont pu, en outre, être conservées une dizaine de jours à une température de 4°C. Par ailleurs, la température conduisant à une activité optimale de la pepsine s'est révélée être de 23°C (température ambiante).

Dans ces conditions de température et de pH, l'hydrolysats obtenu après quatre heures de réaction présentait une concentration en protéines de 42mg/l.

INTRODUCTION A
L'INDUSTRIE HALIEUTIQUE
EN ALGERIE

- Présentation de l'usine de Dellys
- Valeur nutritionnelle des poissons et importance des rejets

En Algérie, malgré les grandes possibilités d'exploitation qu'offrent nos 1200 km de côtes, l'industrie halieutique reste un secteur peu développé. A titre indicatif, le tableau n°2 présente quelques données concernant l'activité halieutique algérienne.

Espèces	Secteur	
	Privé	Public (ENA-PECHE)
Blancs	1659.75	13
Bleus	3769.09	93
Total	5428.84	106

Tableau n°2: Production halieutique en 1990 (tonnages)¹.

Remarques:

1-En 1989, la production privée nationale s'élevait à 5636.07 tonnes.

2-La faiblesse de la production du secteur public s'explique par l'exploitation irrationnelle de cinq unités de pêche dont quatre en activité partielle et les autres immobilisées durant toute l'année.

1 D'après les statistiques de la Division du Développement des Activités Hydrauliques et Agricoles de la Wilaya d'Alger.

Le retard accusé par l'industrie halieutique algérienne se remarque plus particulièrement encore dans le secteur de l'industrie de transformation des produits de la pêche. En effet, il existe seulement huit entreprises étatiques et quelques entreprises privées plus petites.

Les conserveries étatiques sont situées à: Ghazaouet, Béni-Saf, Oran, Ténès, Khmisti, Jijel, Collo et Dellys. La plupart d'entre elles traitent l'anchois, la sardine ou le thon. Ce sont en général des industries traditionnelles et employant une main d'oeuvre peu qualifiée. A noter cependant que l'usine de Khmisti a procédé à un renouvellement de ses équipements, quant aux conserveries de Ténès et Dellys, elles bénéficient d'installations neuves [13]. C'est d'ailleurs à l'unité de l'ENA-PECHE de Dellys que nous avons choisi d'effectuer les prélèvements qui seront nécessaires à notre étude.

1 PRESENTATION DE L'USINE DE DELLYS: [13]

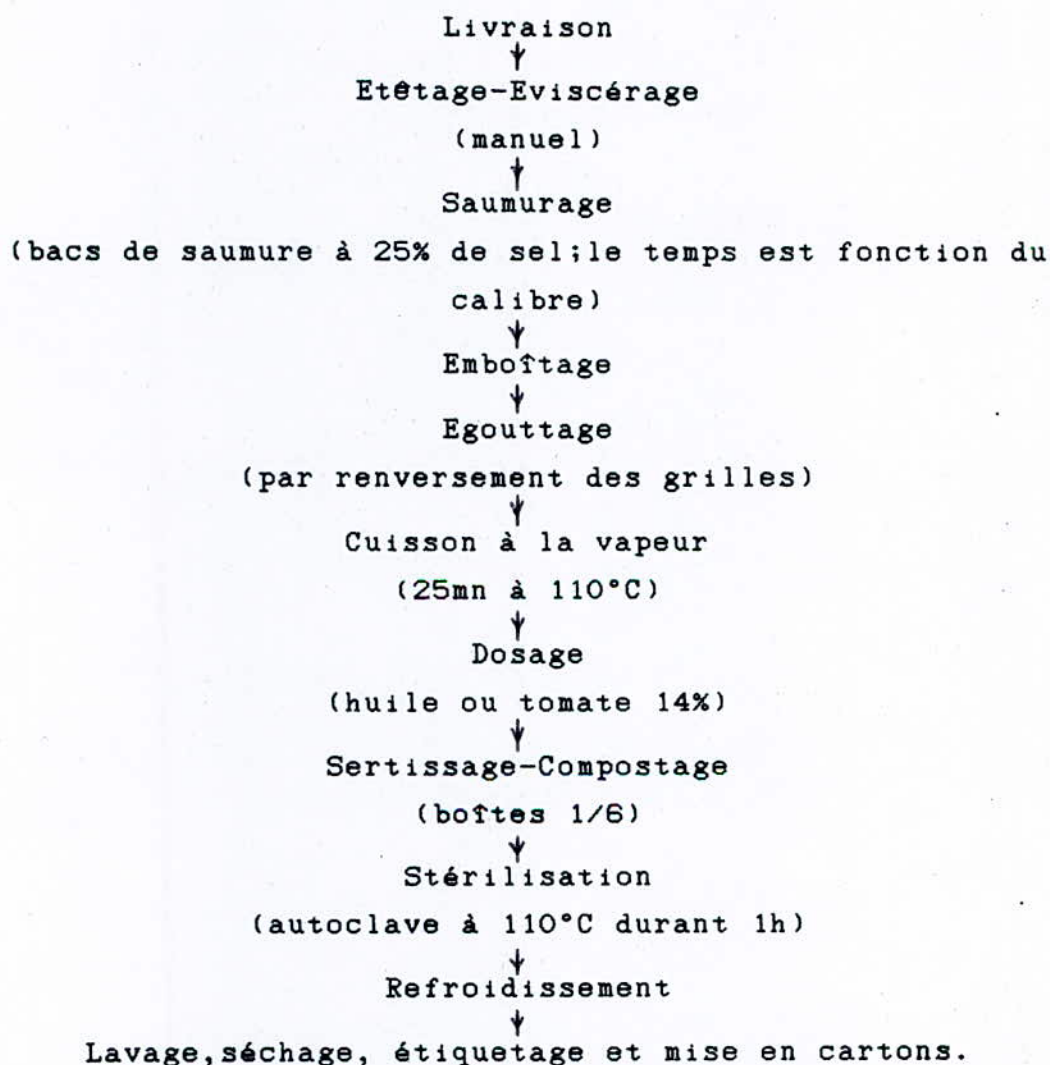
1.1 Introduction:

La conserverie de Dellys est située à environ 120 km à l'est d'Alger, juste en bordure de mer. Elle a ouvert ses portes en 1988 et bénéficie donc d'un équipement neuf. Elle assure la production de boîtes de thon et de sardine. Sa production théorique, aussi bien dans le cas du thon que dans celui des sardines, est de 10t/jour.

Ces taux n'ont, cependant jamais été atteints jusqu'à présent et ceci en raison du manque d'eau et de matières premières. En effet, la production de conserves de sardines est dépendante des quantités pêchées localement, quant au thon, il doit être importé (le plus souvent de Mauritanie ou de Guinée). En fait, le rendement est de l'ordre de 30 à 40% de la production théorique.

Les différentes phases de la fabrication des conserves de poisson au niveau de l'usine, sont représentées dans le schéma suivant.

1.2 Schéma de la chaîne de production (cas des sardines):



1.3 Résidus liquides et solides de la chaîne de production:

Il semble bien évident que l'activité de la conserverie nécessite une grande consommation d'eau. Les plus grandes quantités sont consommées juste après l'étape

d'étêtage-éviscération lorsque les sardines sont lavées en même temps que les déchets sont entraînés par pression d'eau. Selon un responsable de l'usine, cette opération nécessiterait environ 15 m³ d'eau/jour.

Mais d'autres lavages doivent encore être effectués à l'emboîtement, après le sertissage et à la sortie de l'autoclave.

Rappelons par ailleurs, que les bassins de saumure (qui dans le cas du thon, par exemple, sont renouvelés 2 fois par jour) constituent une forme particulière de rejets liquides [8].

Enfin, soulignons que toute l'eau usée engendrée par l'activité de l'usine est directement déversée dans la mer, ce qui risque bien entendu de poser, à terme, de sérieux problèmes de pollution locale.

Pour ce qui est maintenant des rejets solides, leurs quantités sont également loin d'être négligeables. On estime que dans le cas des sardines, 25% du poids de la matière première est perdu sous forme de déchets. Ceux-ci sont produits essentiellement lors des opérations d'étêtage et d'éviscération. Dans le cas du thon, les pertes occasionnées par l'étêtage-éviscération, le découpage et le parage des poissons sont encore beaucoup plus importantes puisqu'elles atteignent 60% du poids de la matière première.

A titre d'exemple, considérons les deux types de production et supposons que l'unité traite, dans chaque cas, environ 4t/jour de poissons.

On constate que les quantités rejetées sont de l'ordre de 400t/an pour la sardine et 900t/an pour le thon ce qui est assez considérable.

L'élimination de ces déchets pose, bien évidemment, quelques problèmes, d'où l'intérêt de mettre en place des installations de valorisation de ces rejets surtout lorsque l'on connaît leur grande richesse nutritive.

2 VALEUR NUTRITIONNELLE DES POISSONS ET IMPORTANCE DES REJETS:

Il est important de remarquer que la composition de la fraction non comestible des poissons (viscères, têtes, chutes de filetage,...) est très similaire à celle de la fraction comestible. A cet effet, le tableau n°3 indique la composition approximative caractéristique des poissons pêchés au chalut [4].

Constituants (% en poids)	Poisson entier	Fraction comestible	Fraction non comestible
Eau	89.9	83.6	81.2
Lipides	3.5	0.8	4.4
Protéines	12.7	15.2	11.7
Cendres	2.7	1.1	3.5

Tableau n°3: Composition approximative caractéristique des poissons pêchés au chalut [4]

2.1 Valeur alimentaire des poissons: [15]

La valeur nutritionnelle des poissons et des fruits de mer rivalise avec celle des viandes et des oeufs. Comme eux, ce sont des aliments bâtisseurs, très riches en protides, 100g nets de poisson sans déchets sont équivalents à 100g nets de viande ou à 2 oeufs. La valeur énergétique des poissons varie entre 70 et 200 calories par 100g.

Les poissons sont également très intéressants par leur apport en minéraux (iode, phosphore, un peu de fer) et en vitamines, principalement celles du groupe B. On retrouve les vitamines A et D surtout dans leurs foies. De mer ou d'eau douce, les poissons ont tous la même teneur en sodium. Seuls les crustacés et les coquillages en sont vraiment riches.

Les protides animaux, constituants essentiels de nos cellules, sont d'une grande valeur biologique. Ils sont nécessaires à la construction, pendant la croissance, à l'entretien, dans le cours normal de la vie et à la réparation, en cas de convalescence, des différents tissus de notre corps.

Aliments	Eau (% en poids)	Protides (% en poids)	Lipides (% en poids)
Colin	80	19	0.36
Merlan	81	18	0.62
Sardine (fraîche)	73	23	2.33
Maquereau	71	19	8.75
Veau	71	20	8.10
Gigot de mouton	63	17	19.00
Bifteck filet	52	22	23.62

Tableau n°4: Comparaison entre la composition des poissons et celle des viandes de boucherie.[15]

Le tableau n°5 nous rapporte la composition en acides aminés d'un hydrolysât enzymatique de filets de colin (*Merluccius gayi*) [3].

Acides aminés	g / 16 g d'azote	Acides aminés	g / 16 g d'azote
Arginine	6.5	Thréonine	3.7
Histidine	1.4	Leucine	9.5
Lysine	11.8	Isoleucine	4.4
Tyrosine	3.4	Valine	5.7
Tryptophane	1.3	Acide glutamique	17.7
Phénylalanine	3.2	Acide aspartique	13.9
Cystine	0.8	Glycine	3.9
Méthionine	3.4	Alanine	5.7
Sérine	3.5	Proline	Traces

Tableau n°5: Composition en acides aminés d'un hydrolysât enzymatique de filets de colin (en g/16g d'azote) [3] .

Dans la même référence bibliographique [3], on retrouve un tableau comparatif entre le modèle d'acides aminés essentiels obtenus à partir d'un hydrolysât de poisson et le modèle standard d'acides aminés indispensables élaboré par la F.A.O/W.H.O (1973) (voir tableau n°6).

Acides aminés	Hydrolysats enzymatique de protéines de poisson	Modèle F.A.O/W.H.O (1973)
Isoleucine	4.4	4.0
Leucine	9.5	7.0
Lysine	11.8	5.5
Méthionine + Cystine	4.2	3.5
Phénylalanine + Tyrosine	6.6	6.0
Thréonine	3.7 ²	4.0
Tryptophane	1.3	1.0
Valine	5.7	5.0
Total	47.2	36.0

Tableau n°6: Comparaison entre le modèle d'acides aminés
essentiels et le modèle standard F.A.O/W.H.O. (en g/16g
d'azote) [3]

2.2 Importance des déchets: [15]

Du fait que l'on s'intéresse à la valorisation des déchets
de poissonneries, on cite, à titre indicatif, leur importance
dans le tableau n°7.

² Cette teneur représente 93% de celle du modèle de référence
(F.A.O/W.H.O).

Proportion de la partie comestible dans les principaux
poissons: [15]

Poissons frais entiers:

Partie comestible (%
en poids)

Bar	48
Morue	48
Sole	52
Daurade	57
Maquereau	57
Raie	57
Hareng	59
Merlan	66
Saumon	67
Limande	69
Sardine	77

Poissons frais vidés:

Maquereau	61
Morue	65
Saumon	73
Sole	82
Hareng	91

Poissons conservés:

Hareng fumé, Saur	61
Sardine salée	75
Maquereau salé	77
Morue séchée	80
Saumon fumé	90

Mollusques:

Huître	17
Moule	34

Crustacés:

Crabe	44
Crevette	47

Présentation des poissons	% en poids des déchets	Poids équivalent à 100g de viande (g)
Filets	0	100
Darnes ou tranches	10 à 20	150
Poissons entiers	30 à 50	180 à 200

Tableau n°7: Importance des déchets de poissonneries [15]

ETUDE I

LA MICROBIOLOGIE

- Introduction
- Echantillon-Prélèvement
- Analyses microbiologiques
- Les normes
- Caractéristiques générales des bactéries recherchées
- Mode opératoire
- Résultats des analyses microbiologiques
- Interprétation des résultats

1 INTRODUCTION:

Au niveau de la conserverie où nos prélèvements sont effectués, le vidage des poissons se fait à l'air libre et les rejets se trouvent donc exposés à une contamination microbienne.

Le but de notre travail étant d'extraire, à partir de ces rejets, des protéines destinées à un usage alimentaire, une analyse microbiologique préalable de notre matière première s'impose afin d'évaluer son degré de contamination.

2 ECHANTILLON-PRELEVEMENT:

Notre échantillon consiste en un mélange de déchets solides issus des opérations de nettoyage et de vidage des poissons (têtes, viscères, arêtes,...). Ces rejets sont prélevés dans des flacons stériles. L'échantillon doit être transporté dans une caisse glacière à une température de 4°C environ et l'analyse doit être faite dans un délai maximum de 8 heures après le prélèvement.

Afin de pouvoir subir cette analyse microbiologique, les rejets doivent être préalablement broyés et dilués. Dans le but d'obtenir des résultats significatifs, plusieurs campagnes d'échantillonnage sont nécessaires.

3 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES:

Les tests à effectuer sont les suivants: [24]

- dénombrement des germes totaux;
- recherche des germes témoins de contamination fécale:
 - Coliformes totaux et fécaux (*Escherichia coli*);
 - Streptocoques;
 - Staphylocoques;
 - Clostridium sulfito-réducteurs*;
- recherche des Salmonelles.

La numération de la flore bactérienne globale permet d'évaluer le degré de contamination des rejets étudiés. Ainsi, plus le nombre de colonies se développant sur le milieu de culture est grand, plus la qualité microbiologique du rejet est médiocre.

La présence de Coliformes dans les rejets est un indice de contamination fécale. Afin de confirmer cette hypothèse, il faut mettre en évidence la présence d'*Escherichia coli* qui est très spécifique d'une contamination fécale.

La recherche des Streptocoques, Staphylocoques et *Clostridium sulfito-réducteurs* vise à compléter la colimétrie afin de dépister les contaminations fécales [24].

Les Salmonella possèdent un pouvoir pathogène important. Les Salmonella typhiques sont responsables de toxi-infections et d'infections sévères (fièvre typhoïde), les autres de toxi-infections ou d'intoxications (gastro-entérites) [24].

4 LES NORMES:

Pour l'interprétation des résultats de notre étude microbiologique, nous disposons des deux normes suivantes:

- la norme adoptée par la société SEAH INTERNATIONAL [1], qui produit un extrait naturel de poisson destiné à la consommation humaine. La qualité bactériologique de ce produit se définit comme suit:

Salmonelles	Absence dans 25g.
Staphylocoques pathogènes	Absence dans 1g.
Coliformes et E.coli	Absence dans 1g.
Anaérobies sulfito-réducteurs	Absence dans 1g.
Anaérobies mésophiles totaux	Inférieur à 10000 germes dans 1g.
Levures et moisissures	Inférieur à 100 organismes dans 1g.

-La norme adoptée par une entreprise japonaise [1] produisant des analogues de produits de la mer dont les caractéristiques bactériologiques sont:

Flore totale	< 300/g de produit final.
Staphylococcus	< 3/g.
staphylococcus à coagulase	0/g.
Coliformes totaux	< 3/g.
Coliformes fécaux	0/g.

5 CARACTERISTIQUES GENERALES DES BACTERIES RECHERCHEES:

5.1 Les Coliformes, Escherichia coli et les Salmonelles: [24]

Ces germes appartiennent tous à la famille des Entérobactériaceae. Ils possèdent les caractères généraux suivants:

- ce sont des bacilles ou coccobacilles;
- ils sont: Gram-, oxydase-, asporulés;
- ils réduisent les nitrates en nitrites;
- ils fermentent le glucose;
- ils sont anaérobies facultatifs;
- certaines espèces sont mobiles grâce à une ciliation péritriche, les autres espèces sont immobiles.

De plus, en ce qui concerne les *Escherichia coli*: ils sont mobiles, fermentent le glucose avec production de gaz et sont également lactose+ et indole+ [24].

Les *Salmonelles* sont quant à elles: lactose-, saccharose-, H_2S + et indole- [24].

5.2 Les Streptocoques:

Ils appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*. Leurs caractères généraux sont les suivants: [24]

- Gram +;
- asporulés;
- catalase-: il n'y a pas de dégagement gazeux par la culture au contact d'eau oxygénée à 10%;
- généralement, ils sont regroupés en paires ou en chaînettes de longueur variable;
- le plus souvent, ils sont immobiles;
- ils sont anaérobies facultatifs généralement micro-aérophiles.

5.3 Les Staphylocoques:

Ce genre fait partie de la famille des *Micrococcaceae*. Ses caractéristiques générales sont: [24]

- coques Gram+;
- immobiles;
- asporulés;
- groupés généralement en amas irréguliers;
- catalase+;
- aérobies ou anaérobies;
- fermentation anaérobie du glucose.

5.4 Les Clostridium sulfito-réducteurs:

Ce groupe fait partie du genre *Clostridium* qui lui même appartient à la famille des *Bacillaceae*. Ses caractères généraux sont: [24]

- bacilles Gram+;
- souvent de grande taille, isolés ou en chaînette;
- généralement mobiles;
- sporulés;
- catalase-;
- anaérobies stricts;
- en général mésophiles, ils supportent des variations assez importantes de pH et de température;
- se multiplient facilement sur les milieux ordinaires en anaérobiose;
- saccharolytiques ou protéolytiques selon les espèces et fréquemment gazogènes.

6 MODE OPERATOIRE:

Notons qu'il est évident qu'afin d'obtenir des résultats valables, il est indispensable de travailler dans les conditions les plus aseptiques possibles. Ainsi, la paillasse sera toujours bien nettoyée à l'eau de Javel avant de débiter toute analyse. Par ailleurs, toutes les opérations liées aux ensemencements seront effectuées à proximité d'une flamme. Enfin, tous les instruments à utiliser devront être stériles.

6.1 Choix de la solution mère pour les analyses microbiologiques:

lors d'analyses microbiologiques d'un échantillon quelconque, on ne tient compte que des dénombrements de germes qui donnent un résultat compris dans l'intervalle 30 à 300

5.4 Les Clostridium sulfito-réducteurs:

Ce groupe fait partie du genre *Clostridium* qui lui même appartient à la famille des *Bacillaceae*. Ses caractères généraux sont: [24]

- bacilles Gram+;
- souvent de grande taille, isolés ou en chaînette;
- généralement mobiles;
- sporulés;
- catalase-;
- anaérobies stricts;
- en général mésophiles, ils supportent des variations assez importantes de pH et de température;
- se multiplient facilement sur les milieux ordinaires en anaérobiose;
- saccharolytiques ou protéolytiques selon les espèces et fréquemment gazogènes.

6 MODE OPERATOIRE:

Notons qu'il est évident qu'afin d'obtenir des résultats valables, il est indispensable de travailler dans les conditions les plus aseptiques possibles. Ainsi, la paillasse sera toujours bien nettoyée à l'eau de Javel avant de débiter toute analyse. Par ailleurs, toutes les opérations liées aux ensemencements seront effectuées à proximité d'une flamme. Enfin, tous les instruments à utiliser devront être stériles.

6.1 Choix de la solution mère pour les analyses microbiologiques:

lors d'analyses microbiologiques d'un échantillon quelconque, on ne tient compte que des dénombrements de germes qui donnent un résultat compris dans l'intervalle 30 à 300

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

6.2 Préparation de la solution mère et des différentes dilutions:

Les rejets solides prélevés au niveau de la conserverie sont passés au mixer afin d'obtenir un mélange homogène et liquide. Ce mélange est utilisé pour préparer la solution mère.

A partir de cette solution, on réalise une série de dilutions décimales successives. Pour cela, on prend 5 tubes contenant chacun 9ml d'eau distillée stérile (ces tubes doivent être numérotés de 1 à 5 afin de pouvoir être facilement identifiés par la suite). Prélever alors 1ml de solution mère, l'introduire dans le tube portant le numéro 1 et bien homogénéiser le mélange ainsi obtenu. On a ainsi préparé une dilution au 1/10 ou 10^{-1} .

A partir de cette dilution, on renouvelle l'opération décrite ci-dessus afin de réaliser une dilution 10^{-2} . On poursuit ce travail jusqu'à obtenir une dilution 10^{-5} .

6.3 Dénombrement des germes totaux: [14]

La gélose TGEA est portée à une température d'environ ~~100~~⁴⁵°C (au bain-marie) afin d'être liquéfiée. Par ailleurs, on ensemence une série de boîtes de pétri en déposant à chaque fois dans deux boîtes 1ml d'une des deux dilutions préparées.

On coule ensuite la gélose en surfusion dans les boîtes de pétri, on homogénéise la préparation par des mouvements circulaires. L'incubation se fait dans une étuve à 37°C pendant 24 heures pour une moitié des boîtes, l'autre moitié est incubée à 20°C durant 72 heures.

Dans les boîtes incubées à 37°C, vont surtout se développer des colonies vivant habituellement dans les

organismes humains ou animaux. Par contre, dans les autres boîtes, ce sont essentiellement les bactéries de l'environnement qui vont se multiplier.

6.4 Recherche des Coliformes totaux et fécaux: [14]

6.4.1 Test présomptif:

A partir de la solution mère et de chaque dilution, on ensemence à chaque fois 4 boîtes de milieu Mc Conkey par 1ml. Deux de ces boîtes sont incubées à 37°C pour le dénombrement des Coliformes totaux, les deux autres sont incubées à 44°C. Le temps d'incubation est de 24 heures. Les colonies de Coliformes sont petites, de forme arrondie, de couleur rouge et possèdent un éclat métallique au milieu.

6.4.2 Test confirmatif:

Afin de détecter la présence des Coliformes fécaux, *Escherichia coli* en particulier, on prélève les bactéries à partir d'une culture qui a été incubée à 44°C.

E. coli est en effet thermo^{phile} et donc, dans une culture qui a été incubée à 44°C, on va surtout trouver des *E. coli*, ce qui va faciliter leur mise en évidence.

Par ailleurs, *E. coli* ainsi qu'un certain nombre de Coliformes ont la propriété de transformer le tryptophane en acide indolcarbonique qui, sous l'influence d'une décarboxylase, donne naissance à de l'indole (les germes non indolgènes arrêtent leur action au stade de l'acide indolcarbolique). Le réactif servant à la mise en évidence de l'indole est le réactif de Kovacs.

A partir de chaque boîte "positive" provenant du test précédent, on ensemence deux tubes d'eau peptonée exempte

d'indole par des bactéries provenant d'une colonie isolée de Coliformes. Le prélèvement est effectué à l'aide d'une anse à ensemencer à boucle. On incube à 44°C durant 24 heures.

Après incubation, on introduit dans les tubes positifs, 5 à 6 gouttes de réactif de Kovacs. L'apparition d'un anneau rouge en surface indique la production d'indole et confirme la présence d'E coli.

6.5 Recherche des Streptocoques fécaux: [24]

6.5.1 Test présomptif:

A partir de chaque dilution, on ensemence deux tubes de milieu de Rothe S/C et deux tubes de milieu de Rothe D/C, par respectivement 1ml et 10ml. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures. On considérera comme positifs les tubes présentant un contenu d'aspect trouble.

6.5.2 Test confirmatif:

A partir de chacun des tubes positifs provenant du test présomptif, on ensemence un milieu EVA Litzky. Les tubes sont alors incubés à 37°C pendant 24 heures. Un aspect trouble dans les tubes confirme la présence de Streptocoques fécaux.

Pour le dénombrement des Streptocoques fécaux, on utilise la méthode de Mac Grady qui nous donne le nombre le plus probable (NPP).

6.5.3 Méthode de Mac Grady: [24]

Cette méthode a pour principe le fait qu'après ensemencement d'un milieu liquide, toute croissance microbienne indique la présence d'au moins un germe.

Une gamme de dilutions décimales est effectuée à partir de la solution mère. Le milieu de culture choisi est préalablement réparti stérilement à raison de 9ml par tube. Deux tubes de ce milieu sont alors ensemencés par 1ml de la suspension brute de chaque dilution (ceci entraîne un nouveau facteur 10 de dilution).

Après culture, on procède à la lecture des résultats. Pour une série de cultures issues de la même dilution, on compte le nombre de tubes positifs soit: 0, 1 ou 2 tubes. On forme alors un nombre caractéristique. Il est composé de trois chiffres correspondant à trois dilutions successives, la première étant la plus concentrée et ayant donné un résultat positif pour les deux tubes.

Par exemple dans le cas d'une dilution en double (tableau n°I.1):

Dilution d'ensemencement	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Dilution dans le tube de culture	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	-	-	-
	2	2	2	1	0	0

Tableau n°I.1: Exemple d'une dilution en double.

le nombre caractéristique sera de 210.

L'interprétation de ce résultat se fait grâce aux tables de Mac Grady. Ces dernières se basent sur des données statistiques et donnent pour chaque nombre caractéristique le nombre de germes le plus probable dans 1ml de tube ayant servi à ensemencer le tube de culture correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique. La concentration de départ est calculée en tenant compte des dilutions effectuées.

Dans l'exemple considéré, la lecture des tables donne: 6.0 .Le tube correspondant au 2 a été ensemencé avec le tube de dilution 10^{-2} . Donc, la dilution 10^{-2} contient 6germes/ml et la suspension de départ contient 6.10^2 germes/ml.

Théoriquement, le chiffre correspondant à la dilution suivant la dernière utilisée doit être un zéro. Si ce n'est pas le cas, on ajoute la valeur obtenue au dernier chiffre du nombre caractéristique. Par exemple 3211 dans une série à trois tubes se traduira par 322.

Quand le nombre de micro-organismes est faible dans la solution mère, on peut ne pas obtenir le chiffre maximum possible pour le premier tube. Dans ce cas, on prend les chiffres correspondant aux trois premiers tubes quels qu'ils soit.

Lorsque les dilutions sont insuffisantes et que plusieurs chiffres du nombre caractéristique correspondent au nombre maximum possible, on prend les chiffres correspondant aux trois dilutions les plus fortes.

Lorsque des tubes peu dilués négatifs précèdent des tubes positifs, il peut s'agir d'une inhibition due au produit de départ et qui disparaît avec la dilution. On ne tient pas compte alors des tubes négatifs, par exemple: 0022110 se traduit par 211.

Le tableau n°1.2 donne la table de Mac Grady pour une série de deux tubes par dilution.

Remarque:

Cette méthode s'applique aussi pour des séries de 3 et 5 tubes par dilution, le nombre de germes est alors donné par d'autres tables.

Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0
001	0.5
010	0.5
011	0.9
020	0.9
100	0.6
101	1.2
110	1.3
111	2.0
120	2.0
121	3.0
200	2.5
201	5.0
210	6.0
211	13.0
212	20.0
220	25.0
221	70.0
222	110.0

Tableau n° 1.2: Table de Mac Grady pour une série de deux tubes.

6.6 Recherche des Staphylocoques:

Le milieu Chapman-Mannitol est liquéfié à une température de 45°C environ. Il est ensuite coulé dans des boîtes de pétri préalablementensemencées par 1ml d'une des solutions préparées. Ces boîtes sont alors incubées à une température de 37°C pendant 48 heures.

La présence des Staphylocoques se signale par l'apparition de colonies entourées d'un halo clair jaunâtre résultant de

l'hydrolyse du mannitol par les Staphylocoques (en effet, ceci engendre une production d'acide se traduisant par un virage du rouge au jaune du phénol contenu dans le milieu).

6.7 Recherche des Clostridium sulfito-réducteurs: [24], [14]

Pour chaque dilution, on réalise deux essais:

à partir de chacune des dilutions préparées, prélever 1ml et l'introduire dans un tube à hémolyse stérile. Les tubes sont maintenus à une température de 80°C dans un bain-marie et durant 20 minutes, cette opération ayant pour but la destruction de toute forme végétative (sélection des formes sporulées).

On ensemence alors des boîtes de pétri par 1ml de chaque dilution préalablement refroidie et on y coule de la gélose viande-foie (VF) que l'on aura liquéfiée auparavant et additionnée d'alun de fer et de sulfite de sodium.

On homogénéise les préparations ainsi obtenues et lorsqu'elles sont solidifiées, on les recouvre d'une seconde couche (assez épaisse) de gélose VF, ceci pour être certains que des conditions d'anaérobiose stricte ont été établies.

Les boîtes sont incubées à 37°C durant 24 heures. Les Clostridium se manifestent par l'apparition de colonies noires caractéristiques.

6.8 Recherche des Salmonella: [24], [14]

Les Salmonella se trouvent toujours en très petit nombre à l'état naturel et n'ont pas tendance à se multiplier rapidement. On doit donc utiliser un milieu d'enrichissement afin d'obtenir un nombre suffisant de Salmonella.

Pour cela, on utilise le milieu au sélénite contenant un antiseptique sélectif, dont le rôle est d'inhiber la croissance des germes saprophytes qui pourraient masquer la présence des Salmonella.

Pour commencer, introduire 25 g de solution mère dans 125ml de milieu d'enrichissement et incuber ce mélange à 37°C durant 24 heures.

Effectuer ensuite un repiquage d'un milieu d'enrichissement vers le milieu d'isolement, ce dernier étant dans notre cas le milieu SS (Shigella-Salmonella). Pour cela couler la gélose SS en boîtes de pétri, ensemercer ensuite ces dernières et les incuber à 37°C pendant 24 heures.

Les germes Salmonella-Shigella sont lactose- et leur présence se manifeste par l'apparition de colonies transparentes et incolores (les colonies lactose + sont par contre de couleur rouge).

7 RESULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES:

Dans ce qui suit, on fait une récapitulation des résultats des analyses microbiologiques et une comparaison avec ceux obtenus par L.SIAMMOUR [14].

Date du pr élévement	Résultats	Résultats de L.SIAMMOUR [14] (1990)
-------------------------	-----------	--

GERMES TOTAUX

07/05/91	22°C	37°C	22°C	37°C
	19.10 ³ ger/ml 497.10 ³ ger/g	584250 ger/ml 134378 ger/g	-	20000 ger/ml dans la dilution 10 ⁻⁴
12/06/91	>1.5.10 ³ ger/ml (ND) >3.45.10 ⁷ ger/g (ND)			

COLIFORMES TOTAUX

12/06/91	272500 ger/ml 63.10 ³ ger/g	6000 ger/g
----------	---	------------

COLIFORMES FECAUX(E.coli)

12/06/91	28.10 ³ ger/ml 6474 ger/g	Très grand nombre d'E.coli
----------	---	----------------------------

STREPTOCOQUES FECAUX

12/06/91	5500.10 ³ ger/ml 1265.10 ³ ger/g	13000 ger/g
----------	---	-------------

STAPHYLOCOQUES

12/06/91	8000.10 ³ ger/ml 1840.10 ³ ger/g	0
----------	---	---

CLOSTRIDIUM SULFITO-REDUCTEURS

12/06/91	-	300 ger/g
----------	---	-----------

SALMONELLA

//	-	0
----	---	---

Remarques:

1-On remarque une contamination très prononcée et variée, notamment d'origine fécale.

2-Par comparaison avec les résultats de L.SIAMOUR [14], on remarque que la contamination est variable dans le temps.

8 INTERPRETATION DES RESULTAS: (du 12/06/91)

Le dénombrement des germes totaux révèle une contamination très poussée des rejets solides de poissonneries, que ce soit par les bactéries de l'environnement ou par les bactéries que l'on rencontre généralement dans les corps humains et animaux (plus de $3.45.10^7$ germes/g dans les deux cas).

Les Coliformes totaux en général et fécaux (E.coli) en particulier, qui entre autres font partie des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux [24] (donc des poissons), ont été aussi fortement présents (63.10^3 germes/g pour les Coliformes totaux et 6474 germes/g pour les fécaux).

Ces bactéries sont fréquemment des contaminants alimentaires d'origine fécale (E.coli par exemple), capables de dégradation importante [24].

Néanmoins, en microbiologie alimentaire, les Coliformes ne sont jamais très pathogènes. Lorsqu'ils sont en nombre élevé (comme c'est le cas pour nos analyses), les Coliformes peuvent provoquer des intoxications alimentaires [24].

On retrouve les Streptocoques fécaux au nombre de 1265.10^3 germes/g, ils sont témoins de contamination fécale, mais, ils ne sont généralement pas pathogènes [24].

Quant aux Staphylocoques que l'on retrouve à 1840.10^3 germes/g, ils ne sont en général pas pathogènes.

L'hydrolysate des rejets solides de poissonneries étant destiné à rentrer dans la composition de l'alimentation animale comme additif protéique, ces rejets doivent être absolument décontaminés.

La technique de stérilisation à utiliser se doit de préserver la fragilité des rejets de par leur thermosensibilité due à la présence de substances dénaturables par la température, par exemple: les protéines.

On recommande donc la tyndallisation. Celle-ci consiste en une série de trois pasteurisations de 1 heure à 70 à 80°C, séparées par un intervalle de 24 heures à température ambiante, ce qui permet la germination puis la destruction des spores sans l'emploi d'une température excessive [24].

ETUDE II

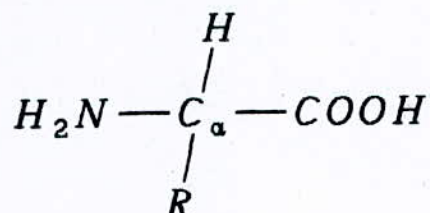
LA BIOCHIMIE

- Les acides aminés
- Les protéines
- Les enzymes
- Ciné tique enzymatique
- Préparation des solutions de pepsine
- Détermination des conditions optimales d'activité de la pepsine brute
- Etude expérimentale de la cinétique enzymatique
- Etude expérimentale de l'hydrolyse enzymatique des rejets de poissonneries

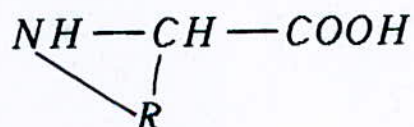
1 Les ACIDES AMINES:

1.1 Introduction:

L'hydrolyse chimique ou enzymatique des protéines conduit à la formation d'acides aminés libres de structure générale:



à l'exception de la proline qui est un acide iminé.



Les acides aminés (proline exceptée), ont donc en commun une fonction amine primaire et une fonction carboxyle portées toutes deux par le carbone central ou C_α [17].

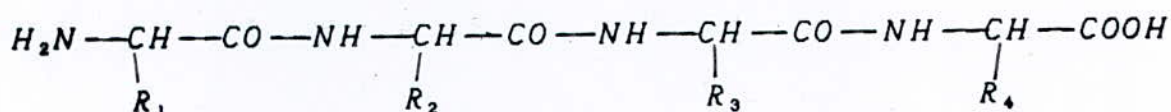
On classe les acides aminés selon la nature de leur radical R, ce dernier pouvant être:

- un atome d'hydrogène, comme dans le cas de la Glycine;
- une chaîne aliphatique, un cycle ou un hétérocycle [16].

La réaction entre le groupement carboxyle ($-\text{COOH}$) d'un aminoacide et le groupement amine ($-\text{NH}_2$) d'un autre aminoacide, conduit à la formation d'une liaison amide entre ces deux acides aminés. Dans ce cas particulier, la liaison est appelée liaison peptidique.

Exemple:

structure schématique d'un tétrapeptide (peptide formé de 04 acides aminés) [18].



Les aminoacides communs aux protéines naturelles (aussi bien d'origine animale que végétale ou bactérienne) sont au nombre de vingt et ne diffèrent que par la nature de leur groupement R. La très grande diversité des protéines ne provient en fait, que du nombre d'acides aminés accolés l'un après l'autre et de l'ordre de leur enchaînement.

Certains acides aminés doivent être apportés par l'alimentation car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme. Chez l'homme, 8 acides aminés semblent essentiels, ce sont: la Leucine, l'Isoleucine, la Lysine, la Méthionine, la Phénylalanine, la Thréonine, le Tryptophane et la Valine [16].

Signalons aussi, qu'en plus des vingt aminoacides communs, il existe des aminoacides rares qui ont été isolés de l'hydrolysat de protéines très spécialisées et qui apparaissent par modifications des acides aminés communs.

Dans les cellules vivantes, il existe aussi environ 150 autres aminoacides se présentant soit à l'état libre soit à l'état combiné mais qui n'existent dans aucune protéine [16].

1.2 Propriétés générales des acides aminés:

1.2.1 Propriétés optiques:

A l'exception de la Glycine, tous les acides aminés ont un carbone asymétrique. Ils présentent donc un pouvoir rotatoire. "Les acides aminés naturels ont la même configuration que le L-glycéraldéhyde. On dit qu'ils sont de la série L quelque soit le sens de leur pouvoir rotatoire" [18].

Certains acides aminés possèdent un deuxième carbone asymétrique.

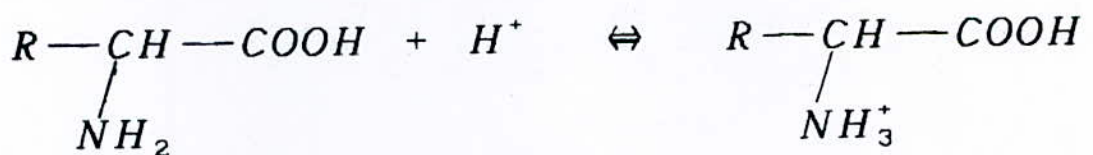
1.2.2 Propriétés spectrales:

Les acides aminés n'absorbent pas dans le visible (400 à 750nm). Dans l'UV, trois aminoacides présentent un maximum à 280nm et ceci en raison de la présence d'un cycle dans leur structure. Ces trois acides aminés sont: le Tryptophane, la Tyrosine et la Phénylalanine [16].

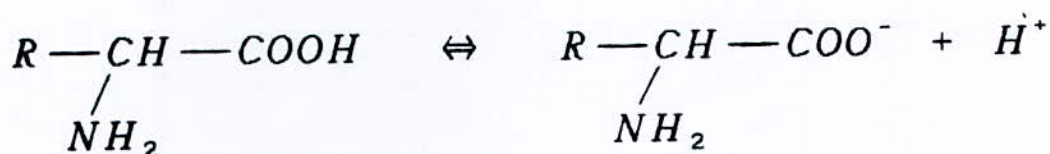
1.2.3 Propriétés acido-basiques:

Les acides aminés ont deux groupements ionisables: le carboxyle ($-\text{COOH}$) et l'amine ($-\text{NH}_2$). Leur ionisation varie avec le pH. Ainsi:

-en milieu acide, l'amine s'ionise tandis que la dissociation du carboxyle rétrograde:



-en milieu basique, le carboxyle s'ionise mais l'ionisation de l'amine rétrograde:

Remarque:

Les acides aminés possèdent à la fois des propriétés acides et basiques, ce sont des composés amphotères.

Aux pH intermédiaires, la dissociation des 2 groupements polaires varie en fonction du pH. Le pH pour lequel les deux dissociations sont égales est appelé point isoélectrique et noté pH_i . A ce pH, il se forme un ion mixte ou zwitterion: $^+H_2N-CH_2-COO^-$, de charge globale nulle. Cet ion ne migre donc pas lorsqu'il est placé dans un champ électrique [18].

1.2.4 Solubilité et point de fusion: [16]

Les acides aminés possédant des groupements ionisables, ils sont solubles dans les solvants polaires tels que l'eau ou l'alcool, et insolubles dans les solvants apolaires tels que le benzène, l'hexane ou l'éther.

Le point de fusion des acides aminés est élevé ($> 200^\circ C$).

1.2.5 Réactivité chimique:

La réactivité chimique des acides aminés est due à la présence de la fonction acide carboxylique et de la fonction amine du carbone α . La nature du radical R peut toutefois intervenir.

2 Les PROTEINES:

2.1 Définition:

Les protéines sont des polymères formés de l'union d'acides aminés. Ces derniers sont reliés par des liaisons peptidiques [18].

Il existe une énorme variété de protéines différentes [18], ceci étant dû à la fréquence d'apparition de chaque acide aminé dans la chaîne, ainsi que la place qu'il y occupe. Ces deux faits conditionnent les propriétés physico-chimiques et le rôle biologique de la protéine, donc son identité [21].

Malgré cette grande diversité, les protéines possèdent un ensemble de propriétés communes dont, les niveaux d'organisation ou de structure.

2.2 Les niveaux d'organisation des protéines:

2.2.1 Structure primaire:

Cette structure indique la composition ainsi que le mode d'agencement des acides aminés dans la protéine [16].

2.2.2 Structure secondaire:

La majorité des protéines ont une organisation dans l'espace bien déterminée dont dépendent certaines propriétés physico-chimiques ou biologiques de la molécule. Ceci est largement lié à leur composition en acides aminés [23]. Deux types d'organisation sont observés:

-La structure en feuillet β :

Elle est caractérisée par une extension maximale des chaînes polypeptidiques, compte tenu des angles des liaisons entre les différents atomes constituant ces chaînes [23].

-La structure en hélice α :

Elle est caractérisée par un enroulement hélicoïdal de la chaîne polypeptidique à raison de 3.6 aminoacides par tour d'hélice.

Ces structures sont stabilisées par des liaisons hydrogène. Une chaîne polypeptidique peut présenter l'une ou l'autre de ces deux structures ou encore les deux en même temps [23].

2.2.3 Structure tertiaire:

Les chaînes polypeptidiques peuvent adopter une configuration plus compacte dans l'espace. Ce repliement est régi par des interactions entre chaînes latérales d'acides aminés, notamment entre deux motifs Cysteine [11], formant ainsi des liaisons disulfures [23].

2.2.4 Structure quaternaire:

Les protéines les plus complexes résultent de l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques ayant leur structure propre, l'association plurimoléculaire étant stabilisée par des liaisons généralement faibles, les sous unités pouvant être identiques entre elles ou différentes.

3 Les ENZYMES:

Les enzymes sont des catalyseurs de réactions biochimiques.

3.1 Structure des enzymes:

Du point de vue de leur structure, on divise les enzymes en deux catégories:

- les enzymes entièrement protéiques;
- les enzymes formées de deux parties; l'une protéique appelée apoenzyme, l'autre non protéique dite coenzyme.

3.2 Coenzymes:

La réaction chimique se produit avec la coenzyme et non avec la protéine. La protéine intervient dans la spécificité de la réaction, donc dans la fixation du substrat. L'apoenzyme intervient dans la nature de la réaction se produisant au niveau de la coenzyme.

3.3 Site actif:

Dans les enzymes sans coenzymes, c'est la protéine qui intervient dans la réaction enzymatique. En fait, la totalité de la protéine n'intervient pas directement, seule une petite partie est mise en jeu. C'est ce que l'on appelle le site actif.

Le site actif peut être constitué par plusieurs acides aminés qui ne sont pas nécessairement voisins sur la chaîne polypeptidique, mais le sont dans l'espace du fait de la structure second-tertiaire de la molécule. La destruction de cette structure, inactive l'enzyme en éloignant les acides aminés normalement voisins.

4 CINE -TIQUE ENZYMATIQUE: [18]

Le phénomène fondamental de l'action enzymatique est que pour agir, l'enzyme doit se combiner au substrat. Après formation du complexe, le substrat est transformé en produit et est libéré. L'enzyme retrouve sa structure primitive.

4.1 Vitesse de réaction en fonction du temps:

L'expression de la vitesse de disparition du substrat est:

$$-\frac{dS}{dt} = KS^n \quad (II.1)$$

où:

-dS: diminution de la quantité de substrat,

dt: variation du temps,

S: concentration du substrat,

n: ordre de la réaction,

K: constante.

Les réactions d'ordre un jouent un grand rôle dans les phénomènes physiques et biologiques. La courbe de concentration du substrat en fonction du temps est une exponentielle décroissante.

4.2 Vitesse de réaction en fonction de la quantité d'enzyme:

La courbe (figure n°II.1) ne part pas de l'origine, la réaction a lieu en absence d'enzyme mais lentement.

Les réactions enzymatiques se font en général avec excès de substrat. Dans ces conditions, la vitesse est proportionnelle à la quantité d'enzyme dans le milieu. Ceci cesse d'être vrai lorsque la quantité d'enzyme augmente au point que l'on n'est plus en excès de substrat.

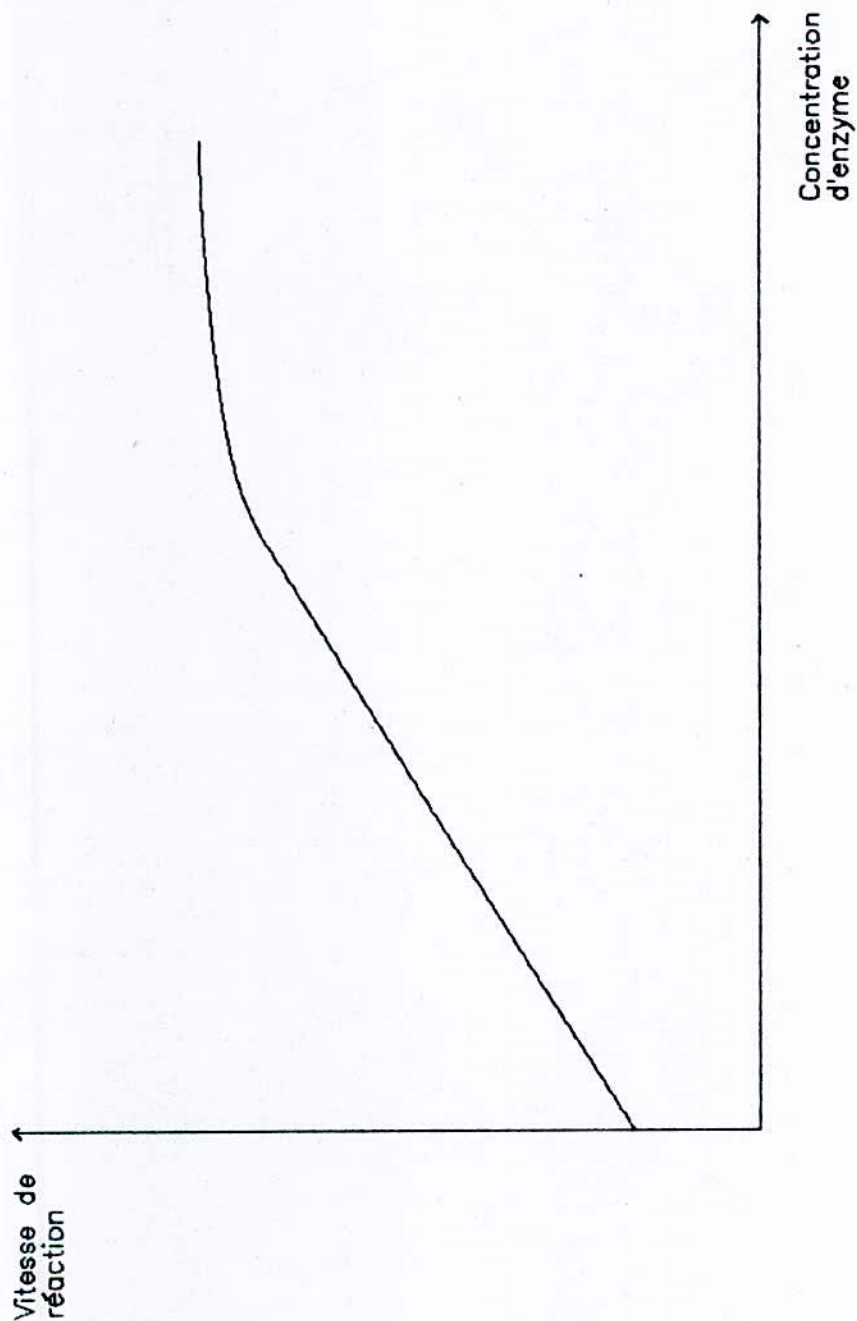
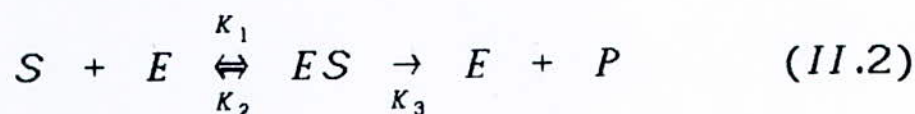


Figure II.1: Vitesse de réaction en fonction de la quantité d'enzyme.

4.3 Vitesse de réaction en fonction de la concentration de substrat:

La vitesse de réaction n'est pas proportionnelle à la concentration de substrat. Elle augmente avec la concentration puis tend à devenir constante, la courbe tendant vers une asymptote qui est la vitesse maximale, proportionnelle à la quantité d'enzyme (figure n°II.2).

L'équation qui régit la réaction enzymatique est:



où:

[S]: concentration de substrat,

[E]: concentration de l'enzyme totale,

[ES]: concentration de l'enzyme combinée,

[E]-[ES]: concentration de l'enzyme non combinée.

K_1, K_2, K_3 : constantes de vitesse

La vitesse initiale de réaction est proportionnelle à [ES].

La vitesse de formation de ES est proportionnelle à la concentration du substrat et de l'enzyme libre.

$$\frac{d[ES]}{dt} = K_1[S]([E]-[ES]) \quad (II.3)$$

La concentration de S étant élevée, on peut négliger la quantité combinée à l'enzyme et écrire l'équation (II.3):

La vitesse de disparition de ES est proportionnelle à sa concentration:

$$-\frac{d[ES]}{dt} = K_2[ES] + K_3[ES] \quad (II.4)$$

Lorsque les vitesses de formation et de disparition sont égales:

$$K_1[S]([E]-[ES]) = K_2[ES] + K_3[ES] \quad (II.5)$$

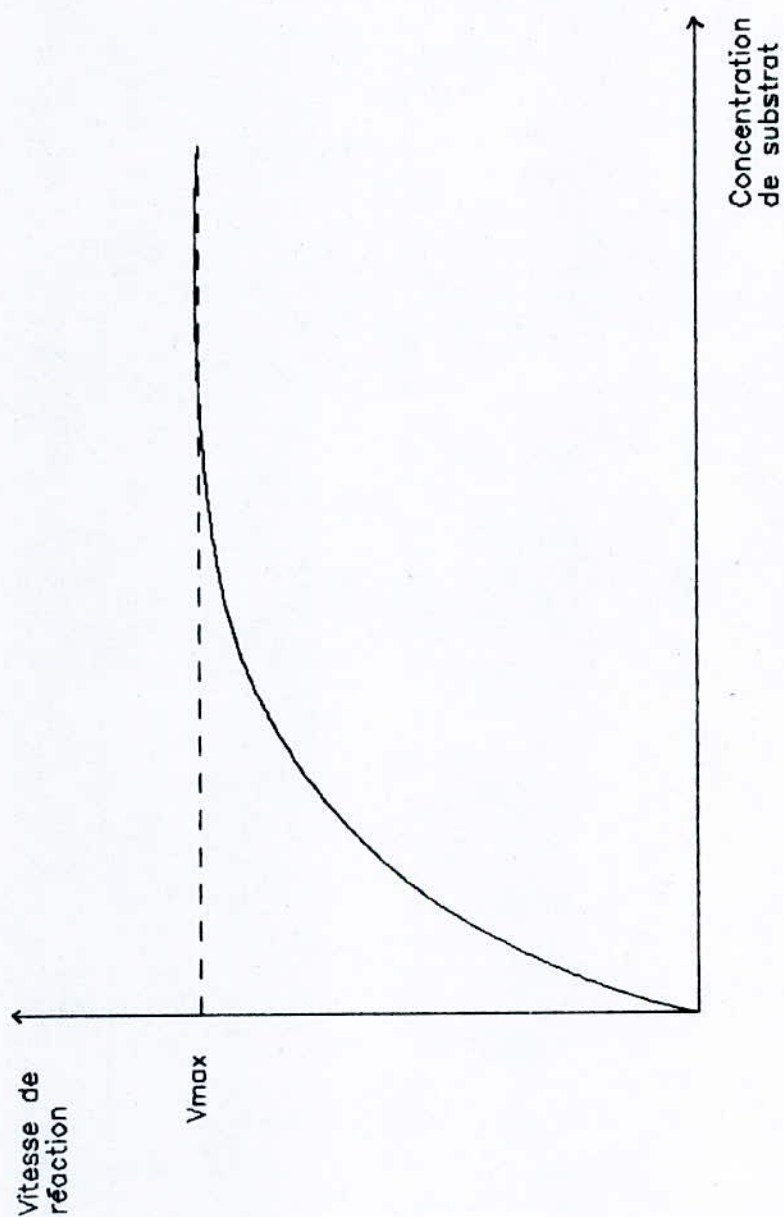


Figure II.2 : Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat

On appelle constante de Michaëlis, le rapport suivant:

$$K_M = \frac{K_2 + K_3}{K_1} \quad (II.6)$$

Si $K_3 \ll K_2$, K_M est voisin de la constante de dissociation du complexe ES. On peut écrire l'équation:

$$K_M = \frac{[S][E] - [ES]}{[ES]} \quad (II.7)$$

$$[ES] = \frac{[S][E]}{K_M + [S]} \quad (II.8)$$

La vitesse initiale de réaction est proportionnelle à ES:

$$V = K_3[ES] \quad (II.9)$$

En présence d'un grand excès de substrat, on a la vitesse maximale qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme, car on peut considérer que toute l'enzyme est sous forme E-S:

$$V_{\max} = K_3[E] \quad (II.10)$$

On peut donc remplacer dans l'équation (II.8), $[ES]$ et $[E]$ par les vitesses qui sont proportionnelles à ces quantités:

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (II.11)$$

C'est l'équation fondamentale de la cinétique enzymatique. Pour une valeur de V égale à la moitié de la valeur maximale, on a:

$$\frac{[S]}{K_M + [S]} = \frac{1}{2} \quad (II.12)$$

d'où:

$$K_M = [S] \quad (II.13)$$

Il en résulte la constatation très importante:

La constante de Michaëlis est égale à la concentration (exprimée en mole/litre) de substrat pour laquelle la vitesse de réaction est la moitié de la vitesse maximale V_{\max} .

La constante de Michaëlis est d'autant plus basse que l'enzyme est plus active. Sa valeur varie de 10^{-6} mole/litre pour des enzymes très actives à 10^{-2} pour des enzymes peu actives comme les enzymes protéolytiques.

La connaissance de K_M est importante, car une enzyme à K_M élevée ne pourra agir que si le substrat est présent à concentration élevée.

En inversant l'équation (II.11), on obtient:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} \times [S]} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (II.14)$$

La courbe de variation de $\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{[S]}$ est une droite de pente égale à $\frac{K_M}{V_{\max}}$ et d'ordonnée à l'origine égale à $\frac{1}{V_{\max}}$ (figure n°II.3).

Cette représentation est commode pour la détermination des constantes cinétiques de l'enzyme.

4.4 Facteurs influençant la réaction enzymatique:

4.4.1 La température: [18]

Une élévation de la température augmente le mouvement des molécules et accroît ainsi la vitesse de la réaction catalysée par les enzymes. Mais ces dernières, étant des protéines, sont dénaturées par les températures relativement élevées.

La température optimale est donc un compromis entre l'augmentation de la vitesse de réaction et la dénaturation de l'enzyme.

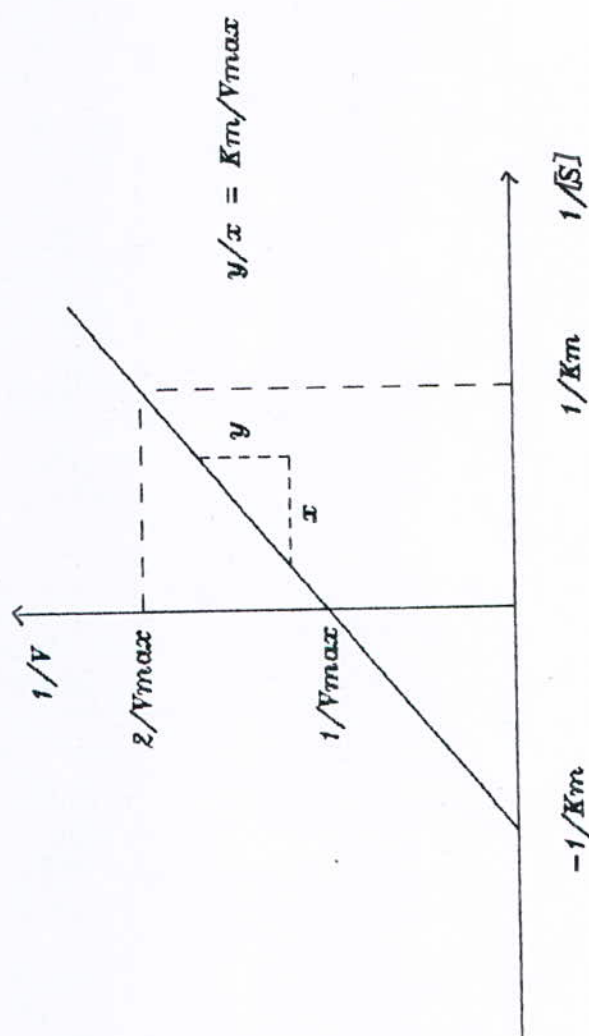


Figure II.3 : Representation de Lineweaver - Burk.

4.4.2 Le pH:

Les réactions enzymatiques sont très sensibles au pH du milieu. On définit un pH optimum pour chaque enzyme agissant sur un substrat donné dans des conditions déterminées. Au delà de cette valeur, la courbe d'activité accuse une décroissance due à la dénaturation de l'enzyme.

5 PREPARATION DES SOLUTIONS DE PEPSINE:

La pepsine utilisée durant nos essais d'hydrolyse enzymatique de rejets solides de poissonneries a été obtenue par autodigestion, en milieu acide, de muqueuse d'estomac de mouton.

Pour la préparation de cette enzyme, nous nous sommes conformées aux indications données par LING LIN LIU et G.M.PIGOTT [6], qui ont décrit en détail un procédé d'obtention d'une pepsine brute à bon marché à partir de muqueuse d'estomac de porc récupérée dans un abattoir.

5.1 Préparation de l'enzyme brute:

5.1.1 Remarques préliminaires:

Le prélèvement de la muqueuse sera de préférence effectué à l'abattoir même. Cependant, si cela s'avère impossible, la matière première (estomac de mouton) devra être transportée dans de la glace jusqu'au lieu de travail afin d'éviter toute détérioration et la formation de mucus.

De plus, il ne faut en aucun cas manipuler la muqueuse avec les mains nues car les traces de protéines présentes sur les mains pourraient désactiver une fraction des enzymes que l'on cherche à récupérer. Il faut donc veiller à se munir de gants avant d'entamer la préparation de la muqueuse

5.1.2 Mode opératoire:

Juste après que le mouton ait été égorgé, prélever l'estomac, le vider et bien le rincer à l'eau froide.

L'intérieur de l'estomac est tapissé par une membrane, ou muqueuse, présentant une multitude de villosités au niveau desquelles la pepsine est sécrétée dans l'estomac. Cette membrane est rapidement décollée de son support (lorsque l'estomac provient d'un animal fraîchement égorgé, cette opération est relativement aisée).

Il faut encore débarrasser la muqueuse des fragments de support qui y restent attachés en la grattant avec une plaque de verre non coupant (une spatule fait aussi très bien l'affaire).

La muqueuse obtenue est ensuite rincée une dernière fois à l'eau froide, et, si elle doit être transportée, il faut bien entendu la placer dans de la glace.

Pour finir, on la passe dans un hachoir à viande et on en fait de petites boulettes que l'on congèle dans des sachets en plastique en vue d'une utilisation ultérieure.

Cette forme de stockage est celle préconisée par LING LIN LIU et G.M.PIGOTT [6], dont les essais ont montré que la muqueuse hachée et congelée à une température de -20°C se conserve très bien durant au moins 5 mois.

5.2 Détermination de l'équivalent en poids sec de l'enzyme:

La muqueuse ainsi préparée va servir, par la suite, à préparer des solutions de pepsine brute. Cependant, avant de pouvoir procéder à la préparation de ces solutions, il est nécessaire de connaître l'équivalence en poids sec de la muqueuse congelée. Cette valeur est déterminée de la manière suivante:

-prélever une petite portion de muqueuse congelée et la peser. La masse obtenue est notée m_1 .

-L'échantillon de muqueuse est alors déposé dans une cellule en porcelaine puis placé dans une étuve à une température de 105°C et durant 24 heures.

-A la sortie de l'étuve, l'échantillon est repesé. La masse nouvelle obtenue est notée m_2 .

L'équivalent en poids sec de la muqueuse congelée correspond alors au rapport entre la masse de muqueuse humide à la masse de muqueuse sèche, c'est à dire $\frac{m_1}{m_2}$.

Par la suite, la quantité voulue d'enzyme en poids sec devra être multipliée par ce rapport afin de déterminer la masse équivalente de muqueuse qu'il faudra utiliser. Une fois ce rapport déterminé, on peut passer à la préparation des solutions de pepsine brute.

5.3 Préparation des solutions de pepsine:

5.3.1 Préparation des solutions de pepsine brute: [6]

Dans un premier temps, peser la quantité voulue de muqueuse humide et l'introduire dans un erlenmeyer contenant 100ml d'HCL 0.01N.

Tout en assurant une agitation continue du mélange au moyen d'un agitateur magnétique, ajuster le pH de ce mélange à la valeur choisie à l'aide d'une solution d'HCL 4N. Ceci doit être effectué durant les 30 premières minutes d'agitation. Par la suite, poursuivre l'agitation pendant une durée de 6 heures.

Une fois ce temps écoulé, le volume du mélange est complété à 500ml à l'aide d'une solution d'HCL 0.01N. La solution d'enzyme obtenue est alors filtrée à travers une

étamine afin d'éliminer les restes de particules de muqueuse. Si cette précaution n'est pas prise, le phénomène d'autodigestion va se poursuivre et l'activité de la solution d'enzyme préparée va diminuer rapidement.

LING LIN LIU et G.M.PIGOTT [6] ont montré que les solutions de pepsine préparées selon la manière décrite ci-dessus, peuvent être conservées une dizaine de jours à 4°C.

Pour notre part, nous effectuerons également des mesures de stabilité de nos solutions de pepsine brute afin de tenter de retrouver les résultats établis par ces deux chercheurs.

5.3.2 Préparation des solutions de pepsine commerciale:

Peser la quantité de pepsine commerciale lyophilisée voulue et l'ajouter à 100ml d'HCL 0.01N. Le mélange est homogénéisé par agitation magnétique durant quelques minutes. Poursuivre alors l'agitation, en ajustant le pH du mélange à la valeur optimale indiquée par le fabricant.

Par la suite, étendre le volume du mélange à 500ml à l'aide d'HCL 0.01N. Cette solution de pepsine commerciale se conserve également une dizaine de jours à 4°C.

6 DETERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES D'ACTIVITE DE LA PEPSINE BRUTE:

D'après la publication de LING LIN LIU et G.M.PIGOTT [6], les conditions optimales d'activité de la pepsine brute extraite de la muqueuse d'estomac de porc sur un substrat standard, l'hémoglobine, sont: un pH égal à 1 et une température de 62°C

Lors du travail effectué par L.SI AMOUR [14], la matière première utilisée pour la préparation de l'enzyme brute était la muqueuse de mouton. Elle a réalisé des essais d'activité sur le

même substrat que précédemment, les conditions optimales définies alors sont: un pH 1 et une température de 23°C (température ambiante).

J.C.COLLIN et R.DELECOURT [19], rapportent que la pepsine provenant généralement d'estomacs d'animaux a pour conditions optimales d'activité un pH égal à 1.8 et une température de 40°C.

Dans le même ordre d'idée, on retrouve dans l'article publié par R.E.VEGE et J.G.BRENNAN [20] un tableau récapitulatif des travaux qui ont été faits dans ce sens. On en a extrait la partie qui nous intéresse (Tableau n°II.1), en l'occurrence celle où la pepsine est utilisée comme enzyme et le poisson comme substrat.

Référence	Proportion eau/poisson	Enzyme	Tp (°C)	pH
Fujimaki et coll.(1977)	26	pepsine	37	1.6
Liu et Pigott (1981)	1	"	37-62	1-2
Pigott et coll.(1978)	0.5	"	48	2
Mc Bride et coll.(1960)	0.5	"	37	2

Tableau n°II.1: Conditions rapportées par différents auteurs concernant l'hydrolyse enzymatique du poisson.

6.1 Détermination du pH optimal d'activité de la pepsine brute:

Le but des essais qui vont suivre est d'une part la détermination du pH optimal, d'autre part de tester la stabilité de l'enzyme brute à divers pH.

Pour cela, on pèse l'équivalent de 50mg en poids sec d'enzyme brute. On prépare cinq solutions de pepsine brute suivant le mode opératoire précité et en ajustant leur pH respectif aux valeurs suivantes: 0.5, 1, 1.5, 1.75 et 2.

On a ralongé la liste des valeurs de pH testées par LING LIN LIU et G.M.PIGOTT [6] d'une valeur qui est 0.5, ceci dans le but de mieux encadrer la valeur du pH optimal, cette dernière étant égale à 1 selon ces deux chercheurs.

Les tests d'activité sont effectués sur un substrat standard: la BSA à température ambiante qui en moyenne est de 17°C, ils sont étalés sur une durée de 8 jours.

6.1.1 Mode opératoire: [6]

On prélève 4ml de solution d'enzyme dans un tube à essais, on y ajoute 1ml de BSA à 2.5%, après homogénéisation, on incube pendant 10 minutes.

Une fois ce temps écoulé, on arrête la réaction en injectant dans le mélange 6ml de TCA (acide trichloroacétique) à 4%, dont le rôle est de coaguler les protéines non hydrolysées et de solubiliser les petits peptides ainsi que les acides aminés. On laisse agir 5 à 10 minutes.

Le contenu du tube à essais est alors filtré au moyen d'un microfiltre, dont la membrane est de marque Sartorius et de porosité 0.65 μm . La densité optique du filtrat est lue au spectrophotomètre contre de l'eau distillée, à une longueur d'onde de 280nm.

Remarque:

Cette dernière est spécifique à trois acides aminés: le Tryptophane (Trp), la Tyrosine (Tyr) et la Phénylalanine (Phe), l'absorption lumineuse étant due à la présence d'un cycle dans leur structure [16], la plupart des protéines contenant des résidus de

- Tyrosine, la mesure de l'absorption à cette longueur d'onde est un moyen extrêmement rapide et satisfaisant de mesure de la concentration [22].

6.1.2 Exploitation des résultats:

Les résultats obtenus serviront:

- d'une part, au tracé de la courbe de variation de la densité optique en fonction du pH et ceci pour chaque jour.
- D'autre part, au tracé de la courbe de variation de la densité optique en fonction du temps, ce qui nous donnera une courbe pour chaque pH.

6.1.3 Interprétation des résultats:

Quelque soit le pH auquel elles correspondent, toutes les courbes (figure n°II.4), présentent une allure similaire: l'activité de l'enzyme est maximale au départ (sans conservation), elle diminue ensuite progressivement en fonction du nombre de jours de conservation.

Les courbes indiquent aussi que, les pH 0.5 et 1 sont ceux pour lesquels on a mesuré une activité enzymatique maximale.

On constate également que jusqu'au 3^e jour de conservation, le pH 0.5 semble être le pH optimal d'activité de l'enzyme.

Cependant, après ce 3^e jour l'activité de l'enzyme chute rapidement et à partir du 5^e jour de conservation, c'est pour l'enzyme préparée à pH 0.5 que les mesures d'activité enzymatiques sont les plus basses.

En ce qui concerne l'enzyme préparée à pH 1, elle présente le jour même de sa préparation, une activité semblable à celle

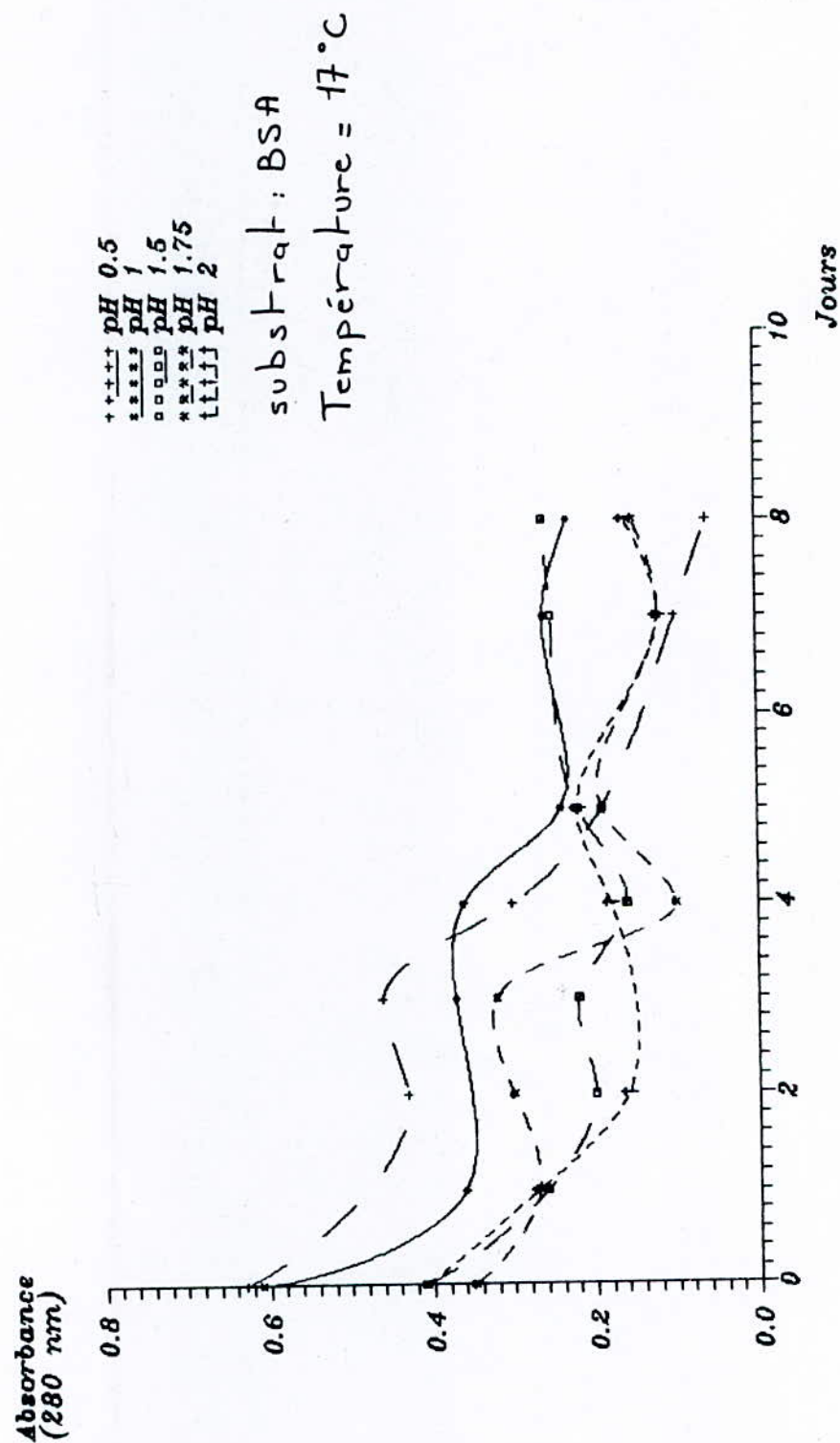


Figure II.4 : Variation de l'activité de la pepsine brute en fonction du nombre de jours de conservation.

mesurée dans le cas du pH 0.5. Ce n'est qu'à partir du 4^e jour de conservation que l'enzyme préparée à pH 1 présente une activité supérieure à celle mesurée à pH 0.5.

Toujours dans le cas du pH 1, on constate qu'après le 4^e jour de conservation, l'activité enzymatique diminue légèrement puis se stabilise durant les 4 jours de conservation suivants.

Pour le pH 1.5, on peut remarquer que l'activité enzymatique, après avoir diminué durant les 4 premiers jours, se remet ensuite à augmenter. Ceci est anormal et pourrait être dû à des erreurs de manipulation.

Par ailleurs, si l'on compare nos résultats à ceux obtenus, par PIGOTT et LIU [6], qui eux ont travaillé à partir de muqueuse d'estomac de porc, on constate plusieurs différences:

- PIGOTT et LIU ont montré que la pepsine extraite d'estomac de porc présentait une activité stable durant 10 jours de conservation;

- l'enzyme préparée à pH 1 présentait une activité nettement supérieure à celles observées pour les autres valeurs de pH testées (0.5, 1.5, 1.75 et 2).

L. SI AMMOUR [14], a quant à elle déterminé un pH optimal de 1 pour une pepsine extraite de l'estomac de mouton.

Pour la suite de nos expériences et malgré les résultats obtenus ici nous considérerons que la valeur optimale de pH est de 1.

Au dessus de pH 1, on a en effet constaté que l'activité enzymatique n'est pas aussi bonne que celle mesurée à pH 1.

Par ailleurs, on sait que dans le corps humain, la sécrétion gastrique d'acide chlorhydrique servant à activer la pepsine est initialement à pH 0.8. Cette valeur augmente

ensuite au cours de l'activation de la pepsine, et, lorsque cette enzyme est mélangée aux aliments, le pH de l'estomac peut atteindre une valeur de 3 [28].

De plus, la pepsine que nous avons utilisée ici a été extraite d'estomac de mouton. Ce dernier étant un herbivore, son taux d'acidité gastrique devrait être inférieur à celui existant chez un omnivore tel que l'homme ou encore le porc.

Enfin, la pepsine étant une protéine, elle tend à être dénaturée par des pH trop bas.

6.2 Détermination de la température optimale d'activité de la pepsine brute:

On se fixe dans cette partie deux buts:

- le premier étant la détermination de la température optimale de la pepsine brute.
- Le second étant la comparaison de cette température avec la température optimale d'activité d'une pepsine commerciale.

La pepsine commerciale utilisée provient des laboratoires SIGMA. Elle a été extraite de la muqueuse d'estomac de porc et a été lyophilisée à 1:2500. A cet effet, on pèse 50mg de pepsine commerciale et l'équivalent en poids sec de cette masse en enzyme brute.

On prépare les solutions d'enzyme brute et commerciale selon les modes opératoires précités, en ajustant leur pH respectif à la valeur du pH optimal que l'on a déterminée.

La gamme de températures choisie pour les deux types de pepsine est: 21°C (température ambiante), 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C et 65°C. La série de températures étudiée a été rallongée de façon à englober les températures utilisées par LING LIN LIU et G.M.PIGOTT [6] et L.SI AMOUR [14] dans leurs travaux respectifs.

Pour obtenir ces températures, on utilise un bain-marie que l'on thermostatise à la température voulue.

6.2.1 Mode opératoire:

Deux tubes à essais, l'un contenant 4ml de la solution d'enzyme, l'autre contenant 1ml de BSA à 2.5%, sont plongés dans le bain-marie. Lorsque ces deux solutions atteignent la température souhaitée, on les mélange, on homogénéise.

Après un temps d'incubation de 10 minutes, on introduit dans le tube à essais 6ml de TCA, on laisse alors passer un temps de réaction de 10 minutes. Cette période écoulée, on filtre le mélange réactionnel à l'aide d'un microfiltre en utilisant la même membrane que précédemment.

On lit alors la densité optique du filtrat au spectrophotomètre contre de l'eau distillée, à une longueur d'onde de 280nm.

6.2.2 Exploitation des résultats:

Les résultats obtenus dans cette partie serviront au tracé de la courbe de variation de la densité optique en fonction de la température et ce pour chaque type de pepsine, ce qui nous permettra d'établir une comparaison entre ces deux dernières.

6.2.3 Interprétation des résultats:

On constate tout d'abord que l'activité de la pepsine brute est bien inférieure à celle de la pepsine commerciale, ceci s'explique par le grand degré de pureté que possède l'enzyme commerciale.

De plus, l'allure de la courbe obtenue (figure n°II.5) pour la pepsine brute n'est pas semblable à celle obtenue pour la pepsine commerciale.

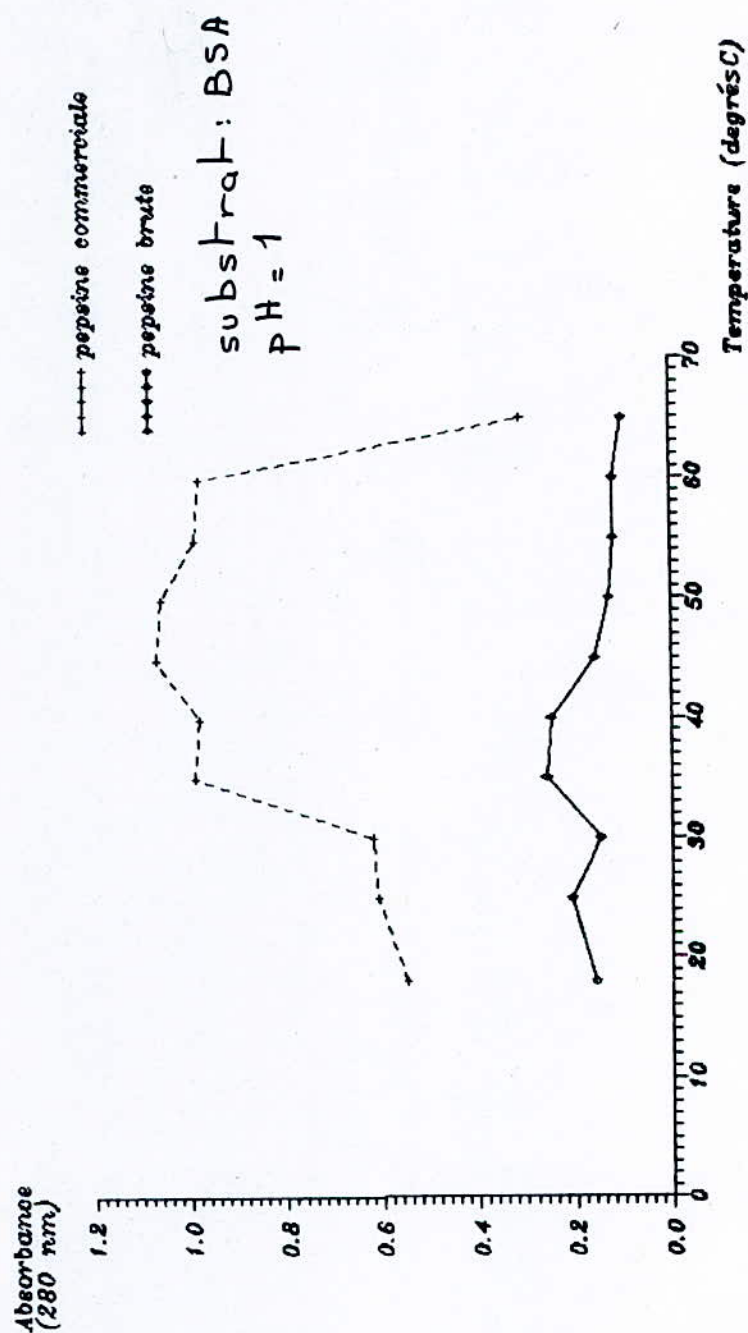


Figure II.5 : Détermination de la température optimale d'activité de la pepsine brute.

Pour cette dernière, en effet, on distingue nettement une gamme de températures (comprises entre 35 et 60°C) conduisant à une activité enzymatique maximale.

La pepsine brute présente par contre une activité enzymatique pratiquement constante pour toute la gamme de températures testées. Cette activité tend cependant à diminuer à partir de 55°C en raison de la dénaturation thermique de l'enzyme.

On note aussi une légère augmentation de l'activité enzymatique entre 30 et 45°C. Mais cette augmentation est trop faible pour que le domaine 30-45°C puisse être considéré comme une gamme optimale de températures.

Deux explications peuvent être proposées à ce phénomène :

- la plus probable serait que le temps de contact entre l'enzyme et la BSA n'était pas suffisamment long pour permettre à l'hydrolyse d'avoir lieu correctement;

- eventuellement, on peut aussi supposer que l'on est en présence d'un mélange d'enzymes vu que, notre matière première n'est pas pure. Dès lors, la température optimale de chacune des enzymes présentes dans le mélange serait différente. Par conséquent, l'activité enzymatique mesurée aux différentes températures testées ne serait pas celle de la pepsine uniquement.

7 ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE:

7.1 Mode opératoire:

7.1.1 Principe de la mesure:

La pepsine ne fait habituellement qu'ébaucher le processus de digestion protéique, en scindant simplement les protéines

en protéoses, peptones et en gros polypeptides. Cette scission des protéines est un processus d'hydrolyse qui touche les liaisons peptidiques entre les acides aminés [28].

Il est par conséquent possible de suivre la progression de l'hydrolyse enzymatique en évaluant l'évolution du nombre de liaisons peptidiques dans le milieu réactionnel en fonction du temps.

Pour cela, nous avons choisi une méthode de dosage colorimétrique: la méthode au biuret¹, caractéristique de la liaison peptidique (-CO-NH-).

7.1.2 Conditions opératoires:

-L'enzyme utilisée est la pepsine commerciale (1:2500) fabriquée par les laboratoires SIGMA à partir de muqueuse d'estomac de porc.

Nous avons testé deux concentrations en enzyme: 0.6g/l et 10g/l .

-Les solutions de substrat sont préparées à partir de rejets solides de poissonneries, broyés puis dilués.

Les concentrations en substrat étudiées sont: 5, 35, 45, 72, et 90g/l pour une concentration en enzyme de 10g/l et 5, et 50g/l pour une concentration en enzyme de 0.6g/l.

Le pH des solutions soumises à l'hydrolyse est ramené à 2 à l'aide d'une solution tampon.

-La température du milieu réactionnel est maintenue à 37°C.

¹ Le principe de la réaction au biuret est décrit plus en détail en annexe .

7.1.3 Mode opératoire:

-Préparer plusieurs petits entonnoirs et les munir de filtres Whatman n° 3.

-Préparer aussi 30 tubes à essais propres et secs:

-prendre tout d'abord 10 tubes, remplir chacun d'eux avec 4ml de réactif de Cornall puis les fermer et les conserver à l'obscurité;

-prendre ensuite 10 autres tubes et les remplir chacun avec 5ml d'acide trichloroacétique (CCl_3COOH) à 5%;

-les 10 tubes restants serviront à recueillir les filtrats.

-Une dizaine de minutes avant d'entamer la réaction d'hydrolyse, placer la solution à hydrolyser dans un bain-marie à 37°C.

-A un instant zéro choisi, introduire rapidement 5ml de solution de pepsine dans l'erlenmeyer contenant le mélange à hydrolyser.

Bien agiter, effectuer tout de suite un prélèvement de 2ml du milieu réactionnel et le verser dans un tube contenant 5ml de CCl_3COOH à 5%.

Durant la suite de l'hydrolyse, on effectuera d'autres prélèvements, d'abord toutes les 3 minutes durant les 15 premières minutes de réaction puis toutes les 10 minutes, jusqu'à atteindre une durée totale de 55 minutes de réaction.

Il faudra par ailleurs, assurer une agitation régulière du mélange réactionnel pendant tout le déroulement de l'expérience.

-Le temps de contact entre les échantillons prélevés dans le milieu réactionnel et l'acide trichloroacétique est fixé à 10 minutes.

Une fois cette durée écoulée, le contenu de chacun des tubes où a eu lieu la coagulation est filtré dans un autre tube.

-On prélève ensuite, pour chaque tube obtenu, 1ml de filtrat que l'on introduit dans un tube préparé contenant 4ml de réactif de Cornall. Ces nouveaux tubes sont alors placés 30 minutes à l'obscurité. On procède ensuite à la mesure de la densité optique de leur contenu à une longueur d'onde de 540nm.

7.1.4 Exploitation des résultats:

-Les densités optiques lues sont converties en valeurs de concentration au moyen d'une courbe d'étalonnage établie auparavant.

-Pour chaque concentration en substrat étudiée, on trace le graphe: concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps.

On trace ensuite la tangente à l'origine de ce graphe. La pente de cette tangente correspond à la vitesse initiale (ou maximale) de la réaction enzymatique.

-On trace alors le graphe: vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat ($V = f([S])$) et le graphe $1/V = f(1/[S])$.

7.2 Présentation des résultats:

Les résultats expérimentaux obtenus lors de l'étude de la cinétique d'hydrolyse ont été traduits sous forme de graphes (figure n°II.6 et II.7) donnant la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps de réaction.

-Dans le cas de la figure n°II.6, la concentration en pepsine était de 0.6g/l et les concentrations en substrat testées étaient 5 et 50g/l.

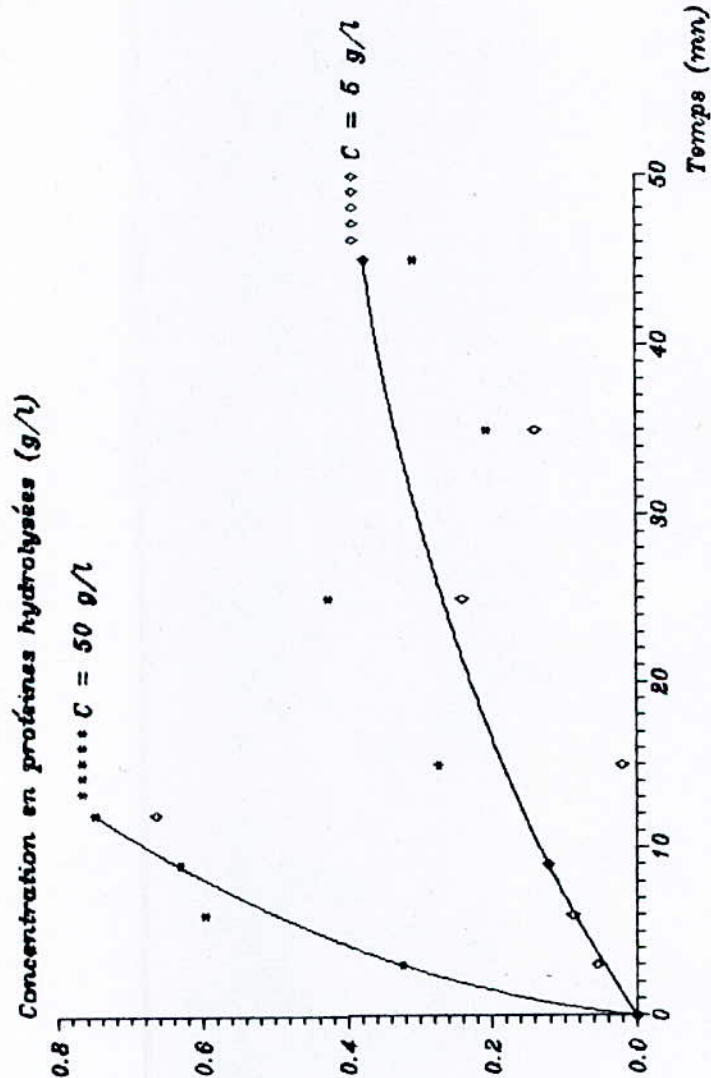


Figure II.6 : Courbes donnant la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps, pour deux concentrations différentes en substrat et pour une concentration en pepsine de 0.6 g/l .

-Dans le cas du graphe de la figure n°II.7, la concentration en pepsine était de 10g/l et les concentrations en substrat testées étaient de: 5, 35, 45, 72 et 90g/l.

De l'observation de ces graphes, il ressort que les points expérimentaux obtenus sont très dispersés. De plus, il faut souligner qu'il nous a été très difficile d'obtenir des résultats reproductibles.

Cela peut provenir d'erreurs de manipulation, mais s'explique aussi en grande partie par la complexité du milieu biologique étudié. Dans ce dernier en effet, de nombreuses interactions se produisent et empêchent la prise de mesures précises.

C'est pour cette raison que lors du tracé des courbes, certains points aberrants n'ont pas été pris en considération.

-Dans le cas où les courbes présentaient un palier, il a été possible de calculer les rendements d'hydrolyse. Ces derniers sont calculés par rapport au poids sec de rejet initialement présent dans le milieu réactionnel. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau n°II.2.

Les rendements obtenus sont peu élevés mais cela est dû au fait qu'ils ont été calculés par rapport à la masse de tout le rejet et pas uniquement par rapport à la masse de protéines présentes dans ce rejet.

Il est néanmoins possible de comparer les valeurs obtenues. Ceci permet de constater que l'hydrolyse semble se faire de moins en moins bien lorsque l'on augmente la concentration initiale en substrat.

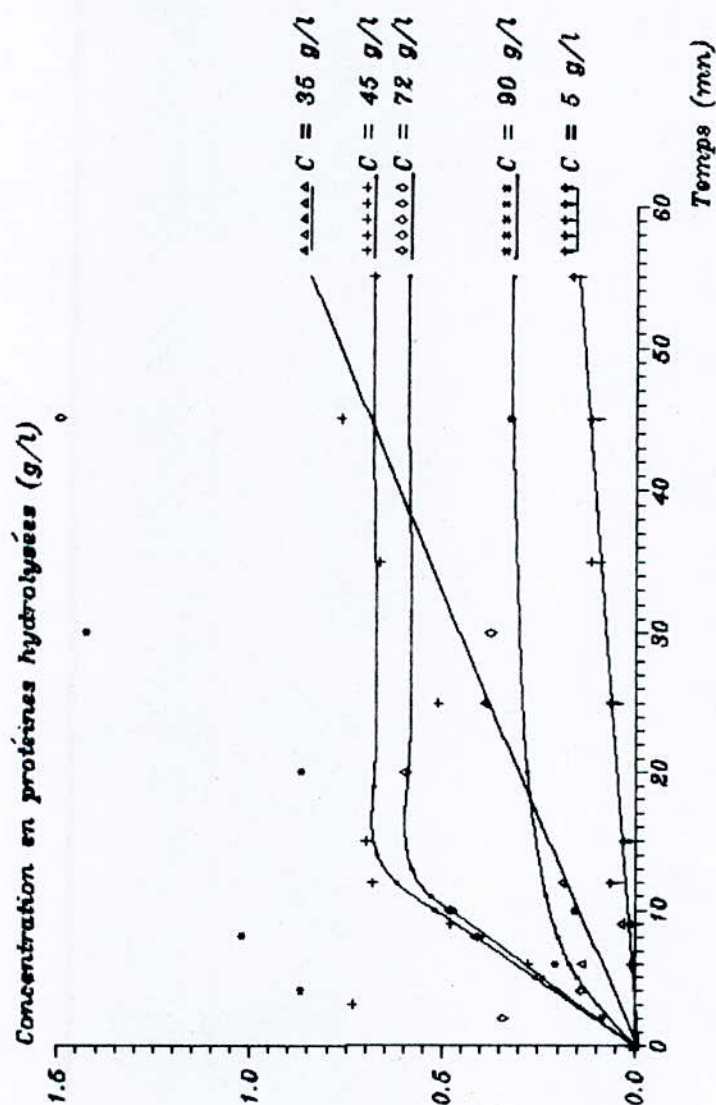


Figure II.7 : Courbes donnant la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps pour différentes concentrations initiales en substrat et pour une concentration en pepsine de 10 g/l.

7.3 Interprétation des résultats:

Pour mieux tirer parti des résultats décrits ci-dessus, nous avons tracé les graphes $1/V=f(1/[S])$ pour chacune des deux concentrations en pepsine étudiées (figure n°II.8 et II.9).

Concentration initiale en substrat (g/l)	Concentration en pepsine (g/l)	Rendement de l'hydrolyse (%)
45	10	5
72	10	2.9
90	10	1.3

Tableau n°II.2: Rendement de l'hydrolyse en fonction de la concentration initiale de substrat

Dans le cas où la concentration en pepsine était de 10g/l, il a été également possible de tracer le graphe: $V=f([S])$ (figure n°II.10).

Pour le tracé de ce dernier graphe, le point correspondant à $[S]=35g/l$ n'a pas été pris en considération et cela en raison du fait que théoriquement, la courbe $V=f([S])$ doit toujours présenter une pente bien marquée au départ.

Le graphe $V=f([S])$ (figure n°II.10) obtenu fait apparaître qu'au-delà d'une concentration de 60g/l environ en substrat, la vitesse de la réaction enzymatique diminue. Ceci conduit à penser qu'il se produit une inhibition par le substrat: les molécules de substrat ne trouvant pas suffisamment de sites actifs, elles ont tendance à interagir avec le complexe enzyme-substrat déjà formé, ce qui a pour effet de bloquer la réaction enzymatique.

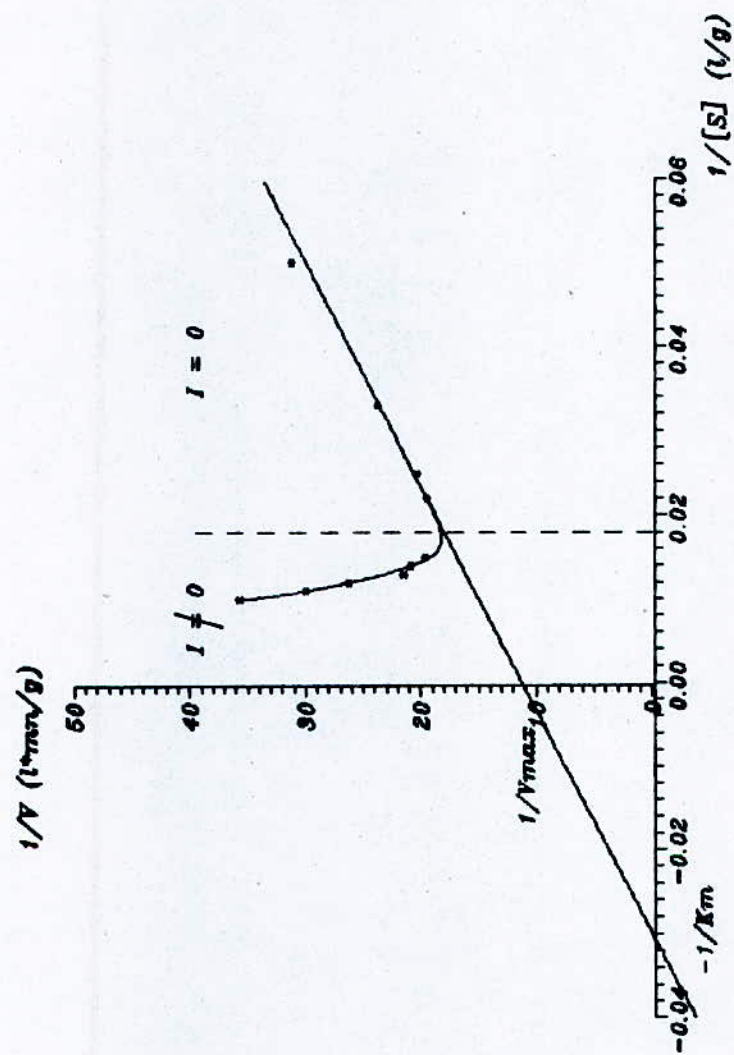


Figure II.8 : Courbe donnant $1/V = f(1/[S])$ pour une concentration en pepsine de 10 g/l .

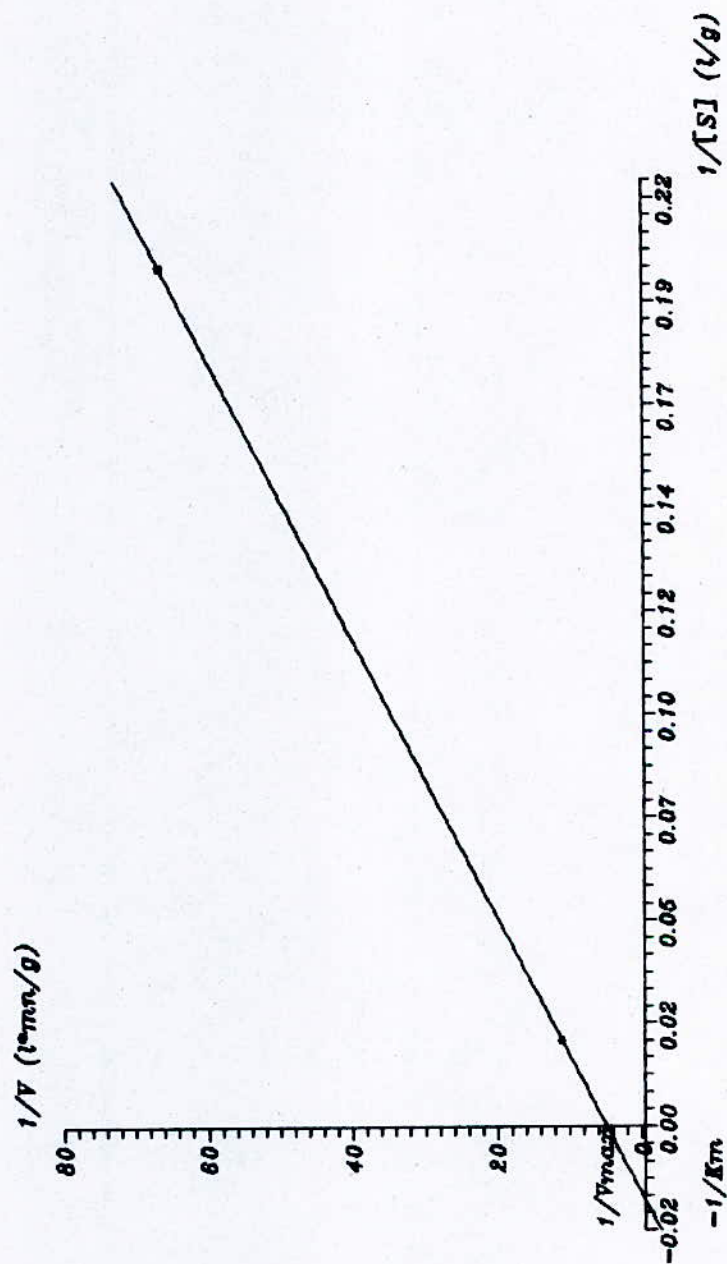


Figure II.9 : Courbe donnant $1/V = f(1/S)$ pour une concentration en pepsine de 0.6 g/l.

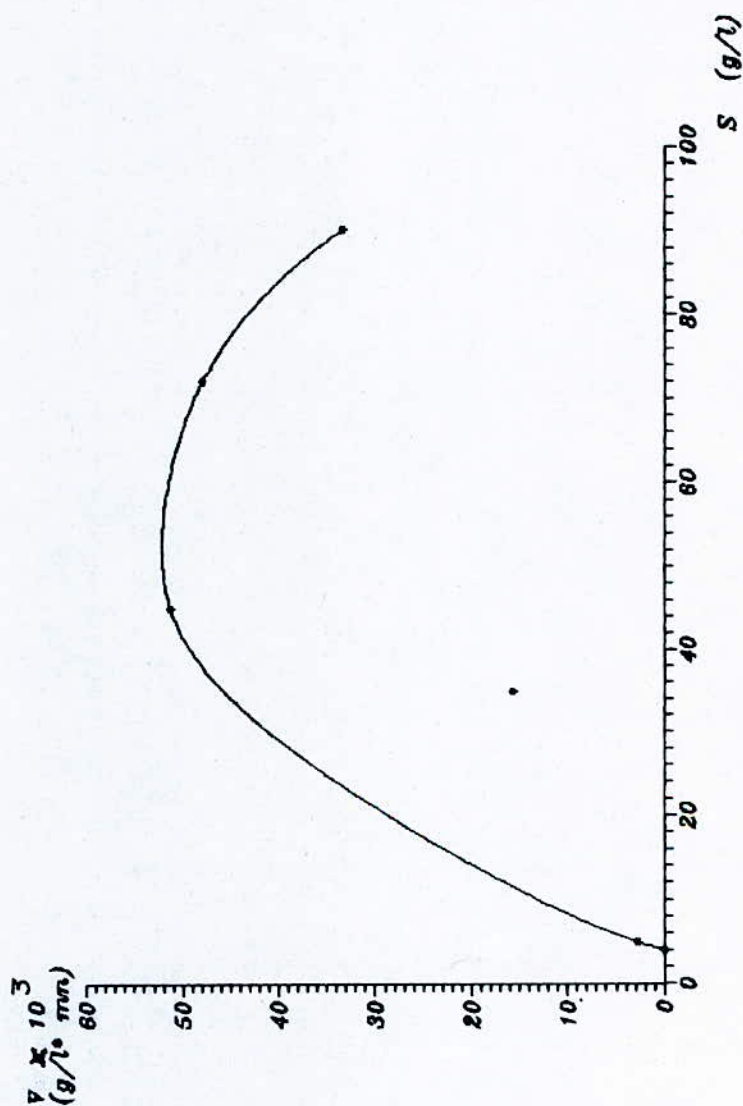
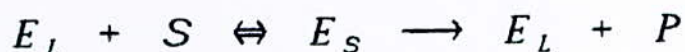


Figure II.10 : Courbe donnant la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la concentration initiale en substrat, et pour une concentration en pepsine de 10 g/l.

L'inhibition due à un excès de substrat peut être décrite ainsi :



Avec :

E_L : enzyme libre;

S : substrat;

E_S : complexe enzyme-substrat;

P : produit.

La loi mathématique décrivant ce phénomène est la suivante:

$$V = V_{\max} \times \frac{[S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (II.15)$$

avec:

V : vitesse initiale de la réaction enzymatique;

V_{\max} : vitesse maximale de la réaction enzymatique;

K_M : constante de Michaëlis;

K_I : constante d'inhibition.

Dans cette loi cinétique, V n'est pas fonction de $1/[S]$ uniquement. L'inhibition par le substrat ne répond donc pas au modèle de Michaëlis et Menten et le graphe $1/V=f(1/[S])$ n'est pas linéaire.

Remarque:

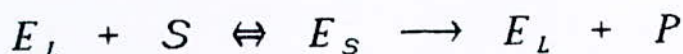
pour une concentration en enzyme égale à 10g/l, la courbe $1/V=f(1/[S])$ a été tracée en utilisant des valeurs calculées à partir du graphe $V=f([S])$ cité ci-dessus. Les résultats expérimentaux obtenus n'étaient, en effet, pas suffisants pour déduire clairement l'allure du graphe $1/V=f(1/[S])$.

Les intersections de l'asymptote oblique à la courbe $1/V=f(1/[S])$ avec l'axe des ordonnées, d'une part, et celui des abscisses, d'autre part, donne respectivement la valeur de $1/V_{\max}$ et celle de $-1/K_M$. On en déduit les valeurs suivantes pour V_{\max} et K_M :

$$V_{\max} = 0.094 \text{ g/l.mn}$$

$$K_M = 33.33 \text{ g/l}$$

Pour une concentration en enzyme égale à 0.6 g/l , les résultats expérimentaux obtenus ne sont pas suffisants pour mettre en évidence l'inhibition par le substrat. On suppose alors que la réaction d'hydrolyse peut être décrite simplement de la manière suivante:



Cette réaction obéit à la loi de Michaëlis et Menten qui est telle que:

$$V = V_{\max} \times \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (II.16)$$

A partir du graphe $1/V=f(1/[S])$ il a été possible de déterminer les valeurs suivantes pour K_M et V_{\max} :

$$V_{\max} = 0.2 \text{ g/l.mn}$$

$$K_M = 70 \text{ g/l}$$

On constate que la vitesse maximale obtenue pour une concentration en enzyme égale à 0.6 g/l est bien supérieure à celle obtenue avec une concentration en enzyme égale à 10 g/l . Ceci ne devrait pas être le cas puisque la vitesse maximale d'une réaction enzymatique est directement proportionnelle à la concentration en enzyme.

On pourrait donc tout simplement conclure que l'hypothèse de linéarité faite dans le cas où la concentration en pepsine est de 0.6 g/l , est fausse.

Cependant, si l'on s'en tient à cette hypothèse; une explication pourrait être apportée au précédent résultat si l'on tient compte du fait que lors des expériences réalisées avec une concentration en enzyme égale à 0.6g/l, la solution de rejet était filtrée avant l'hydrolyse.

Cette opération n'était cependant pas effectuée dans le cas d'une concentration en pepsine égale à 10g/l.

On pourrait donc en déduire que le rejet, bien que broyé et dilué continue à présenter des substances (écailles, débris d'arêtes,...) qui gênent l'action de l'enzyme.

Il n'en reste pas moins que cette explication ne justifie pas les valeurs élevées obtenues pour le paramètre K_M . Les valeurs traduisent en effet une très faible affinité entre la pepsine et les protéines présentes dans le rejet de poissonneries.

8 ETUDE EXPERIMENTALE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS DE POISSONNERIES:

8.1 Conditions opératoires:

L'enzyme utilisé est la pepsine. Deux types de pepsine sont ici comparés:

-la première enzyme utilisée est une enzyme brute préparée par autodigestion de muqueuse stomacale de mouton. L'activation de cette enzyme est effectuée à pH 1 durant 12 heures.

Les deux concentrations suivantes sont testées: 9% et 22% (poids sec de muqueuse/poids de solution de rejet).

-L'autre enzyme utilisée est une pepsine commerciale (1:2500), fabriquée par les laboratoires SIGMA et provenant de muqueuse d'estomac de porc.

A partir de cette pepsine , on prépare une solution d'enzyme à 2% (poids de pepsine/poids de solution de rejet) et à pH 2.

-Le substrat est préparé à partir de rejets solides de poissonneries. Pour cela, un volume de rejets broyés est mélangé à un volume d'eau.

-Les conditions de pH et de température dans le milieu réactionnel sont les suivantes:

-pH 1 et température de 37°C dans le cas où l'on utilise la pepsine brute.

-pH 2 et température de 37°C dans le cas où l'on utilise la pepsine commerciale.

-La méthode de dosage choisie est la méthode du biuret.

8.2 Mode opératoire:

-Préparer plusieurs petits entonnoirs, munis de filtres en papier Whatman n°3, ainsi que trois séries de 14 tubes à essais propres et secs.

-14 tubes serviront à recueillir les filtrats.

-Prendre par ailleurs 14 autres tubes, remplir chacun d'eux avec 4ml de réactif de Cornall, les fermer et les conserver à l'obscurité.

-Puis prendre les 14 tubes restants et introduire dans chacun d'eux 5ml de CCl_3COOH à 20%.

-Avant d'entamer l'hydrolyse s'assurer que la température des solutions d'enzyme et de rejet est bien de 37°C . Pour cela, placer les récipients contenant ces solutions une dizaine de minutes au bain-marie avant d'effectuer le mélange enzyme-rejet.

-A un instant zéro choisi, introduire rapidement la solution de pepsine dans le récipient contenant la solution de rejet. Bien homogénéiser le mélange obtenu. Effectuer tout de suite un prélèvement de 10ml de milieu réactionnel et le verser dans un tube contenant 5ml de CCl_3COOH à 20%.

-Pendant la suite de la réaction, on effectuera d'autres prises d'échantillon à raison d'un prélèvement toutes les 30 minutes et ce pendant 6 heures et demie.

Il faudra par ailleurs, veiller à maintenir une agitation régulière du milieu réactionnel pendant toute cette durée. On fera encore 2 ou 3 prélèvements après environ 22 à 25 heures de réaction.

-Le temps de contact entre les prises d'essais provenant du milieu réactionnel et l'acide trichloroacétique est de 10 minutes. Au bout de ce temps, le contenu de chacun des tubes où a eu lieu la coagulation est filtré dans un autre tube.

-On prélève alors, pour chaque tube obtenu, 1ml de filtrat que l'on introduit dans un tube préparé contenant 4ml de réactif de Cornall. Ces nouveaux tubes sont alors placés 30 minutes à l'obscurité. On procède ensuite à la mesure de la densité optique de leur contenu à une longueur d'onde de 540nm.

8.3 Exploitation des résultats:

-Les densités optiques lues sont converties en valeurs de concentration au moyen d'une courbe d'étalonnage établie auparavant.

-Pour chaque type de pepsine étudié, on trace la courbe donnant la concentration en produit (protéines hydrolysées) en fonction du temps de réaction.

8.4 Interprétation des résultats:

L'enzyme gastrique peptidique de base est la pepsine. Elle est capable de digérer presque tous les types de protéines de l'alimentation [28] entre autre celles issues des rejets de poissonneries.

On tient à noter tout d'abord, qu'il a été impossible de suivre l'évolution exacte de la digestion des rejets par les différentes enzymes, entre 7 et 22 heures de son déroulement et ce pour des raisons pratiques.

Les représentations graphiques donnant la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps comme le montre le graphe de la figure n°II.11, passent toutes par l'origine puis présentent une croissance qui s'estompe graduellement pour faire place à un palier.

Les hydrolyses ne s'effectuent pas de la même façon dans les trois cas, en effet:

-Pour une concentration en enzyme brute à 9%, la réaction démarre lentement (la vitesse initiale est de 0,4g/lh), le palier est atteint après 15 heures d'hydrolyse, la concentration en protéines hydrolysées est alors égale à 2g/l.

-Pour une concentration en enzyme brute à 22% la réaction démarre plus vite (la vitesse initiale est de 1,1g/lh) , le palier est atteint après 4 heures d'hydrolyse, la concentration en protéines hydrolysées est de 2,2g/l.

-Pour ce qui est de l'enzyme commerciale utilisée à une concentration de 2%, la réaction démarre très vite (la vitesse initiale est de 3,2g/lh), le palier est atteint après 5 heures de digestion, la concentration est alors de l'ordre de 4g/l.

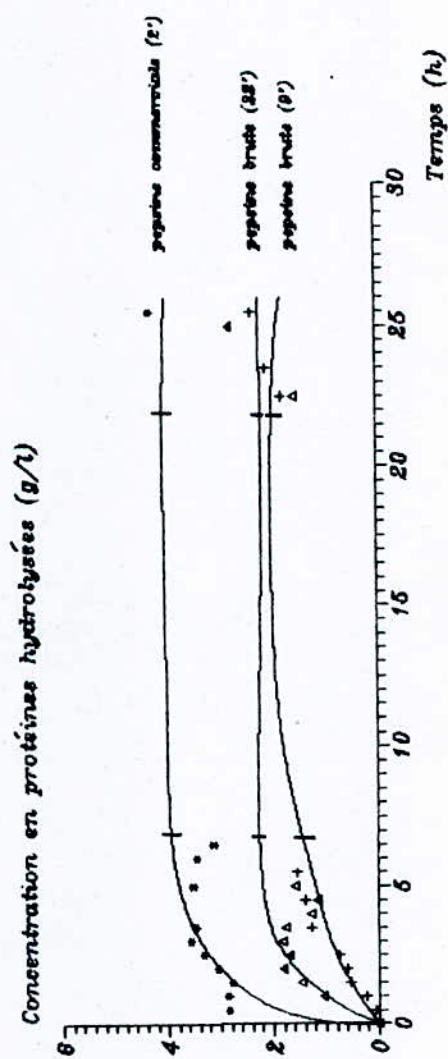


Figure II.11 : Concentration en protéines solubles dans le TCA en fonction de la durée d'hydrolyse des rejets avec, d'une part, une pepsine brute, et d'autre part, une pepsine commerciale.

On calcule le taux de protéines hydrolysées par rapport à la ^{concentration}masse initiale de rejet utilisée dans chacun des trois cas, les résultats sont regroupés dans le tableau n°II.3.

Nature de l'enzyme	Concentration en enzyme (%)	Taux de protéines hydrolysées (%)
Brute	9	5.71
Brute	22	6.28
Commerciale	2	11.43

Tableau n°II.3: Calcul des taux de protéines hydrolysées en fonction de la nature et de la concentration d'enzyme.

De la comparaison de ces efficacités d'hydrolyse, il ressort que l'enzyme commerciale à 2% donne le meilleur rendement d'hydrolyse (11,43 %), en seconde position, on retrouve l'enzyme brute à 22% (6,28%), enfin celle à 9% (5.71%).

On tient à attirer l'attention sur le fait que ces taux auraient été plus élevés et plus parlants s'ils avaient été calculés relativement à l'azote protéique existant initialement dans les rejets de poissonneries, et ce par dosage de l'azote Kjeldahl et sachant que:

Concentration en protéines = Concentration en azote Kjeldahl x 6.25 [24], [29].

Mais pour des raisons pratiques, nous n'avons pas pu procéder à ce dosage.

La récapitulation des résultats précédents, nous mène à dire que:

-Plus la concentration en enzyme brute augmente, plus la vitesse initiale d'hydrolyse est grande, par conséquent, plus le temps nécessaire pour atteindre le palier est court, ^{on}

remarque que les concentrations maximales en protéines hydrolysées sont très peu différentes pour les deux concentrations en pepsine brute utilisées, ceci d'une part.

-D'autre part, le palier atteint par l'hydrolyse des rejets faite grâce à l'enzyme commerciale à une concentration de 2% est égale au double de celui relatif à l'enzyme brute à 22%.

Cependant, il est important de rappeler que l'usage auquel on destine l'hydrolysât, c'est à dire l'enrichissement de l'alimentation du bétail ne nécessite pas une ^{enzyme de} pureté très poussée [6], donc l'utilisation d'une enzyme commerciale est dans ce cas superflue.

Il serait donc plus intéressant d'optimiser la concentration en enzyme brute afin d'obtenir le résultat d'hydrolyse escompté.

En vue d'évaluer les résultats d'hydrolyse obtenus, on les compare avec ceux de L. SI AMMOUR [14] que l'on a résumés dans le tableau n°II.4.

	Durée de l'hydrolyse (heures)	
	2	4
Concentration en pepsine brute (% : poids de muqueuse/poids de rejets solides de poissonneries)	Concentration en protéines hydrolysées (mg/l)	
0.25	29	33.5
3	32	37
9	33	42

Tableau n°II.4: Tableau récapitulatif des résultats d'hydrolyse des rejets solides de poissonneries par la pepsine brute [14]

Au regard de ces derniers resultats, on remarque que l'on atteint un stade d'hydrolyse bien avancé.

Si l'on se penche sur le côté économique de l'hydrolyse, tout autre paramètre identique, on optera pour une enzyme brute compte tenu du coût dérisoire de l'estomac du mouton (280g d'enzyme sec pour 30DA) par rapport à celui de pepsine commerciale (des laboratoires SIGMA, 100g pour 5400FF correspondant à 18360DA).

ETUDE III

L'ULTRAFILTRATION

- Principe de l'ultrafiltration (UF)
- Membranes et modules
- Mécanisme de l'UF
- Autres paramètres influant sur l'UF
- Conditions opératoires en UF
- Principales applications industrielles de l'UF
- Etude expérimentale

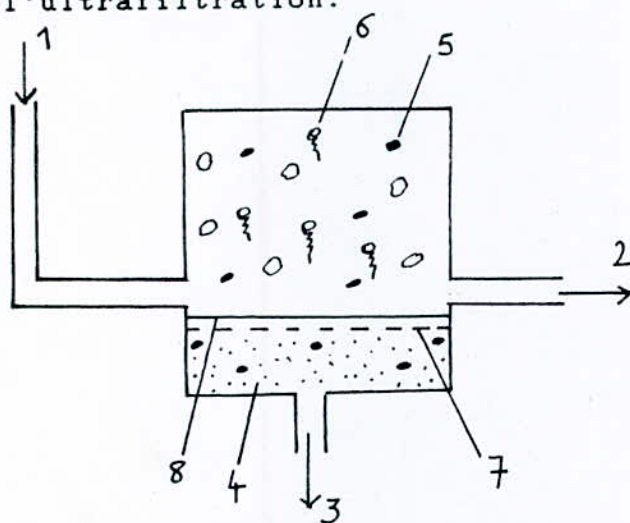
1 PRINCIPE DE L'ULTRAFILTRATION:

L'ultrafiltration permet d'extraire le solvant et les solutés (ioniques ou moléculaires) d'une solution contenant également des macrosolutés qui eux sont retenus [26].

C'est un procédé "mécanique" de séparation basé sur les propriétés de tamisage moléculaire d'une membrane poreuse balayée tangentielle par le liquide contenant les constituants à séparer [25].

Le mécanisme séparatif est analogue à une filtration à travers des pores ultrafins, cependant des interactions physico-chimiques entre les espèces et la membrane entrent aussi en jeu [26].

La figure n°III.1 illustre le principe général de l'ultrafiltration.



- 1-solution à ultrafiltrer,
- 2-rétentat,
- 3-ultrafiltrat,
- 4-solvant,
- 5-macromolécules de faible masse,
- 6-macromolécules de forte masse,
- 7-support de membrane,
- 8-membrane.

Figure n°III.1 : Principe général de l'ultrafiltration pour un système continu [13].

2 MEMBRANES ET MODULES:

2.1 Les membranes:

A l'heure actuelle, les membranes utilisées en ultrafiltration présentent le plus souvent une structure asymétrique, c'est à dire constituée de deux couches superposées: la première, de 0.1 à 0.5 μm d'épaisseur, jouant le rôle de pellicule semi-perméable, la seconde, beaucoup plus poreuse, de 100 à 200 μm d'épaisseur, servant de support à la première [13].

On peut caractériser une membrane par son seuil de coupure ou "cut-off". Ce dernier se définit comme étant la masse molaire (en Daltons) correspondant à une rétention pratiquement totale, ou supérieure à une référence donnée, la plupart du temps comprise entre 0.9 et 1 [26].

En ultrafiltration, le seuil de coupure des membranes peut aller de 1000 à 500000 en masse moléculaire des substances retenues [25].

La figure n°III.2 représente la courbe de rétention typique d'une membrane d'ultrafiltration.

Dans ce qui suit, on résume les principales caractéristiques des différentes natures de membranes, leurs avantages et inconvénients [25].

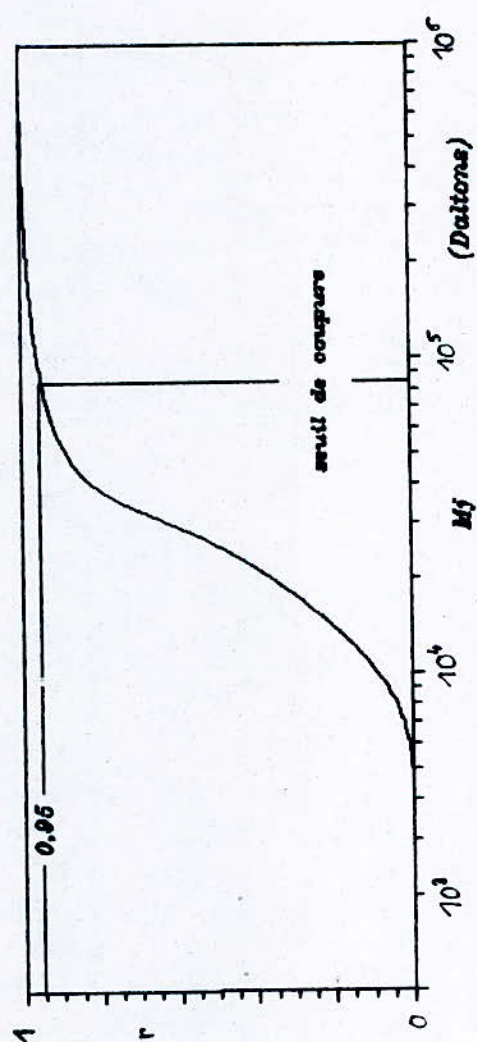


Figure III.2 : Courbe de retention typique d'une membrane d'ultrafiltration.

Seuil de coupure .10 ³ Dalt.	pH	Tp max d'ut ilisation (°C)
--	----	----------------------------------

DERIVES DE LA CELLULOSE

<u>Inconvénients:</u> -Limites incompatibles avec les exigences des industries traitant les liquides biologiques. -Faible résistance aux agents oxydants et aux attaques bactériennes.	1-160	3-8	50
--	-------	-----	----

POLYMERES DE SYNTHESE

(polyamides, polyacrylonitriles, polysulfones, polymères fluorés,...)

<u>Avantages:</u> -Choix en fonction des conditions opératoires de la séparation, ou en fonction de la résistance à la température ou aux solvants organiques.	1-100	0-14	50-100
---	-------	------	--------

<p><u>Inconvénients:</u></p> <p>-Mauvaise résistance aux désinfectants chlorés, au compactage mécanique, à la stérilisation à la vapeur.</p> <p>-Réactivité électrochimique.</p> <p>-Certaines membranes contiennent des additifs qui peuvent se solubiliser et se retrouver dans la préparation finale, ce qui est fort gênant pour les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques.</p>			
---	--	--	--

MINERALES

<p><u>Avantages:</u></p> <p>-Grande stabilité mécanique (40kg/cm²).</p> <p>-Stérilisation à la vapeur.</p> <p>-Stérilisation aux oxydants.</p> <p>-Utilisables aux solvants organiques.</p> <p>-Agréées par le Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique de France.</p>	1-300	0-14	400
--	-------	------	-----

<u>Inconvénients:</u> -Porosité non uniforme. -Pouvoir de coupure nominal variant de 10 à 50%.			
--	--	--	--

2.2 Les modules:

Les membranes sont assemblées dans un dispositif nommé module. Plusieurs modules associés selon divers arrangements constituent eux une unité.

L'élaboration d'un module doit satisfaire des exigences techniques parfois contradictoires et qui sont [26]:

- des conditions adéquates d'écoulement,
- une surface spécifique d'échange élevée,
- un investissement minimal,
- un entretien aisé.

Quatre types de configuration sont possibles [25]:

-le module plan: constitué d'un empilement de plaques porte-membrane et de plaques séparatrices, serrées entre les plateaux d'une presse.

-Le module tubulaire: dans lequel la membrane tapisse l'intérieur d'un cylindre en acier poreux ou en fibre de verre.

-Le module à fibres creuses: constitué d'une quantité prodigieuse de fibres cylindriques creuses de la taille d'un cheveu, assemblées en faisceau.

-Le module spiral: Qui est en fait un système plan enroulé sur lui même. Le filtrat est collecté par le tube qui se situe au centre du cylindre.

Signalons par ailleurs que les installations d'ultrafiltration peuvent fonctionner soit en mode continu soit en mode discontinu.

Les opérations en continu sont bien adaptées aux grandes unités. De plus, le temps de séjour en mode continu est plus court qu'en mode discontinu, ce dont il faut tenir compte lorsque les mélanges à traiter contiennent des agents microbiens ou dénaturants [26].

3 MECANISME DE L'ULTRAFILTRATION:

En UF, seul le solvant, en l'absence de soluté, suit la loi de Darcy. En effet, le flux volumique noté J_v a pour expression: [13]

$$J_v = L_v \cdot \Delta p \quad (ms^{-1}) \quad (III.1)$$

En présence de soluté, plusieurs phénomènes prennent naissance à la membrane [13] et l'écoulement à travers la membrane étant laminaire, il est donc régi par la relation de Kedem et Coll. Le flux volumique de perméat s'exprime alors par l'équation: [26]

$$J_v = L_v (\Delta p - \sigma \Delta \Pi) \quad (ms^{-1}) \quad (III.2)$$

avec:

L_v : perméabilité hydraulique ($ms^{-1} Pa^{-1}$),

Δp : différence de pression transmembranaire (Pa),

$\Delta \Pi$: différence de pression entre amont et aval (Pa),

σ : réflexion de Staverman (adim.)¹.

La différence de pression osmotique est régie par la loi de Van't Hoff pour les solutions diluées:

$$\Delta \Pi = \frac{\Delta C}{M} \cdot R \cdot T \quad (Pa) \quad (III.3)$$

¹ C'est la proportion maximale (théorique) du soluté retenu par rapport au soluté arrivant sur l'interface. Il s'agit d'une propriété du couple membrane solution indépendante des variables externes [26].

avec:

ΔC : différence de concentration du soluté entre amont et aval (Kg/m^3),

M: masse molaire du soluté (Kg),

R: constante des gaz parfaits,

T: température absolue (K).

Par contre, pour des solutions concentrées dont la fraction massique en soluté dépasse 10%, l'expression de la pression osmotique se traduit souvent par un polynôme [26]:

$$\Pi = f(C) = a_1 C + a_2 C^2 + \dots = \sum a_i C^i \quad (\text{Pa}) \quad (\text{III.4})$$

La loi de Hagen-Poiseuille permet de calculer la valeur de la perméabilité hydraulique L_v , on a [26]:

$$L_v = \frac{\epsilon \Phi_p^2}{32 \rho \nu \tau l} \quad (\text{ms}^{-1} \text{Pa}^{-1}) \quad (\text{III.5})$$

avec:

ϵ : porosité (adim.),

Φ_p : diamètre moyen des pores (m),

ρ : masse volumique de la membrane (Kg/m^3),

ν : viscosité cinématique de la solution (m^2/s),

τ : tortuosité des pores (adim.),

l: épaisseur de membrane (m).

L'équation (III.4) appelle deux remarques [25]:

-une viscosité importante a un effet défavorable sur le débit du perméat,

-une membrane trop épaisse provoque une diminution de ce débit.

On définit par ailleurs, le taux de rejet observé R_o , comme étant la fraction du soluté retenue par la membrane [13].

$$R_o = 1 - \frac{C_p}{C_o} \quad (\text{III.6})$$

avec:

C_p : concentration en soluté dans le perméat,

C_o : concentration en soluté dans la solution.

4 AUTRES PARAMETRES INFLUANT SUR L'ULTRAFILTRATION:[26]

Ils peuvent se résumer ainsi:

-le débit d'alimentation du système de filtration: il influe sur le débit de perméation.

-L'hétéroporosité: plus la taille des pores est homogène et plus la sélectivité de la membrane est grande.

-La polarisation de concentration: au cours de l'opération d'ultrafiltration, les solutés retenus s'accumulent à l'interface membrane-solution et forment une couche de polarisation. Ce phénomène réversible est appelé polarisation de concentration.

-Le colmatage: cette concentration du rétentat peut entraîner des précipitations et la formation d'une couche solide plus ou moins dense à la surface de la membrane. Le débit de perméat diminue alors et la séparation devient moins bonne, les petites molécules se trouvant partiellement retenues. Le colmatage est généralement irréversible et il a lieu en trois étapes:

- la polarisation de concentration,
- l'adsorption de macromolécules,
- la polymérisation de la couche adsorbée.

5 CONDITIONS OPERATOIRES EN ULTRAFILTRATION:

Des conditions opératoires adéquates permettent de réduire les inconvénients cités précédemment [26]:

-une grande vitesse de circulation permet de diminuer la polarisation de concentration. En général, des vitesses de 0.5 à 2m/s sont adoptées pour les modules fonctionnant en régime laminaire. Pour les modules fonctionnant en régime turbulent, on utilise des vitesses de 2 à 6m/s.

-La pression opératoire est comprise entre 200 et 500KPa, selon la membrane et la nature de la solution. Le flux de perméat varie généralement entre 1 et 100l/hm².

La figure n°III.3 nous montre l'effet simultané de la pression et de la vitesse d'écoulement de la charge sur le flux d'ultrafiltration [26].

Le flux augmente linéairement au départ, mais à partir d'un certain seuil, il tend généralement vers une limite qui dépend de la nature des solutés, de leur concentration dans la charge et de la vitesse de circulation de celle-ci.

-La température est limitée par la stabilité des macrosolutés (protéines, enzymes, colloïdes) et de la membrane. A noter que certaines membranes minérales supportent des températures de l'ordre de 400°C.

-Un prétraitement (ajustement de pH, addition d'agents complexants, filtration, centrifugation) de la solution à ultrafiltrer est parfois nécessaire.

-Enfin, il faut régulièrement procéder au nettoyage et à la désinfection des membranes. On utilise en général des détergents, du formol ou du chlore dilué.

6 PRINCIPALES APPLICATIONS INDUSTRIELLES DE L'ULTRAFILTRATION:

L'ultrafiltration intervient désormais dans des domaines très divers et permet par exemple d'atteindre les objectifs suivants:

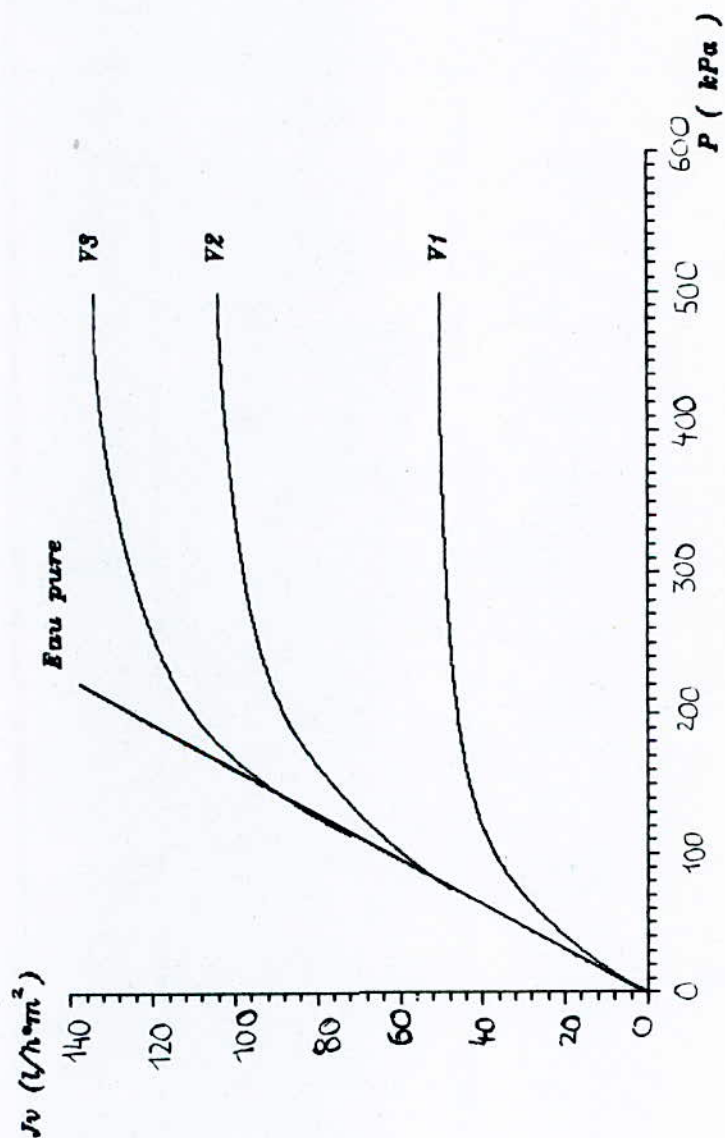


Figure III.3 : Evolution générale du flux d'ultrafiltration en fonction de la pression et de la vitesse V_i d'écoulement de la charge ($V_3 > V_2 > V_1$).

- purification de molécules (enzymes, albumines...),
- séparation des protéines,
- clarification des jus de fruits,
- concentration des cultures de microorganismes (levures, bactéries),
- filtrations stérilisantes dans les domaines agro-alimentaire, pharmaceutique et médical,
- concentration des antibiotiques, vitamines et acides aminés,
- récupération des métaux,
- purification et concentration des colorants,
- dépyrogénéation des solutions injectables,
- séparation et concentration des protéines du lait et lactosérum (petit lait),
- fabrication de fromages,
- traitement des émulsions eau-huile,
- traitement des effluents de tanneries, papeteries.

7 ETUDE EXPERIMENTALE:

Des essais d'ultrafiltration sont effectués sur l'hydrolysate obtenu par l'action de la pepsine brute sur les rejets solides de poissonneries.

Ces essais ont pour but d'étudier l'influence de la vitesse d'agitation et de la pression sur le flux d'ultrafiltrat. Ceci se traduit par le tracé de courbes de polarisation.

7.1 Description du dispositif expérimental:

En raison du faible volume d'hydrolysate disponible, les essais d'ultrafiltration sont réalisés à l'aide d'une cellule statique. Cette dernière est représentée sur la figure n°III.4, ses caractéristiques sont les suivantes: [27]

- capacité: environ 500cm³,
- membrane: organique en copolymères d'acrylonitrile IRIS 3038, seuil de coupure 20000 Daltons, fabricant Rhône-Poulenc,
- surface active de la membrane: $3.85 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$,
- pression opératoire maximale: 2bars,
- agitation: au moyen d'un agitateur magnétique, ceci dans le but d'augmenter la turbulence, donc de réduire la couche de polarisation et d'augmenter le rendement de l'ultrafiltration.

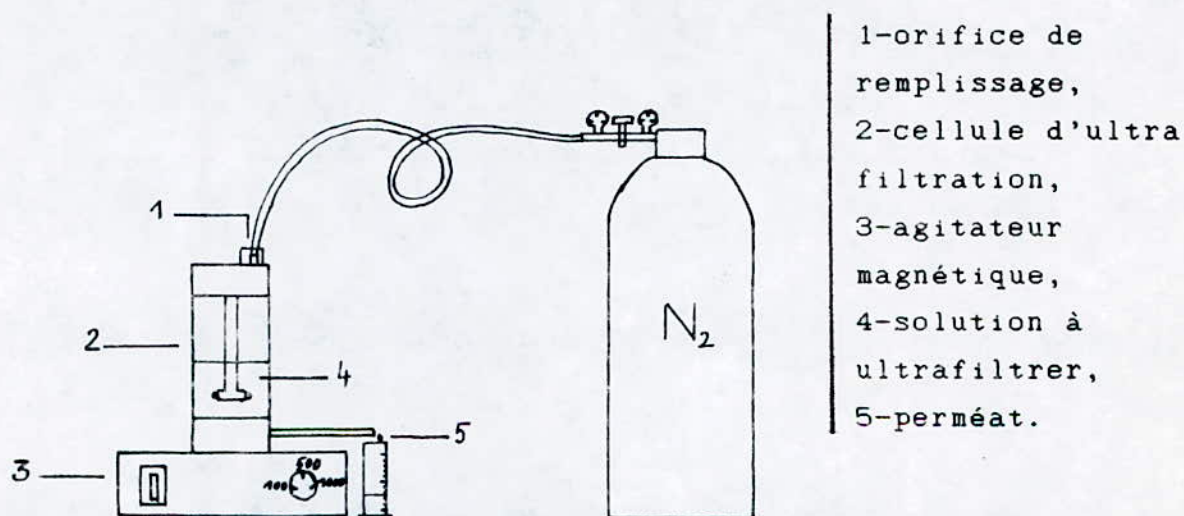


Figure n°III.4 : Dispositif d'ultrafiltration

7.2 Mode opératoire:

La manipulation comporte trois étapes:

- établissement de la courbe solvant (eau distillée). Cette courbe est indépendante de la vitesse d'agitation,
- établissement des courbes de polarisation pour l'hydrolysat prétraité (filtration sur papier filtre ordinaire),
- établissement des courbes de polarisation pour l'hydrolysat brut.

Précaution à prendre:

avant d'ultrafiltrer, il est indispensable de ramener le pH de l'hydrolysate à une valeur comprise entre 6 et 7 et ceci afin d'éviter de détériorer la membrane.

Les prises de données se font en fixant la vitesse d'agitation, V , tout en faisant varier la pression p . Pour chaque valeur de pression, mesurer le débit Q . Ce dernier est déterminé par empotage: à l'aide d'une éprouvette graduée, recueillir un volume V de perméat tout en mesurant la durée Δt nécessaire à cette opération. On a alors: $Q = V / \Delta t$, et, si S est la surface active de la membrane, alors le flux de perméat, J_v , est tel que: [27]

$$J_v = \frac{V}{S \Delta t} \quad (III.7)$$

De manière à évaluer l'efficacité de l'opération d'ultrafiltration, on procédera au dosage des protéines présentes dans le perméat. On utilisera pour cela la méthode du biuret.

7.3 Présentation des résultats expérimentaux:

Pour chaque valeur de vitesse d'agitation, on trace le graphe donnant le flux de perméat en fonction de la pression appliquée ($J_v = f(p)$). Les résultats des essais d'ultrafiltration sont représentés sur les graphes des figures n°III.5 et n°III.6.

7.4 Interprétation des résultats obtenus lors des essais d'ultrafiltration:7.4.1 Courbe de solvant:

La courbe solvant établie avant d'ultrafiltrer l'hydrolysate, est une droite d'équation $J_v = a \cdot p$. Ceci est

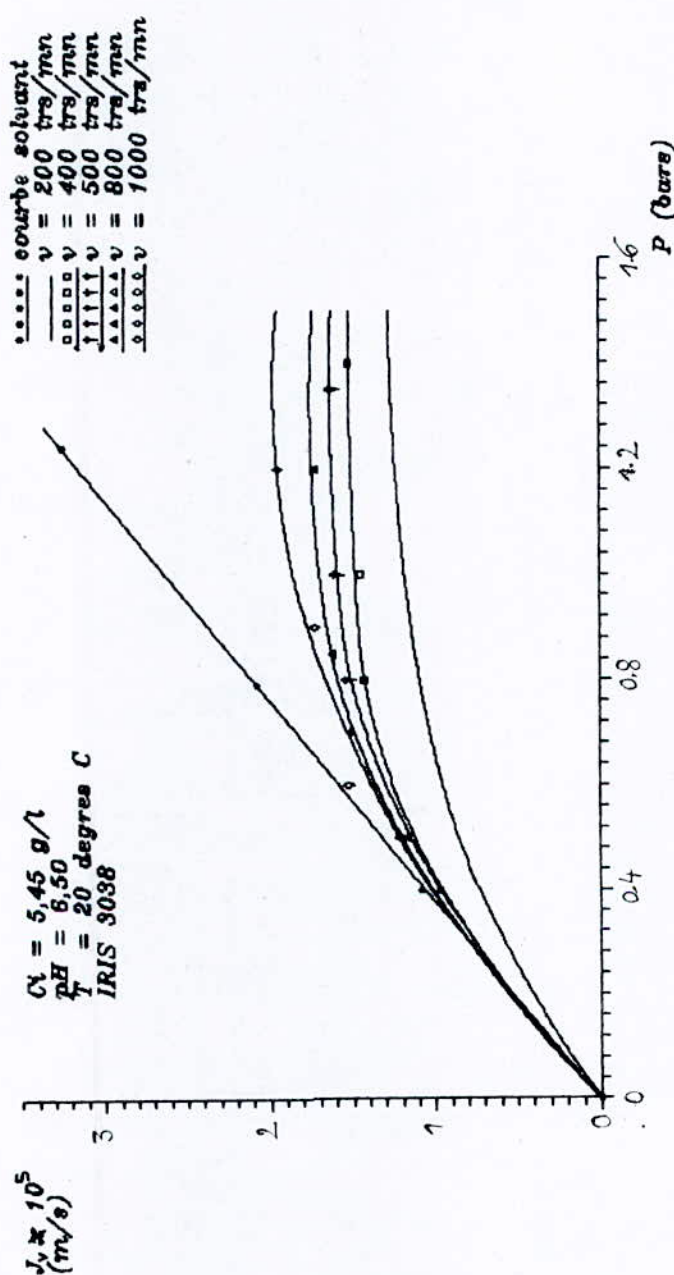


Figure III.5 : Evolution du flux de perméat J_v en fonction de la pression pour différentes vitesses d'agitation dans le cas de l'hydrolysat prétraité.

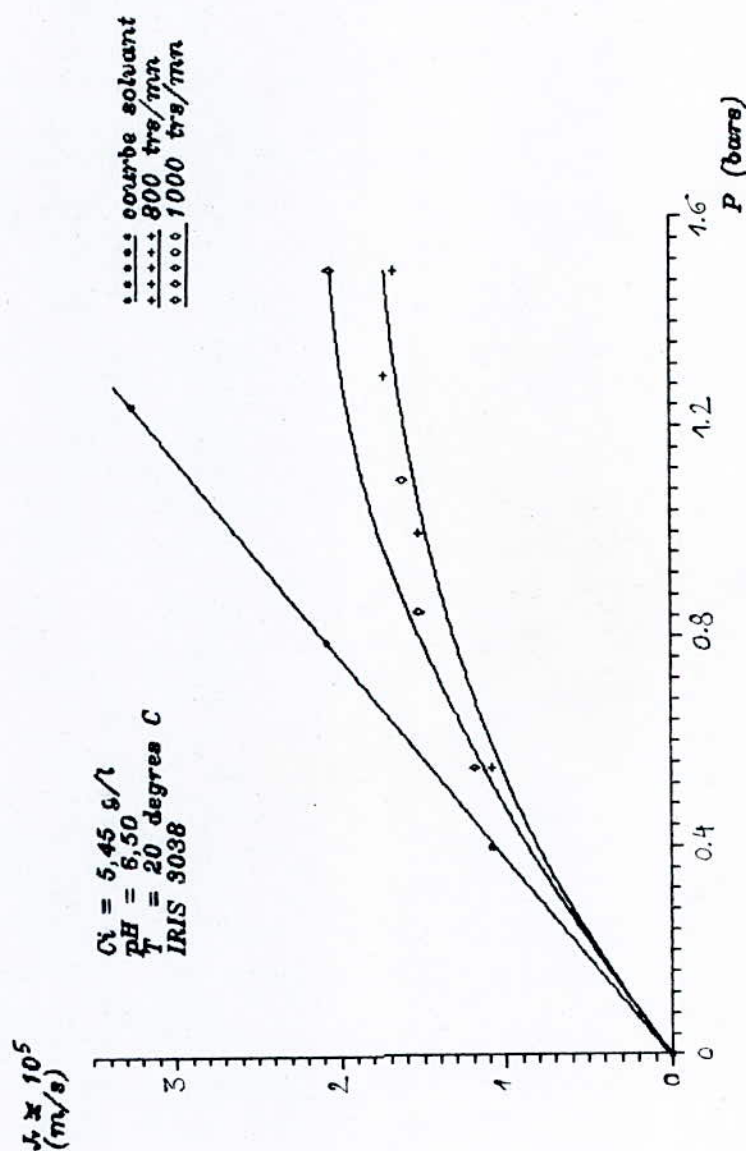


Figure III.6 : Evolution du flux de perméat J_p en fonction de la pression pour différentes vitesses d'agitation dans le cas de l'hydrolysats brut.

conforme à la loi de Darcy: $J_v = L_p \Delta p$ (où L_p est la perméabilité de la membrane), et s'explique par le fait qu'il n'existe pratiquement pas de macromolécules dans l'eau. La seule résistance qui s'oppose au transfert à travers la membrane est la résistance de la membrane elle-même. Il n'y a pas de résistance due à la polarisation au niveau de la membrane.

Graphiquement on obtient:

$$L_p = 1.54 \cdot 10^{-8} \quad \text{ms}^{-1} \text{Pa}^{-1}$$

7.4.2 Courbes de polarisation:

Ces courbes ont toutes la même allure: elles sont linéaires au départ puis tendent à former un palier. Au delà d'une certaine valeur de pression, le flux de perméat, J_v , n'est plus proportionnel au gradient de pression Δp .

On constate en outre, que le flux de perméat est alors bien inférieur au flux de solvant et cette diminution est d'autant plus importante que la vitesse d'agitation est faible.

Ceci peut s'expliquer par le phénomène de polarisation de concentration: une augmentation de la pression, conduit à l'accumulation des solutés retenus, au niveau de la membrane ce qui se traduit par une diminution du débit de perméation. La séparation est moins bonne car les petites molécules peuvent être partiellement retenues.

Cependant, le fait d'augmenter la vitesse d'agitation crée une plus grande turbulence au niveau de la membrane ce qui a pour effet de réduire la couche de polarisation. C'est pour cette raison que l'on obtient de meilleurs flux de perméation en élevant la vitesse d'agitation.

Si l'on compare les courbes obtenues avec l'hydrolysate prétraité et celles obtenues avec l'hydrolysate brut, on constate qu'à vitesse égale, la perméabilité de la membrane diminue dans le cas où l'on utilise l'hydrolysate brut.

Ceci peut aussi s'expliquer par le phénomène de polarisation de concentration. Ce dernier se produit beaucoup plus rapidement dans le cas où l'on utilise l'hydrolysate brut qui est plus chargé que l'hydrolysate prétraité.

Il en résulte que pour une même pression, le flux de perméat obtenu à partir de l'hydrolysate brut est inférieur à celui obtenu avec l'hydrolysate prétraité.

Pour finir on constate que dans les deux cas étudiés (hydrolysate brut ou prétraité), les taux de récupération en protéines et peptides obtenus sont très élevés. Leur moyenne est en effet de l'ordre de 80%. Le tableau n°III.1 résume les résultats obtenus.

V (tr/mn)	Concentration (g/l)	Rendement (%)
HYDROLYSAT PRETRAITE		
200	3.78	69.3
400	5.09	93.4
500	4.51	82.8
800	4.09	75.0
HYDROLYSAT BRUT		
800	4.11	75.4
1000	4.72	86.6

Tableau n°III.1: Dosage des protéines dans le perméat.

On peut donc en conclure que l'ultrafiltration semble être un procédé tout à fait adapté à la récupération des protéines et des peptides présents dans l'hydrolysat.

CONCLUSION

La synthèse des résultats auxquels nous avons aboutis mène aux conclusions suivantes:

-L'hydrolysat enzymatique des rejets solides de poissonneries est réalisable selon un procédé économique basé sur l'utilisation d'une enzyme brute extraite de la muqueuse gastrique du mouton. Les conditions optimales d'activité de la pepsine brute sont:

pH = 1 Température = 35 à 40°C

La concentration finale en protéines hydrolysées obtenue au bout de 4 heures d'hydrolyse de rejets solides de poissonneries, au moyen d'une enzyme brute à 22% est de 2.20g/l.

-De plus, les essais d'ultrafiltration dont a fait l'objet l'hydrolysat, ont permis de montrer que l'ultrafiltration est une technique de séparation adéquate pour la récupération des protéines hydrolysées. Le taux de récupération moyen est de 80%.

-Pour finir, soulignons que les analyses microbiologiques des rejets solides de poissonneries ont révélé une très forte contamination, notamment fécale. Cette contamination est de plus, variable dans le temps. Il est donc impératif de procéder à une stérilisation de ces rejets, étant donné leur fragilité, nous pouvons recommander la tyndallisation.

Compte tenu des résultats exposés ci-dessus, Il nous semble nécessaire d'entreprendre des études plus approfondies en vue de

préciser les conditions optimales d'activité de la pepsine brute. Ces dernières conditionnent en effet l'efficacité du procédé.

En ce qui concerne l'hydrolyse, d'autres concentrations en enzyme brute devraient être testées afin d'améliorer le rendement.

Le milieu étudié étant biologique, donc complexe, nous suggérons aussi un prétraitement tel qu'une centrifugation.

Par ailleurs, une analyse chromatographique de l'ultrafiltrat permettrait de connaître sa composition en peptides et en acides aminés, notamment essentiels.

La connaissance de cette composition est nécessaire pour déterminer dans quelle mesure le perméat deshydraté pourrait contribuer à enrichir l'alimentation animale.

C'est dans ce cadre que l'on sera certainement amené, à plus ou moins long terme, à effectuer des tests biologiques sur des animaux de laboratoire car seuls ces tests pourront permettre d'étudier, in vivo, l'aptitude du produit obtenu à suppléer la ration alimentaire animale.

Bibliographie

- [1] P.Durand; Y.Lagoïn. "Valorisation des sous-produits de la pêche: réalisations et perspectives". Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., n°330, Janvier 1983.
- [2] Loi de Finances 1991. Journal "El Watan" du Mercredi 30 Janvier 1991, p.6.
- [3] E.Yanez; D.Ballester; F.Monckeberg. "Enzymatic fish protein hydrolysate: chemical composition, nutritive value and use as a supplement to cereal protein". Journal of food science, Vol.41, p.1289-1292, 1976.
- [4] G.O.Bucove, G.M.Pigott. "Pilot plant production of a functional protein from fish waste by enzymatic digestion", 1976.
- [5] P.A.Carroad; R.A.Tom. "Bioconversion of shellfish chitine wastes: process conception and selection of microorganisms". Journal of food science, Vol.43, p.1158-1161.
- [6] L.L.Liu; G.M.Pigott. "Preparation and use of inexpensive crude pepsin for enzyme hydrolysis of fish". Journal of food science, Vol.46, p.1569-1572.
- [7] E.M.Civit; M.A.Parin; H.M.Lupin. "Recovery of protein and oil from fishery bloodwater waste: effect of pH and temperature". Water Res., Vol.16, p.809-814, 1982.

- [8] F.W.Welsh; R.R.Zall. "An ultrafiltration activated carbon treatment system for renovating fishery refrigeration brines". Can. Int. Food Sci., Technol.J, Vol.17, n°2, p.092-096, 1984.
- [9] L.Han-Ching. "Valorisation du poisson et perspectives de développement de nouveaux produits: la texturation de chair de poisson". Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit., n°347, Septembre 1984.
- [10] W.T.Mc Comis; J.H.Litchfield. "Meat, fish and poultry processing wastes". Journal WPCF, Vol.57, n°6, p.570-572, Juin 1985.
- [11] P.Jaouen; P.Bellville; J.P.Schlumpf; F.Quemeneur. "Optimisation d'un procédé à membrane pour le traitement d'eaux de lavage de pulpe de poisson". RPGTM Nancy, Vol.1, n°2, 1987.
- [12] G.B.Quaglia; F.Paoletti. "Removal of small peptides from enzymic hydrolysate of fish protein". Chimicaoggi, p.67-69, 1988.
- [13] K.Dendenç. "Optimisation du procédé d'ultrafiltration pour la récupération des protéines des eaux de lavage des poissons". PFE, ENP, Juin 1990.
- [14] L.Si Amour. "Etude microbiologique et biochimique d'un concentré de protéines obtenu par digestion enzymatique de rejets de poissonneries". PFE, INES de biologie de Tizi-Ouzou, Décembre 1990.
- [15] A.Wibout. "Le livre des produits alimentaires, commercialisation, valeur, utilisation, consommation". Ed Max Brézol, 1986.
- [16] C.Kessous. "Biochimie structurale". Office des Publications Universitaires, 1987.
- [17] F.Chapeville, H.Clauser. "Biochimie". Hermann, 1974.

- [18] J.Kruh. "Biochimie, études médicales et biologiques". Tome 1, Hermann, 1982.
- [19] J.C.Collin, R.Delaucourt. "Actualités des industries alimentaires et agro-alimentaires, à propos des méthodes d'analyse des enzymes applicables aux préparations enzymatiques industrielles". Juin 1988.
- [20] R.E.Vega; J.G.Brennan. "Enzymic hydrolysis of fish offal without added water". Journal of food engineering, p.201-215, 1988.
- [21] L.Petit. "Les protéines". Culture technique, n°16, INRA, p.252, 1986.
- [22] A.I.Lehninger. "Biochimie". Flammarion, 1977.
- [23] P.Chevaillier. "La cellule, étude structurale et moléculaire". Collection Academic Press, 1981.
- [24] J.Guiraud; P.Galzy. "L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires". Collection Génie Alimentaire, Ed de l'Usine Nouvelle, 1980.
- [25] N.Cochet; M.Nonus. "La filtration sur membranes". Le technoscope de Biofutur, p.3-13, Biofutur n°5, Septembre 1986.
- [26] J.P.Brun. "Procédés de séparation par membranes". Masson, 1989.
- [27] N.Nimour; D.Kellal. "Valorisation des effluents d'industries agro-alimentaires: le sang et le lactosérum". PFE, ENP, Juin 1988.
- [28] A.C.Guyton. "Traité de physiologie médicale". Doin, 1980.
- [29] M.Debatisse. "Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires". Tome 4, Techniques et Documentation, 1991.
- [30] C.Alais; G.Linden. "Abrégés de biochimie alimentaire". Masson, 1987.

- [31] Dictionnaire LAROUSSE 1990.
- [32] Encyclopédie UNIVERSALIS 1986.
- [33] TP de biochimie 4^e année. "Dosage des protéines". ENP, Département Génie de l'Environnement, 1990.

Annexe

DOSAGE DES PROTEINES:

Les méthodes de dosage des protéines se scindent en deux:

- les premières se basent sur les propriétés physiques ou chimiques des protéines;

- les secondes, comme c'est le cas de la méthode de Kjeldahl, donnent la teneur en azote total après minéralisation de la matière organique [29].

Tenant compte du nombre d'échantillons que l'on a à analyser, des moyens et du temps dont on dispose, on a opté pour la méthode du biuret.

METHODE DU BIURET:

Cette réaction est caractérisée par le développement de la coloration bleu-violacée du complexe des ions cuivriques avec les liaisons peptidiques en milieu alcalin.

Cette coloration sera donc caractéristique des peptides et des protéines, cette réaction est générale et l'intensité de la coloration est directement liée à la teneur en protéines.

Cependant la longueur d'onde varie avec la nature de la protéine (nombre de liaisons peptidiques): la lecture photométrique est faite entre 540 et 650nm, le plus souvent à 550nm.

L'écalonnage du spectrophotomètre est réalisé à partir d'un ou plusieurs étalons de la même protéine.

Pour un mélange de protéines, la solution étalon doit avoir une composition chimique qualitativement identique à celle de la solution à doser. En pratique, on se limite au choix d'une solution étalon de composition voisine [33].

MODE OPERATOIRE:

TRACE DE LA COURBE D'ETALONNAGE:

A partir d'un sérum étalon, dans notre cas un sérum de BSA, dont le titre en protéines est connu, on réalise les dilutions quantitatives suivantes à l'aide d'eau physiologique: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80.

Dans une série de quatre tubes à essais numérotés de 1 à 4, on introduit 1ml de chacune des dilutions puis 4ml de réactif de Cornall¹.

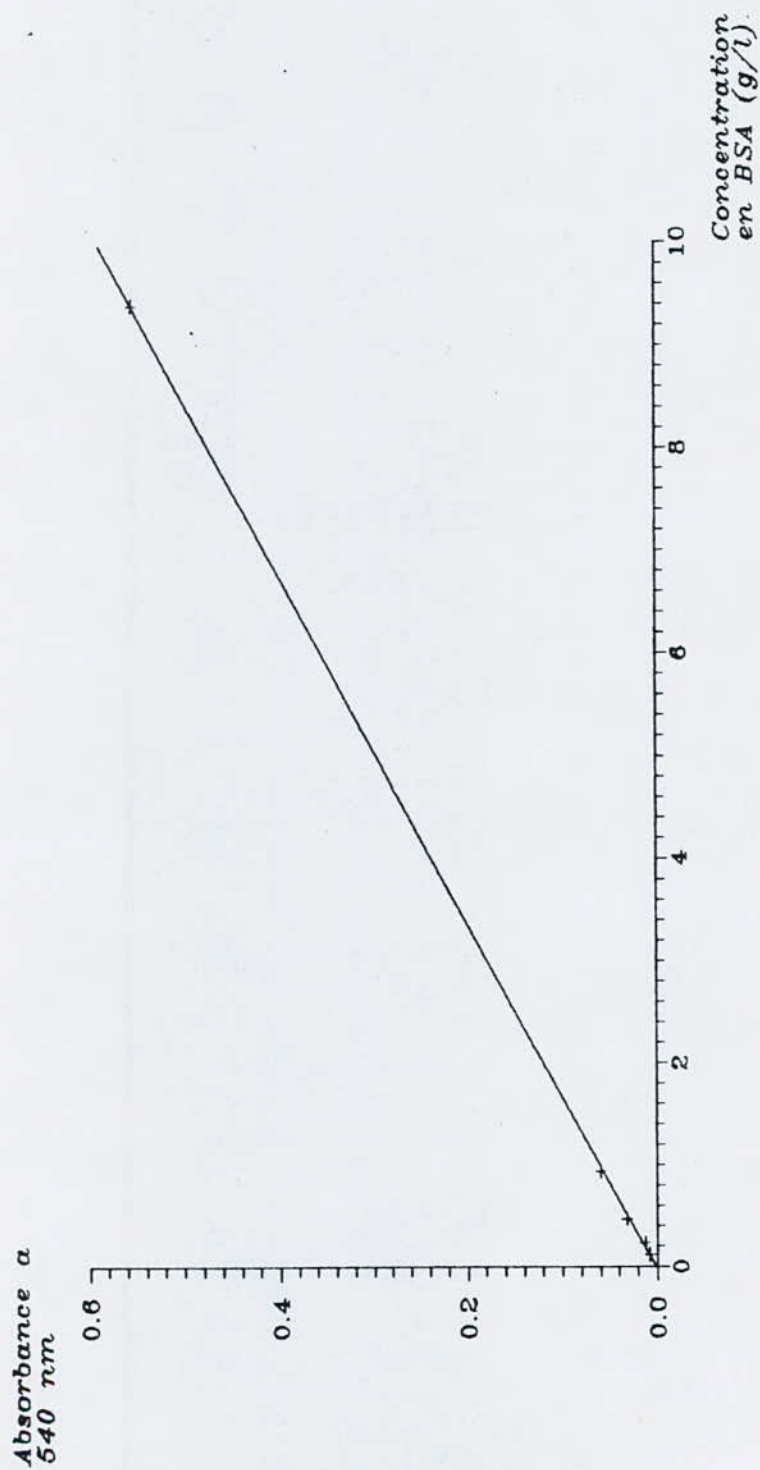
Le blanc est réalisé à partir d'1ml d'eau physiologique et 4ml de réactif de Cornall.

Bien agiter chaque tube, puis attendre 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

Une fois ce temps écoulé, on lit la densité optique des tubes contre le blanc à 540nm.

¹ Réactif de Cornall: dissoudre dans de l'eau distillée: 8g de NaOH, 3g de K,Na tartrate quadrihydraté, 0.6g de KI, 0.7g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Mélanger et compléter avec de l'eau distillée à 200ml.



Courbe d'étalonnage pour la methode du biuret.

DOSAGE DES PROTEINES DANS L'ECHANTILLON:

Au besoin, lorsque la densité optique de l'échantillon à étudier se trouve en dehors de la gamme des densités optiques relatives à la courbe d'étalonnage, on procède à une dilution de l'échantillon.

Puis on prélève 1ml de cette dilution dans un tube à essais, dans lequel on injecte 4ml de réactif de Cornall. Ce tube est conservé 30 minutes à l'obscurité, on procède ensuite à la lecture de la densité optique de son contenu.

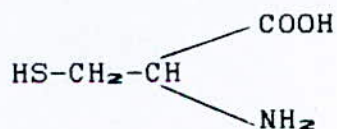
Le calcul de la teneur en protéines de l'échantillon se fera par projection de la valeur de la densité optique mesurée sur la courbe d'étalonnage, en tenant compte du facteur de dilution.

GLOSSAIRE

BSA: de l'anglais: "Bovine Serum Albumin", c'est une protéine (albumine) globulaire extraite du sérum bovin.

CHITINE: substance organique azotée de la cuticule des insectes et autres animaux articulés. C'est un polymère de N-acétylglucosamine [5].

CYSTEINE: c'est un acide aminé de formule: [18]



DALTON: unité de poids égale à la masse d'un seul atome d'hydrogène [16].

DARNE: tranche de poisson [31].

D.B.O : demande biologique en oxygène.

D.C.O demande chimique en oxygène. C'est la quantité d'oxygène (en mg d'O₂/l) nécessaire à l'oxydation chimique des composés organiques.

DEPYROGENATION: elle consiste à éliminer les débris cellulaires présents dans l'eau de distribution, le plus souvent des lipopolysaccharides dont la masse descend jusqu'à 2000 Daltons, et qui sont des substances pyrogènes. Elle est donc surtout

- utilisée pour stériliser l'eau à usage pharmaceutique ou biomédical et peut remplacer avantageusement la distillation [26].
- HYDROFUGE:** qui écarte l'humidité ou qui en préserve.
- LYOPHILISER:** action d'isoler une substance par congélation et sublimation dans le vide, pour lui conserver toutes ses propriétés.
- OSMOSE INVERSE:** l'osmose se caractérise par la diffusion du soluté vers le compartiment le moins concentré parallèlement à la diffusion du solvant vers le compartiment le plus concentré jusqu'à ce que le système atteigne l'équilibre. A l'inverse du phénomène d'osmose, le phénomène d'osmose inverse a lieu si l'on applique une pression supérieure à la pression osmotique du système précédemment décrit, le solvant circule de la solution concentrée vers la solution diluée. Il en résulte une concentration du soluté ou une purification du solvant [26].
- PEPSINE:** c'est une enzyme protéolytique du système digestif humain, qui découpe spécifiquement les protéines aux acides aminés: Phénylalanine, Tyrosine et Leucine [30], Tryptophane et plusieurs autres [16].
- PEPTONE:** les peptones sont les produits ultimes de la digestion des substances albuminoïdes [32].
- PROTEOSE:** produit résultant de la protéolyse (hydrolyse) d'une protéine [32].
- SAUR:** salé puis séché à la fumée [31].
- SICCATIF:** qui a la propriété de faire sécher rapidement [31].

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, surtout à partir de Lieu d'Alaska, et est conservé à -25°C après lavage intensif et traitement aux cryoprotecteurs [9].

DBO:

demande biologique en oxygène. C'est la quantité d'oxygène (en mg d' O_2 / l) nécessaire à l'oxydation microbienne des composés organiques.

