

**ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE**

Département: Génie de l'Environnement  
Laboratoire des Biotechnologies

**Thèse de Magister**

En Génie de l'Environnement  
Option Biotechnologie

*Présentée par*

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة — BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

**SADAT TAHAR**

**EXTRACTION ET SEPARATION DES ACIDES  
AMINES PAR ELECTRODIALYSE**

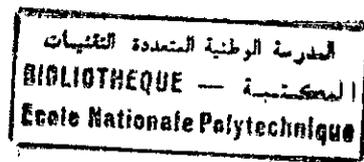
Soutenue publiquement le 21 Décembre 1996 devant le Jury

Mme N. BELHANECHÉ  
Mme H. BENSMAILI  
Mlle J. ARAR,  
M. DJAMOUN,  
M. H. BOURAHLA,  
M. N. MAMERI,

Maître de Conférences (ENP) ,  
Maître de Conférences (U.S.T.H.B)  
Chargée de Cours (ENP) ,  
Docteur, (DG EPEAL),  
Maître de Conférences,(Univ. M. Mammeri)  
Maître de Conférences , ENP,

Président  
Examinatrice  
Examinatrice  
Examinateur  
Examinateur  
Rapporteur

## Avant-propos



*Le présent travail a été réalisé au laboratoire de biotechnologie de l'école nationale polytechnique d'Alger.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers Monsieur N.Mameri, Directeur de laboratoire de biotechnologie, que sa patience remarquable, sa disponibilité permanente puissent être rappelées ici. Il a toujours su m'amener avec compétence à progresser tant sur le plan théorique que pratique. Je lui suis donc tout particulièrement reconnaissant de la confiance qu'il m'accorde et de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être mon Directeur de thèse.*

*Je suis très reconnaissant à Monsieur Hocine Grib pour m'avoir aidé et encouragé pendant toute la période de travail. Ses conseils ont contribué à la réalisation de cette thèse.*

*Je tiens à remercier Madame D. Mameri pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail et ses conseils précieux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Ma gratitude s'adresse aussi à Monsieur H. Lounici pour son aide, Ses encouragements et sa disponibilité constante.*

*J'adresse mes remerciements à Madame Belhaneche, maître de conférence au département Génie de l'environnement, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.*

*Je remercie madame H. Bensmaili, maître de conférence à L'U.S.T.H.B, de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury.*

*Mes remerciements s'adressent à Madame J. Arrar, monsieur Djamoun et Monsieur Bourahla pour m'avoir fait l'honneur en acceptant de critiquer ce travail.*

*Je tiens à remercier Monsieur C. Gavach, Directeur de recherche au C.N.R.S qui m'a fait l'honneur de me recevoir dans son laboratoire pendant deux mois de stage et d'avoir contribué par son savoir à la réalisation de ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur et Madame Sandeaux, maîtres de conférence à l'I. U. T de Montpellier, qui m'ont aidé à travailler dans les meilleures conditions au laboratoire de C.N.R.S. Lors de mon stage en France.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à Mon cousin Hamid Ferrag et à tout les membres de la famille pour m'avoir soutenu et aidé à réaliser ce travail.*

*Je ne serai oublier tous les amis et les membres du laboratoire biotechnologie pour l'amitié qu'ils m'ont témoigné. leur bonne humeur, m'a permis d'effectuer ce travail dans de bonnes conditions.*

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

### CHAPITRE I : ACIDES AMINES

I-1: Généralités .....	3
I-2: Structure Générale des acides aminés.....	9
I-3: Propriétés physico-chimiques des acides aminés .....	9
a- Absorption des acides aminés .....	9
b- Propriétés chimiques des acides aminés .....	9
c- Propriétés acido-basiques des acides aminés .....	9
I-4: Domaines d'utilisation des acides aminés .....	9
I-5 : Méthodes de production des acides aminés.....	13
a- Méthodes de fermentation.....	13
b- Méthodes enzymatiques.....	13
c- Méthodes chimiques.....	14
I-6: Séparation et récupération des acides aminés.....	15

### CHAPITRE II : GENERALITES SUR L'ELECTRODIALYSE ET LES MEMBRANES ECHANGEUSES D'IONS

II-1: Définition de l'électrodialyse .....	17
II-2: Principe de l'électrodialyseur.....	17
II-3: Domaines d'application de l'électrodialyse.....	18
II-4: Membranes échangeuses d'ions .....	19
II-4-1: Définition .....	19
II-4-2: Types de membranes échangeuses d'ions .....	19
4-2-1: Membranes monofonctionnelles.....	19
a- Les membranes échangeuses d'anions .....	19
b- les membranes échangeuses de cations .....	21
II-4-2-2: Membranes bifonctionnelles.....	21
a- Les membranes mosaïques.....	21
b- Les membranes amphotères .....	21
c- Les membranes bipolaires .....	21
II-4-2-3: Types de membranes Selon leur mode de fabrication .....	22
a- Membranes homogènes .....	22
b- Membranes hétérogènes.....	22
II-4-3: Caractéristiques essentielles des membranes échangeuses d'ions .....	22
a- Capacité d'échange.....	22
b- Sélectivité.....	23
c- Taux de réticulation .....	23
d- Résistance mécanique .....	23
e- Résistance électrique.....	23

f-Gonflement.....	24
II-5: Phénomènes accompagnant l'électrodialyse.....	24
II-5-1: Polarisation primaire.....	24
II-5-1-1: Généralités sur le transfert de masse .....	25
a-Equation générale de transfert de Masse .....	25
b-force motrice de transfert .....	26
C-Diffusion lois de FICK.....	27
d- Electromigration .....	28
e- Nombre de transport , Conductance et Conductivité .....	28
II-5-2:courant limite .....	29
II-5-2 : Polarisation secondaire et colmatage des membranes .....	31
II-5-3 : Transport d'eau à travers les membranes .....	31

### CHAPITRE III : APPAREILLAGES ET TECHNIQUES ANALYTIQUES

III-1: Types d'électrodialyseurs utilisés.....	34
III-2: Analyse des acides aminés .....	38
III-3: Analyse des chlorures .....	39
III-4: dosage de sodium.....	39

### CHAPITRE IV: HYDROLYSE DU CRUOR

a- Hydrolyse Enzymatique .....	42
b- Hydrolyse chimique .....	42
c- Décoloration des hydrolysats.....	42
• Résultats et discussion .....	42

### CHAPITRE V: DEMINERALISATION DES HYDROLYSATS

V-1: Etude de phénomène de transport d'eau à travers les membranes.....	45
• Conditions expérimentales .....	45
• Résultats et interprétation .....	45
V-2 : Déminéralisation des hydrolysats.....	48
V-2-1: Déminéralisation de l'hydrolysat enzymatique.....	48
• Mode opératoire .....	48
• Résultats et discussion.....	48

V-2-2: Déminéralisation de l'hydrolysat chimique.....	50
• Mode opératoire .....	50
• Résultats et discussion.....	50

## CHAPITRE VI: EXTRACTION DES ACIDES AMINES

VI-1: Etude de l'électromigration de la lysine, de la glycine et de l'acide glutamique.....	57
VI-1-1: effet de pH.....	57
• Mode opératoire .....	57
• Résultats et discussion.....	57
VI-1-2: Effet de la tension électrique sur l'extraction de l'acide glutamique.....	57
• Mode opératoire .....	68
• Résultats et discussion.....	68
VI-2 : Séparation en groupes de familles.....	71
• Mode opératoire .....	71
• Résultats et discussion.....	72
VI-3: Fractionnement.....	81
VI-3-1: Fractionnement des acides aminés basiques .....	81
• Mode opératoire .....	81
• Résultats et discussion.....	82
VI-3-2: Fractionnement des acides aminés amphotères.....	86
• Mode opératoire .....	86
• Résultats et discussion.....	87

## CONCLUSION

## Résumé:

*Généralement, la récupération et la séparation des acides aminés s'effectue par précipitation ou par chromatographie d'échange d'ions. Pour le même objectif, en utilisant le caractère ionique des acides aminés, nous avons procédé avec la technique d'électrodialyse. Dans un premier temps, nous avons éliminé le sel contenu dans l'hydrolysât de cruor. Des essais de séparation par famille et de fractionnement des acides aminés basiques et amphotères sont ensuite réalisés à différentes valeurs du pH sur l'électrodialyseur à quatre compartiments.*

## Abstract:

*The recovery and the separation of aminoacids are in generally realised by precipitation and ion exchange chromatography. The aim of this work is to test electrodialysis using the electrolytic of these elements. In the first experiment the sodium chloride are removed from the solution of the mixtures of aminoacids. In the second time, we have shown that we can obtain several fraction of aminoacids by means of succession of electrodialysis operation.*

## ملخص :

بصفة عامة عملية إسترجاع الأحماض الأمينية تحدث بالترنييب أو بكرومانوغرافيا  
تبديل الشوارد ، لنفس الهدف و بإستعمال الخاصية الشاردية للأحماض الأمينية إستعملنا تقنية  
الإلكترودياليز في هذه الدراسة ، في البداية قمنا بنزع الملح الموجود في مميّه الدّم بعد ذلك تحقّقنا على  
الإلكترودياليز من أربع أقسام عملية تفرقة بالعائلة وكذا داخل نفس العائلة.

## **INTRODUCTION**

## Introduction:

L'augmentation rapide des coûts de certaines matières premières, dues à la diminution des réserves naturelles mondiales fortement exploitées, incite les industriels à développer de nouvelles techniques peu coûteuses et peu polluantes qui permettraient de récupérer des produits valorisables initialement rejetés dans la nature.

Du fait de la simplicité de construction des installations à capacité énergétique et métallique faibles, l'application des procédés membranaires comme l'électrodialyse pour répondre à ces besoins devient de plus en plus importante.

La technique d'électrodialyse développée primitivement pour le dessalement des eaux saumâtres et la récupération du sel de mer a été étendue ultérieurement au secteur de la biotechnologie: déminéralisation de fluides contenant des biomolécules et extraction de molécules chargées. Dans ce dernier cas le procédé d'électrodialyse ouvre de très intéressantes perspectives de couplage avec la fermentation pour réaliser l'extraction de molécules organiques ionisées telles que les acides aminés ou les sels d'acides organiques. Toutefois, cette opération nécessite l'emploi de membranes de plus en plus variées et performantes, en effet, les molécules biologiques ont un encombrement stérique plus important et sont chimiquement plus complexes que les simples ions minéraux.

La production des acides aminés, matériaux de base de la quasi totalité des protéines et des enzymes chez les organismes vivants, répond essentiellement à des besoins alimentaires, thérapeutiques, et surtout à la nutrition équilibrée visant à l'élevage rationnel des animaux. Le développement du marché des acides aminés permet de mesurer l'enjeu économique que représente toute augmentation de leur productivité. En 1984, la capacité mondiale de production de l'arginine était 500 tonnes à un prix moyen 26 \$ / Kg. A la même époque, la proline produite à raison de 100t /an se vendait à 97\$/Kg.

La récupération des acides aminés s'effectue généralement par précipitation ou par chromatographie d'échange d'ions. L'objectif de notre travail est d'étudier la

possibilité de récupération des acides aminés contenus dans le cruor, en mettant au point l'électrodialyse comme procédé de séparation et d'extraction. Le choix du sang comme matière première a été retenu pour deux raisons:

- Du fait de sa richesse en protéines (15%) et de sa disponibilité.
- De son pouvoir polluant.

En Algérie, les quantités de sang rejetées chaque année ne sont pas connues faute d'une étude sérieuse. Mais au vu du nombre d'animaux abattus chaque jour, ces quantités doivent être intéressantes. De plus ces rejets ne sont pas valorisés, le gaspillage de protéine de bonne valeur biologique est donc important dans notre pays.

Nous avons consacré le premier chapitre de cette thèse au rappel théorique sur les acides aminés. La connaissance des propriétés Physico-chimiques de ces produits est nécessaire pour notre étude.

Au cours du deuxième chapitre, nous avons présenté plusieurs notions élémentaires sur l'électrodialyse, les membranes échangeuses d'ions et le transfert de masse.

La première étape de la partie expérimentale consiste à hydrolyser les protéines du cruor pour libérer les acides aminés engagés dans les liaisons peptidiques. Une étude préliminaire sur le transport d'eau à travers les membranes d'électrodialyse nous a permis de déduire que la déminéralisation des hydrolysats est nécessaire avant d'entamer l'extraction des acides aminés. Pour cela l'élimination des sels minéraux était l'objet de la deuxième étape de cette partie.

Dans une troisième étape, une étude du comportement des acides aminés (Glutamique, Glycine, Lysine) pour chacune des trois familles nous a permis d'envisager la séparation du mélange en groupe de familles d'acides aminés.

Des essais de fractionnement des acides aminés basiques et amphotères sont ensuite effectués à différentes valeurs du pH.

# **CHAPITRE I:**

## **ACIDES AMINES**

## **I-1. Généralités:**

Tous les organismes vivants contiennent une quantité importante de protéines, qu'il s'agisse des bactéries, des plantes ou des animaux.

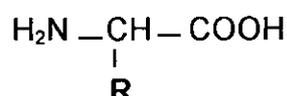
Les protéines sont des biopolymères fabriqués à partir d'unités élémentaires de construction appelées « acides aminés » [1] [2].

L'édifice moléculaire des protéines naturelles peut renfermer jusqu'à 20 acides aminés différents, mais ils ne se retrouvent pas obligatoirement tous à la fois dans les diverses Protéines [3].

La diversité des protéines provient du nombre d'acides aminés accolés l'un après l'autre et de l'ordre de leur enchaînement.

## **I-2- Structure Générale:**

Exceptions faites pour la proline et l'hydroxyproline, tous les acides aminés ont la structure générale suivante:



Ces acides aminés ont donc en commun une fonction amine primaire et une fonction carboxyle, portées l'une et l'autre par le carbone central ( carbone  $\alpha$ ).

Selon l'acide aminé, le radical R peut être de nature aliphatique, cyclique ou hétérocyclique.

Plusieurs classifications des acides aminés ont été proposées selon la structure de radical R et la nature de groupement fonctionnel supplémentaire autre que la fonction acide et la fonction amine commune à tous les acides aminés.

Le tableau I résume la classification, les structures, les pHi et les abréviations en 3 lettres des acides aminés.

Tableau N°1 : Classification et Structure des Acides Aminés .

N o m	Abrev.	Structures chimiques	Pt. I.	Solubilité dans l'eau	Observation
<b>ACIDES AMINES ALIPHATIQUES</b>					
Glycine	GLY	$\begin{array}{c} \text{H} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	5,9	22.5g/l	Acide Aminé non chargé
Alanine	ALA	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	6,1	Soluble	Acide Aminé non chargé
Valine	VAL	$\begin{array}{c} (\text{CH}_3)_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	6,0	6.8g/l	Acide Aminé non chargé
Leucine	LEU	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	6,0	2.4g/l	Acide Aminé non chargé
Isoleucine	ILEU	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	6,0	2.1g/l	Acide aminé non chargé

Tableau N°1 (Suite) : Classification et Structure des Acides Aminés .

N o m	Abrev.	Structures chimiques	Pt. I.	Solubilité dans l'eau	Observation
<b>ACIDES AMINES HYDROXYLES</b>					
Sérine	SER	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	5,7		Acide Aminé non chargé
Thréonine	THR	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	5,6	1.6g/l	Acide Aminé non chargé
<b>ACIDES AMINES SOUFRES</b>					
Méthionine	METH	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	5,7	3 g/l	
Cystéine	CYS-SH	$\begin{array}{c} \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	5		Acide Aminé non chargé
Cystine	CYS	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$			

Tableau N°1 (Suite) : Classification et Structure des Acides Aminés .

N o m	Abrev.	Structures chimiques	P.I	Observation
<b>ACIDES AMINES DICARBOXYLIQUES ET LEURS AMIDES</b>				
Acide Aspartique	ASP	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	3	Acide Aminé chargé négativement à pH=6
Acide Glutamique	GLU	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	3,1	Acide Aminé chargé négativement à pH=6
Asparagine	ASP-NH <sub>2</sub>	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$		Acide Aminé non chargé
Glutamine	GLU-NH <sub>2</sub>	$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	5,6	Acide Aminé non chargé

Tableau N°1 (Suite) : Classification et Structure des Acides Aminés .

N o m	Abrev.	Structures chimiques	Pt. I.	Solubilité dans l'eau	Observation
<b>ACIDES AMINES POSSEDANT PLUSIEURS GROUPEMENTS BASIQUES</b>					
Lysine	LYS	$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COOH} \\    \qquad \qquad \qquad   \\  \text{OH} \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2  \end{array}  $	9,5	Très Soluble	Acide Aminé chargé positivement à pH=6
Arginine	ARG	$  \begin{array}{c}  \text{HN} \\  \diagup \\  \text{C} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\  \diagdown \\  \text{H}_2\text{N} \qquad \qquad \qquad   \\  \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2  \end{array}  $	10,7	Très Soluble	Acide Aminé chargé positivement à pH=6
<b>ACIDES AMINES AROMATOTIQUES</b>					
Phénylalanine	PHE	$  \begin{array}{c}  \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	5,9	2,7g/l	Acide Aminé non chargé
Tyrosine	TYR	$  \begin{array}{c}  \text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH}_2  \end{array}  $	5,6		Acide Aminé non chargé

Tableau N°1 (Suite) : Classification et Structure des Acides Aminés .

N o m	Abrev.	Structures chimiques	Pt. I.	Solubilité dans l'eau	Observation
<b>ACIDES AMINES HETEROCYCLIQUES</b>					
Tryptophane	TRY		5,9	Soluble	Acide Aminé non chargé
Histidine	HIS		7,5	Très Soluble	Acide Aminé chargé positivement à pH=6
Proline	PRO		6		Acide Amine non chargé
Hydroxyproline	HYDRO				

### I-3. Propriétés physico-chimiques des acides aminés:

Un acide aminé peut se distinguer d'un autre, par son pouvoir rotatoire, sa solubilité dans les solvants, ses propriétés acido-basiques, ses réactions chimiques spécifiques ou par son spectre d'absorption UV s'il possède une fonction aromatique.

#### a/ Absorption des acides aminés:

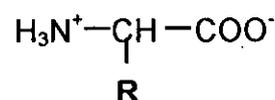
Les acides aminés absorbent fortement au-dessous de 230 nm mais ils présentent des chromophores faibles dans la région UV et visible à l'exception des acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine, l'histidine et la phénylalanine qui absorbent entre 260 et 280 nm.

#### b/ Propriétés chimiques des acides aminés:

Outre les réactions classiques des groupements carboxyliques et aminés, il existe des réactions chimiques propres aux acides aminés, qui dépendent notamment de la réactivité des fonctions portées par le radical R. Les réactions les plus importantes sont celles utilisées pour l'identification des acides aminés.

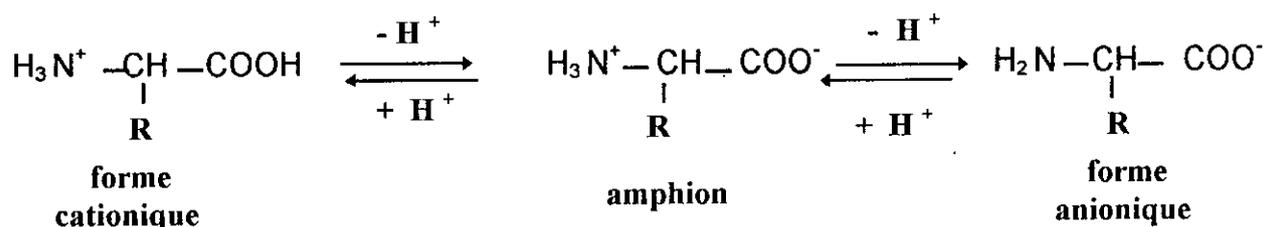
#### c/ Propriétés acido-basiques des acides aminés:

D'un point de vue général, le groupement carboxylique commun à tous les acides aminés leur permet de céder un proton en milieu alcalin, par contre le groupement aminé leur permet de gagner un proton en milieu acide.



Cette forme de l'acide aminé est électriquement neutre, on l'appelle "Amphion" ou "Zwitterion".

En solution aqueuse, si l'on fait un balayage du pH en allant du plus acide au plus basique l'acide  $\alpha$ -aminé est le siège de deux équilibres acido-basiques:



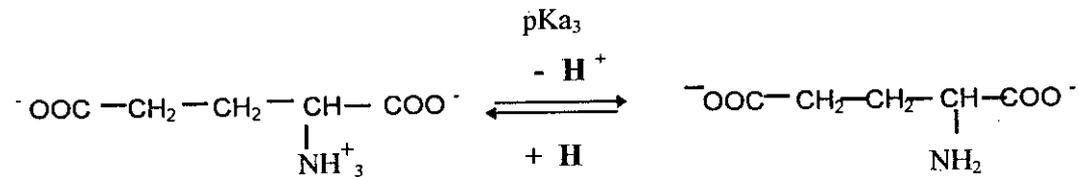
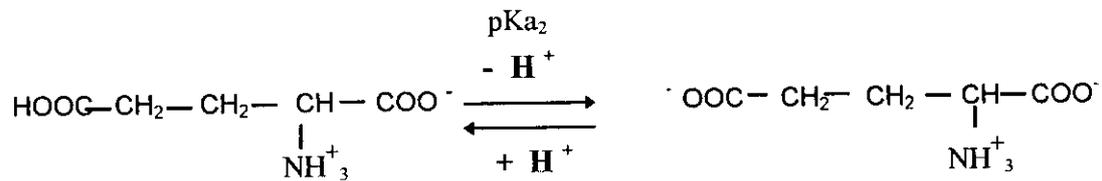
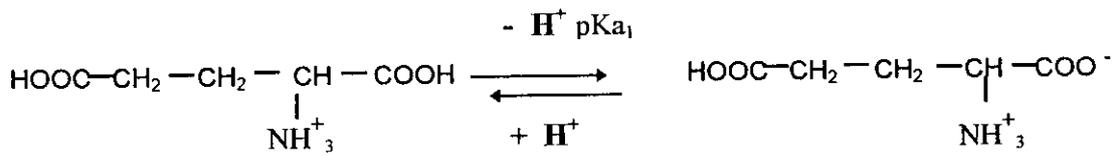
Ces deux réactions sont régies respectivement par les constantes d'équilibre  $K_{a1}$  et  $K_{a2}$ . On définit le point isoélectrique (PI) comme étant le pH pour lequel l'acide aminé est entièrement sous forme amphotère:

$$PI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

D'une manière générale, on distingue trois familles des acides aminés:

1) Acides aminés acides:

Le radical R contient un groupe carboxylique supplémentaire. Ce groupe est soumis lui aussi à une déprotonation.

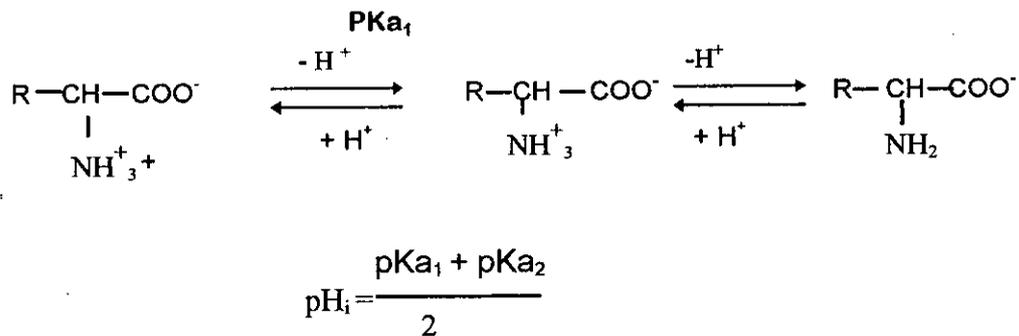


Entre  $pK_1$  et  $pK_2$  l'acide glutamique se trouve sous forme amphotère

$$PH_i = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

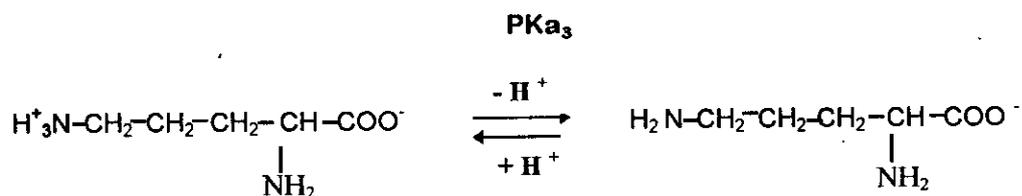
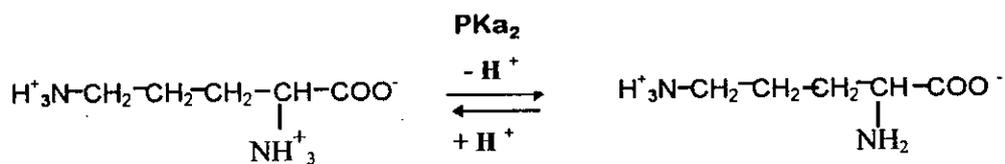
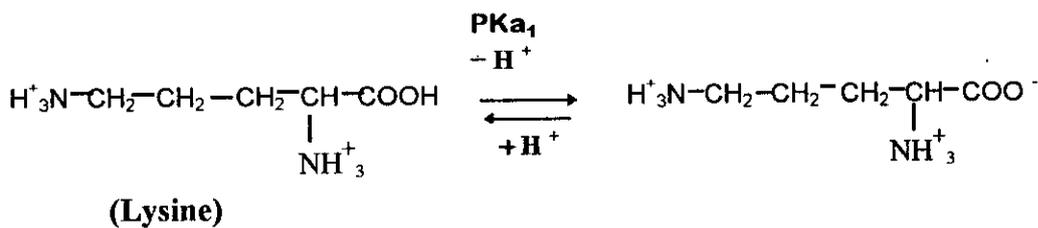
2). Acides aminés simples (ou amphotères):

Le radical R ne contient ni groupement carboxylique ni fonction amine supplémentaire.



3). Acides aminés basiques:

Le radical R possède une fonction aminé supplémentaire.



Entre pKa<sub>2</sub> et pKa<sub>3</sub> la lysine se trouve électriquement neutre

$$\text{pH}_i = \frac{\text{pKa}_2 + \text{pKa}_3}{2}$$

#### **I-4. Domaines d'utilisation des acides aminés:**

La production des acides aminés, matériaux de base de la quasi totalité des protéines et des enzymes chez les organismes vivants, répond essentiellement à des besoins alimentaires, thérapeutiques et surtout à la nutrition équilibrée visant l'élevage rationnel des animaux.

A partir de molécules de sucres, d'amidon et de matières grasses de l'alimentation, l'organisme humain et celui des animaux peut faire la synthèse de quelques acides aminés. La dizaine d'acides aminés que l'organisme humain ou animal ne peut pas synthétiser sont les acides aminés dits essentiels. L'apport de ces derniers dans les aliments est donc nécessaire pour assurer une nutrition équilibrée de l'organisme.

En industrie alimentaire, les acides aminés sont d'importants constituants de nombreuses denrées alimentaires et de boissons. L'alanine donne aux aliments une saveur fraîche et sucrée de crustacés ou de fruits de mer. La lysine, l'arginine et l'histidine influencent le goût de la bière. L-cystéine améliore la qualité du pain pendant la cuisson et agit comme un antioxydant dans les jus de fruit. L-tryptophane combiné avec L-histidine est utilisé pour protéger de la rance le lait en poudre.

Beaucoup d'acides aminés sont utilisés en médecine, particulièrement comme ingrédients dans les infusions en traitement post-opératoires. Le tryptophane peut servir d'inducteur de sommeil et d'antidépresseur. L'arginine est souvent prescrite lors des traitements des désordres hépatiques et de la stérilité masculine.

L'alimentation équilibrée des animaux est le marché le plus important des acides aminés. La méthionine, la L-lysine et le L-tryptophane sont les principaux acides aminés ajoutés aux aliments de bétail lorsque les céréales forment la base de l'alimentation. Des quantités importantes en lysine et méthionine sont importées par notre pays de l'étranger. L'emploi de L-tryptophane reste limité par son coût relativement élevé

## **I-5. Méthodes de production des acides aminés :**

La production des acides aminés s'effectue par des méthodes microbiologiques, enzymatiques [11-13], chimiques ou par extraction à partir d'hydrolysats de protéines d'origine animale ou végétale[6,7].

### **a/ Méthodes de fermentation:**

La connaissance des circuits métaboliques, des effets de recontrôle, l'utilisation de souches sauvages, de souches sélectionnées et de mutants sont autant d'atouts qui peuvent être joués pour une préparation industrielle efficace d'acides aminés[6-9].

La production de l'acide L-aspartique peut être réalisée à partir d'une matière première chimique, le fumarate d'ammonium. La préparation de l'acide L-glutamique par fermentation est réalisée à partir de glucose avec des souches sauvages de *Corynebacterium glutamicum* ou de *Brevibacterium flavium*. La technique industrielle utilise des mélasses de betterave ou de canne à sucre.

Ces méthodes bénéficieront des progrès de la génétique des micro-organismes et de ceux du génie génétique [10].

### **B/ Méthodes enzymatiques:**

La production des acides aminés peut être réalisée par la mise en oeuvre de certaines enzymes microbiennes immobilisées ou non sur le support. Ces méthodes enzymatique se prêtent à une production en continue, c'est ainsi qu'au Japon, l'acide L-aspartique est produit en faisant passer la solution réactionnelle à travers des colonnes garnies de cellules microbiennes immobilisées[6]. La synthèse enzymatique du tryptophane à partir d'indole et de pyruvate est effectuée avec une tryptophanase.

Les pertes progressives d'activité des enzymes immobilisées est le principal défaut de telles méthodes.

### **C/ Méthodes chimiques:**

La production de la glycine, DL alanine et DL méthionine est réalisée généralement par synthèse chimique. Les méthodes de synthèse peuvent apparaître dans certains cas plus économiques pour la production des acides aminés. En effet, les technologies et les appareillages sont adaptés à la production de masse au moindre coût. Néanmoins, les méthodes chimiques restent tributaires de la disponibilité de matières premières ou d'intermédiaires à des prix compétitifs.

### **D/ Extraction à partir d'hydrolysats de protéines :**

Cette méthode consiste en extraction des acides aminés libérés par hydrolyse chimique ou enzymatique des protéines[11-14]. L'importance de cette méthode dépend d'une part de la disponibilité de matières premières à faible coût, et d'autre part de la simplicité des méthodes d'extractions et de purification.

#### **Hydrolyse acide:**

L'agent le plus couramment utilisé est l'acide chlorhydrique. En vue d'une hydrolyse totale des protéines, on utilise habituellement les conditions opératoires suivantes : acide chlorhydrique 5.5 à 6 N en quantité correspondant à environ 10 fois le poids de la protéine, à température 100-110°C pendant 24 heures, en tubes scellés ou à reflux [15]

L'acide chlorhydrique à l'avantage sur l'acide sulfurique de ne provoquer que de faibles destructions de certains acides aminés, comme la cystine, la cysteine, la serine, la thréonine, et la Tyrosine

#### **Hydrolyse alcaline:**

La soude 2 à 4N à 100°C pendant 6 heures ne détruit pas le tryptophane, mais la plupart des amino-acides sont racémisés certains acides aminés sont dégradés: arginine, thréonine , cysteine.

### **Hydrolyse enzymatique:**

L'hydrolyse enzymatique est rarement totale à moins d'une longue incubation. de plus les enzymes sont des réactifs plus ou moins spécifiques d'un certains types de liaisons peptidiques [3].

Parmi les enzymes protéolytiques actuellement connus, Six ont été utilisés surtout de façon intensive, ce sont dans l'ordre de leur importance: trypsine, chymotrypsine, pepsine, carboxypeptidase, papaine et subtilysine

### **I-6. Séparation et récupération des acides aminés:**

La récupération des acides aminés à partir des hydrolysats de protéines s'effectue généralement par précipitation, particulièrement l'acide glutamique qui précipite à  $\text{pH}=3.2$  [19 ] ou par chromatographie d'échange d'ions [12-14]. Cette dernière est utilisée pour la séparation industrielle des acides aminés [20].

Les propriétés ioniques des acides aminés ont guidé ces dernières années les chercheurs à développer les techniques à membranes [17-22] pour l'extraction et la séparation des acides aminés.

En 1984, **S.Tone** et **H.Nakamura** [18] ont présenté les résultats d'une étude effectuée sur la séparation des acides aminés à partir de la solution aqueuse de l'acetyl DL-methionine, en utilisant une membrane formée de : Enzyme - PVC attaché à une membrane échangeuse d'anions. Ils ont observé que pour un  $\text{pH}$  de la solution voisin de point isoélectrique de l'acide aminé, le flux de ce dernier passe par un maximum.

**S. Kimura** et **A.Tamano** [19] ont conclu que la séparation entre les acides aminés à  $\text{pH}_i$  différents, est possible sur une membrane d'ultrafiltration chargée.

En 1988, **Rumeau** et **M. Monfort** [20] ont utilisé l'électrodialyse pour l'extraction de la glycine a partir d'une solution. Ils ont pu vérifier le passage des acides aminés à travers les membranes échangeuses d'ions pour des  $\text{pH}$  différents de leurs points isoélectriques.

Deux ans plus tard, **D. Martinez** [21] a montré que les flux de diffusion d'un acides aminés amphotère (l'alanine ) à travers les membranes échangeuses d'ions, sont négligeables devant ceux de l'électro-migration. L'auteur a étudié aussi l'extraction de l'arginine (acide aminés basique) à partir d'un mélange d'acides aminés provenant d'un hydrolysat de protéine issues de plume de poulet. Il a conclu que l'électrodialyse est une technique bien adaptée à l'extraction et à la séparation des acides aminés. Néanmoins, les produits obtenus ne sont pas purs phamaceutiquement. cette méthode doit être donc complétée par d'autres procédés classiques.

En 1990, **C.Gavach** [22] a conclu a partir d'une étude effectuée sur un mélange d'acides aminés issu de l'hydrolyse acide de protéines, que l'électrodialyse est une technique bien adaptée au fractionnement des acides aminés.

## **CHAPITRE II**

### **GENERALITES SUR L'ELECTRODIALYSE ET LES MEMBRANES ECHANGEUSES D'IONS**

## II-1- Définitions de l'électrodialyse :

Le terme dialyse désigne la diffusion d'un soluté à travers une membrane qui lui est perméable tout en étant imperméable au solvant. L'électrodialyse désigne donc le transfert d'ions à travers une membrane qui leur est perméable, sous l'effet d'un champ électrique [24].

## II-2. Principe:

La figure 1 représente le principe général d'un électrodialyseur. Le système est constitué d'un empilement de membranes alternativement échangeuses de cations et échangeuses d'anions et de deux électrodes situées aux extrémités de cet empilement.

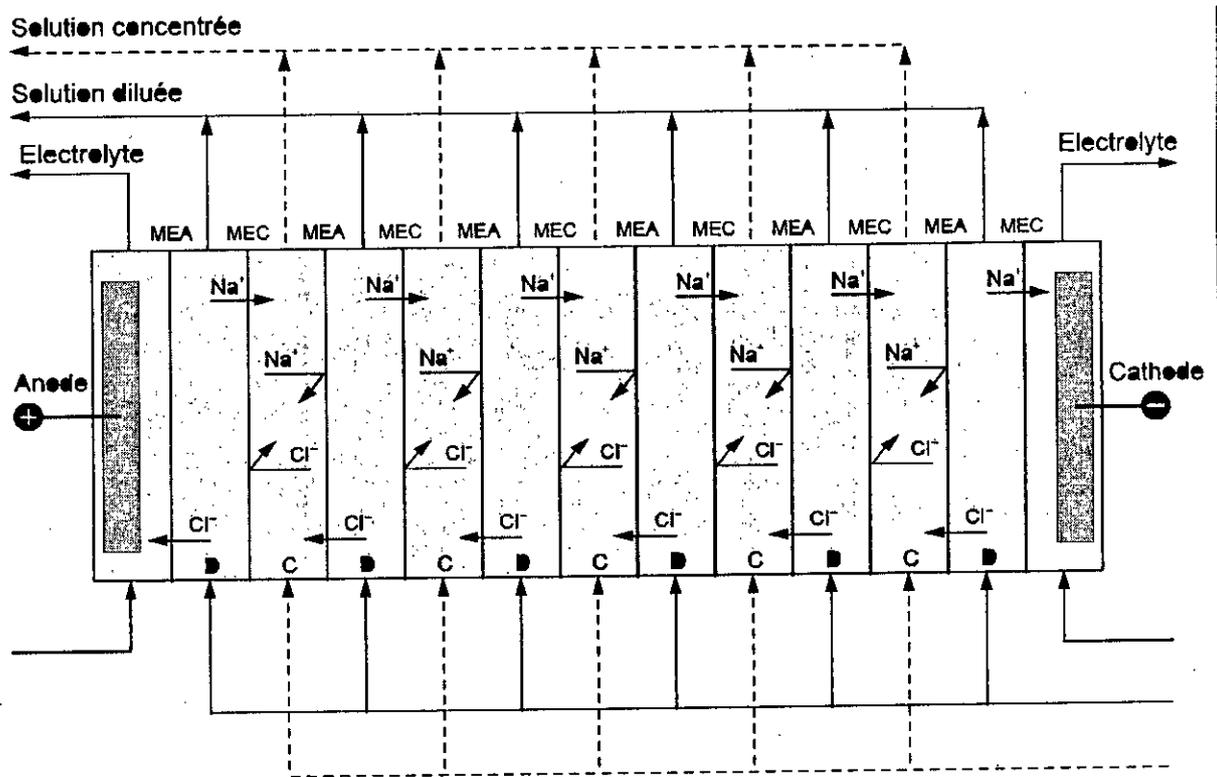


Figure 1: Principe de fonctionnement d'un électrodialyseur

Lorsqu'une solution ionisée est envoyée dans les compartiments C et D séparant ces membranes, les cations qui migrent vers la cathode sous l'effet d'un champ électrique en traversant la membrane échangeuse de cation, restent bloqués par la membrane anionique dans le compartiment adjacent (C), et les anions qui migrent vers l'anode en traversant la membrane échangeuse d'anions sont arrêtés dans ce même compartiment par la membrane cationique. Il en résulte une concentration de la solution circulant dans le compartiment C qu'on appelle compartiment concentrat et une dilution de la solution circulant dans le compartiment D qu'on appelle compartiment diluat. L'électrodialyse permet donc d'épurer en électrolyte les solutions du compartiment (D) et de concentrer celles du compartiment (C).

### **II- 3. Domaines d'application de l'électrodialyse:**

Mise en oeuvre initialement avec des membranes dont la sélectivité était uniquement liée à la taille des espèces dissoutes ou dispersées; l'électrodialyse était un vieux procédé de laboratoire utilisé pour débarrasser de leurs sels certaines solutions colloïdales [24]. La découverte des résines, puis des membranes ioniques et enfin l'élaboration des membranes homogènes, conductrices, peu perméables au solvant et fortement sélectives a permis d'en élargir le domaine d'application [25].

Actuellement la principale application de l'électrodialyse est le dessalement de l'eau saumâtre pour produire de l'eau potable et du sel. Les industries chimiques et métallurgiques sont aussi intéressées par cette technique pour revaloriser les produits rejetés.

La déminéralisation du petit-lait constitue une application importante de l'électrodialyse dans l'industrie alimentaire. En effet, environ 10% en poids sec de ce lait sont constitués de sel (essentiellement du chlorure de potassium). L'intérêt de pratiquer une électrodialyse du lait est d'augmenter la stabilité des protéines qu'il contient, ainsi que sa durée de conservation.

Certains jus de fruits ont un degré d'acidité élevé, les industries ajoutent habituellement des substances édulcorantes ou réalisent une neutralisation

alcaline, ce qui entraîne des modifications gustatives ou la formation de précipités. L'électrodialyse permet la désacidification de différents jus de fruits tels que le raisin,, l'orange, l'ananas, la pomme, le citron, etc... sans pour autant leur soustraire le label « produit naturel ».

## **II-4. Membranes Echangeuses d'Ions:**

### **II-4.1. Définition:**

La membrane est un matériau au travers duquel a lieu le transport sélectif [26], elle ne laisserait passer que des particules ou des molécules d'un certain type à l'exclusion de toutes les autres. Une membrane échangeuse d'ions est constituée d'un réseau tridimensionnel de chaînes macromoléculaires sur lesquelles sont greffés les groupements fonctionnels ionisables (figure 2 ).

Les ions qui assurent l'électroneutralité du système (les ions échangés) sont appelés les contres-ions. Les ions mobiles de même signe que les sites de la membrane sont appelés les co-ions. Le principe de fonctionnement d'une membrane échangeuse d'ions est représenté par la figure 3

### **II-4.2.Types de membranes échangeuses d'ions:**

Suivant le mode de fonctionnement des membranes échangeuses d'ions on distingue les membranes monofonctionnelles et les membranes bifonctionnelles.

#### **II-4.2.1.Membranes monofonctionnelles**

Ce sont des membranes qui contiennent des groupements fonctionnels de même signe, suivant la charge de ces groupements on distingue:

##### **a/ Les membranes échangeuses d'anions:**

La charge portée par les groupements ionisables est positive et les ions équilibrant ces charges sont des anions, elles sont perméables uniquement aux anions.

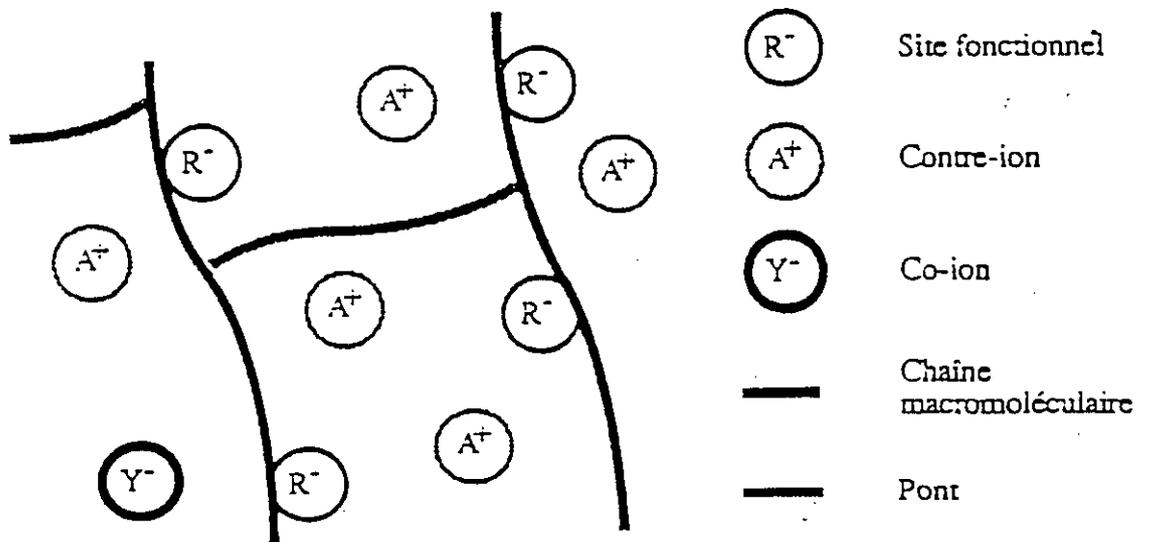


Figure2: Schéma représentatif d'une membrane échangeuse de cations.

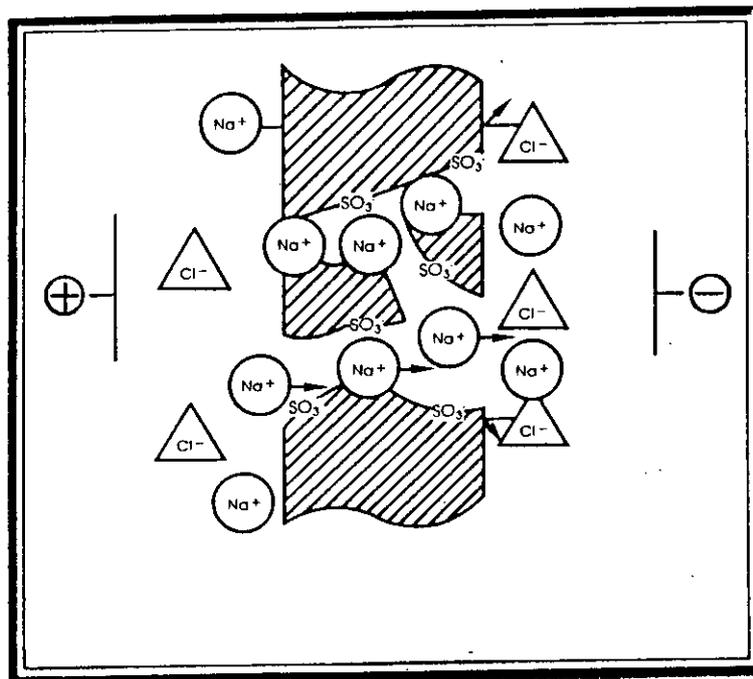


Figure3: Principe de fonctionnement d'une membrane échangeuse de cations.

### **b/ Les membranes échangeuses de cations:**

Les charges portées par les groupements ionisables sont négatives et les ions équilibrant ces charges sont des cations, elles sont perméables uniquement aux cations.

Les groupements fonctionnels les plus couramment utilisés sont [26]:

Membranes cationiques:

Sulfonique $\text{SO}_3^-$	carboxylique $\text{COO}^-$
phosphorique $\text{PO}_3^{2-}$	arsénique $\text{ASO}_3^{2-}$

Membranes anioniques:

Alkyl-ammonium $-\text{NR}_3^+$ , $\text{NH}_2\text{R}^+$ , $\text{NH}_2\text{R}^+$	
phosphonium $\text{P R}_3^+$	sulfonium $\text{S R}_2^+$

### **II-4.2.2. Membranes bifonctionnelles:**

Ce sont des membranes qui portent à la fois des groupements ionisables négatifs et positifs, on distingue les types suivants:

#### **a/ Les membranes mosaïques:**

Ce sont des matériaux hétérogènes dont les zones échangeuses de cation et d'anions sont disposées côte à côte perpendiculairement au plan de la membrane.

#### **b/ Les membranes amphotères:**

Les groupements ionisables négatifs et positifs sont entremêlés de telle manière que la distance moyenne entre deux sites de signe contraire n'excède pas quelques dizaines d'angström.

#### **c/ Les membranes bipolaires:**

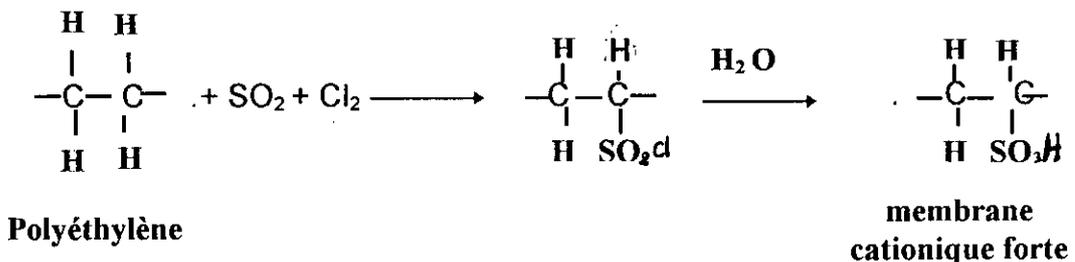
Ce sont des membranes formées par collage d'une membrane échangeuse d'anion sur une membrane échangeuse de cation. Ces membranes permettent la production des acides et des bases à partir de leurs sels, par dissociation de l'eau en  $\text{H}^+$  et  $\text{OH}^-$  au niveau de la surface de collage.

### II-4.2.3 Types de membranes Selon le mode de Fabrication :

Selon le mode de fabrication des membranes échangeuses d'ions on distingue les membranes homogènes et les membranes hétérogènes.

#### a/ Membranes homogènes:

Les groupements ionisables sont introduits par greffage sur le support inerte (chlorure de polyvinyle, polyéthylène, Téflon) formant la membrane, ce greffage peut être soit chimique, soit radiochimique:



#### b/ Membranes hétérogènes:

Ce sont le résultat d'un mélange de résine échangeuse d'ions avec un liant (chlorure de polyvinyle(PVC), polyéthylène, polystyrène, etc...), enduit sur une trame (tissu de polyester, polycrylonitrile, etc...).

### II-4.3. Caractéristiques essentielles des Membranes échangeuses d'ions:

Les performances d'une membrane échangeuse d'ions dépendent de ses caractéristiques structurales:

- Une grande capacité d'échange.
- Forte permselectivité.
- Une conductivité électrique élevée.
- Une bonne résistance mécanique et une stabilité dimensionnelle.
- Une bonne stabilité chimique et thermique.

#### a/ Capacité d'échange:

Elle exprime la quantité des groupements ionisables contenus dans une unité de masse de la membrane, elle est donnée en mil équivalents par gramme de membrane sèche.

### **b/ La sélectivité:**

La sélectivité est l'une des propriétés fondamentales d'une membrane échangeuse d'ions[27], elle est caractérisée par la valeur du nombre de transport « t » du contre-ion dans la membrane et la permselectivité p.

En effet, la membrane doit être perméable aux contre-ions et imperméable le plus possible aux co-ions. La permselectivité p s'exprime par le rapport:

$$p = (\bar{t} - t) / (1 - t)$$

où  $\bar{t}$  et t sont respectivement les nombres de transport du contre-ion dans la membrane et dans la solution de référence.

Une membrane parfaitement permselective présenterait un nombre de transport égal à 1 pour les contre-ions et à 0 pour les co-ions.

### **c/ Taux de réticulation:**

Les chaînes macromoléculaires comportent les groupements ionisables, sont liées entre elles par des ponts formés par des agents réticulant (divinyl benzène). Ces ponts confèrent une stabilité mécanique pour la membrane mais par contre, ils augmentent sa résistance électrique. Le taux de réticulation exprime la proportion d'agent réticulant introduit dans la membrane.

### **d/ Résistance mécanique:**

Les membranes échangeuses d'ions doivent résister aux différentes contraintes subies au cours des manipulations, dues d'une part à des différences de pression et d'autre part au montage et démontage du module d'électrodialyse.

### **e/ Résistance électrique:**

La membrane échangeuse d'ions doit avoir une bonne perméabilité des contre-ions, donc une bonne conductivité électrique. Cependant, cette conductivité dépend de plusieurs facteurs et plus particulièrement de la structure de la membrane (taux de réticulation et taux de greffage), de la taille des contre-ions et de leur valence, de la température et de la concentration de l'électrolyte dans lequel elle est immergée [27].

### **f) Gonflement:**

Le volume d'une membrane échangeuse d'ions immergée dans l'eau est plus grand par rapport à son état sec. Cette variation est due au caractère hydrophile des groupements ionisables et des contre-ions qui sont responsables de la pénétration de la majeure partie de l'eau à l'intérieur de la membrane.

### **II-5. Phénomènes accompagnant l'électrodialyse:**

L'efficacité d'un électrodialyseur est limitée par des phénomènes secondaires accompagnant le transfert des ions à travers les membranes, il s'agit de la polarisation de concentration dit polarisation primaire, de colmatage des membranes dit polarisation secondaire et de transport de l'eau.

#### **II-5.1. Polarisation primaire:**

La différence des nombres de transport des ions dans les membranes et les solutions en électrodialyse provoque la polarisation de concentration au niveau des interfaces membranes-solutions (figure 4).

Prenons le cas d'une membrane cationique, lorsqu'une tension est appliquée entre les électrodes, les cations migrent à travers les solutions où ils ne transportent qu'une partie du courant. Par contre à travers la membrane cationique, ils transportent la quasi-totalité du courant, la disposition en série de ces zones implique qu'elles soient traversées par la même densité du courant. Le flux de migration des cations à travers la membrane est ainsi à peu près le double de ce qu'il est dans la solution adjacente, et un flux complémentaire doit donc être apporté (diluat) ou emporté (concentrat) pour satisfaire au bilan de matière.

Préalablement nous présenterons des généralités sur le transfert de masse qui nous permettraient de mieux aborder le transfert de matière dans l'électrodialyseur.

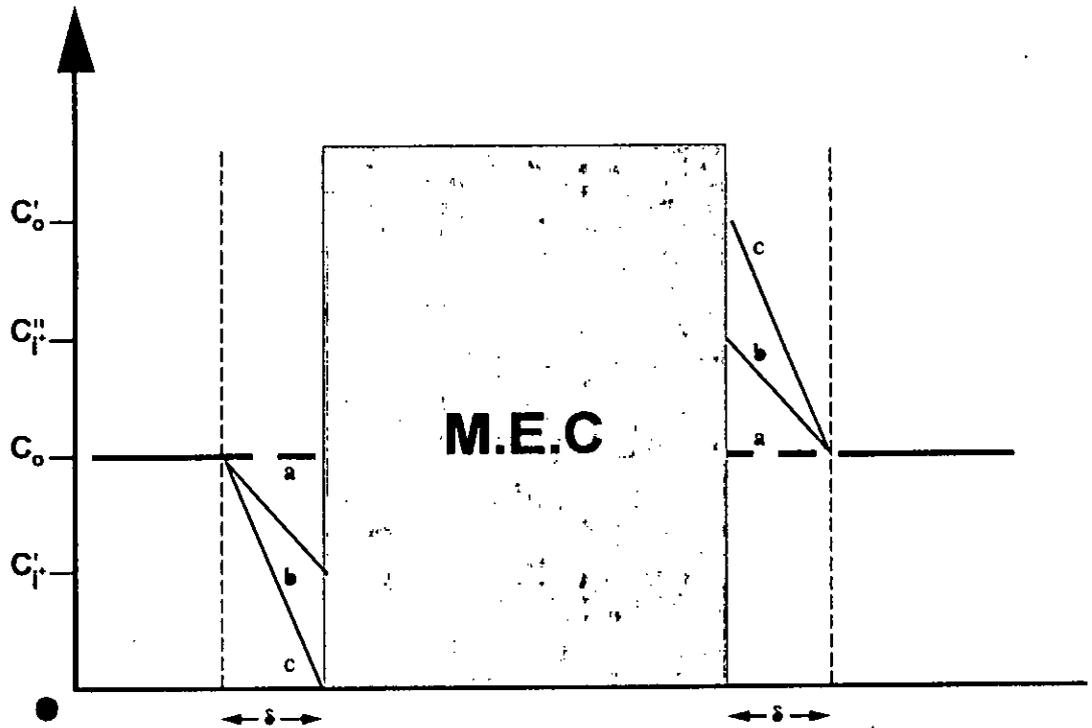


Figure 4 : Profils de concentration des cations dans la couche de diffusion durant l'électrodialyse

### 5.1.1. Généralités sur le transfert de masse

#### a/ Equations Générales du Transfert de Masse:

Lorsqu'une particule  $i$  se déplace dans un fluide visqueux sous l'effet d'une force motrice de transport, elle est soumise de la part de ce fluide à une résistance  $F$  opposée au mouvement, proportionnelle à sa vitesse  $V_i$  par l'intermédiaire d'un coefficient de friction  $f$  (loi de STOKES)

$$F = - f V_i \quad (1)$$

Sous l'effet de la force motrice, la vitesse de la molécule augmente rapidement, par conséquent, la résistance  $F$  équilibre la Force initiatrice de transport et la vitesse de la molécule reste alors constante.

Il existe aussi une relation linéaire entre la force motrice et la vitesse, la constante de proportionnalité est la mobilité  $U_i$  [26].

$$V_i = U_i F_i \quad (2)$$

On peut déduire ainsi le flux molaire local  $J_i$  :

$$J_i = C_i V_i = U_i C_i F_i \quad (3)$$

$C_i$  : Concentration locale

$J_i$  : exprime le nombre de moles qui traverse une unité de surface pendant une unité de temps.

Si le milieu est un fluide en mouvement animé localement d'une certaine vitesse  $V$ , il faut tenir compte du terme convectif au transport, le flux molaire locale s'exprime alors par:

$$J_i = U_i C_i F_i + V C_i \quad (4)$$

### **b/ Force Motrice de Transport:**

Le transfert de masse en solution intervient du fait de l'existence d'un gradient de potentiel électrochimique  $u_i$ , celui-ci somme des énergies (chimiques, de pression, électrique, thermique...) molaires acquises sous l'effet des interactions diverses entre l'espèce qui se déplace et son environnement.

$$\mu_i = \dot{u}_i + \int_{P_0}^P V_i dp + z_i F V - \int_{T_0}^T S_i dT + \dots \quad (5)$$

Le potentiel chimique  $\mu_i$  s'exprime par:

$$\dot{u}_i = \dot{u}_{i0} + R T \ln a_i$$

$a$  : l'activité locale de l'espèce  $i$ .

$P_0$ ,  $T_0$  et  $\mu_{i0}$  sont la pressions, la températures et le potentiel chimique de référence.

La pression  $P$  s'exprime en pascal, le volume molaire  $V_i$  en  $\text{m}^3 \text{mole}^{-1}$ , la valence  $z_i$  en mole de charges (ou équivalent) par mole d'ions, le Faraday  $F$  en Coulomb par mole de charge ou équivalent, le potentiel électrique  $V$  en Volt, la température  $T$  en Kelvin (K) et l'entropie molaire partielle  $S_i$  en  $\text{Joule mole}^{-1} \text{K}^{-1}$

Pour un déplacement unidirectionnel la Force motrice s'exerçant sur une mole de l'espèce  $i$  aura pour expression algébrique:

$$F_i = d\mu_i / dx$$

$$J_i = U_i C_i F_i = U_i C_i d\mu_i / dx \quad (6)$$

### C/ Diffusion Lois de Fick:

Les lois de Fick sont des équations différentielles décrivant le flux d'une substance et sa concentration en fonction du temps et de la position.

Considérons un cas de diffusion isotherme ( $dT/dx = 0$ ) et isobare ( $dP/dx = 0$ ) d'un soluté moléculaire ( $z = 0$ ) dilué dans une solution idéale: en l'absence de force extérieure, la force motrice se réduit à :

$$F_i = -RT \, d \ln a_i / dx = -RT/a_i \, da_i / dx$$

$$= - (RT/ C_i) \, dc_i / dx \quad (7)$$

Le flux molaire en point d'abscisse  $x$  au temps  $t$  s'écrit

$$J(x_1, t) = - U_i RT \, \delta C_i(x_1, t) / \delta x$$

$$J_i(x_1, t) = - D_i \, \delta C_i(x_1, t) / \delta x \quad (8) \quad \text{première loi de Fick}$$

( $D_i = U_i R T$ ) est appelé coefficient de diffusion ou diffusivité et s'exprime en  $m^2 s^{-1}$

La seconde loi de Fick traduit la variation de la concentration en fonction du temps en régime transitoire

$$\frac{\delta C_i(x_1, t)}{\delta t} = \frac{J(x_1, t) - J(x+dx_1, t)}{\delta x}$$

$$\frac{\delta C_i(x_1, t)}{\delta t} = \frac{-\delta J(x_1, t) \, dx}{\delta x}$$

de la première loi de Fick on a :

$$\frac{\delta C_i(x_1, t)}{\delta t} = \frac{-\delta J(x_1, t)}{\delta x} = \frac{-\delta}{\delta x} (-D_i \delta C_i(x_1, t))$$

quand  $D_i$  n'est pas en fonction de  $x$ :

$$\frac{\delta C_i(x_1, t)}{\delta t} = \frac{D_i \delta^2 C_i(x_1, t)}{\delta x^2} \quad (9)$$

#### d/ Electromigration:

Quand on applique à un milieu ionisé (solution, membrane ionique) un champ électrique  $E = dV / dx$ , on observe en chaque point un déplacement d'ions qu'on appelle flux d'électromigration  $J_i = -U_i Z F C dV/dx$ . Ce flux d'ions équivaut à une densité du courant  $i$  :

$$i = -J_i z_i F = -(z_i^2 F^2 D_i C_i / RT) \Delta V / l$$

En tout point de milieu ionisé la densité de courant totale est la somme des contributions de chaque espèce ionique:  $i = \sum_j i_j$

#### e/ Nombre de Transport, conductance et conductivité:

La conductance  $L$  d'une solution ionique représente l'inverse de sa résistance électrique, elle s'exprime en siemens (s) (ou  $\Omega^{-1}$ )

La valeur de  $L$  pour un élément de solution géométriquement défini et soumis à un champ électrique, est proportionnelle à l'aire  $A$  de la section droite de l'élément, perpendiculaire au champ électrique et inversement

31].

$$L = K (A / l)$$

$K$  constante de proportionnalité, caractéristique de la solution, appelée conductivité.  $K$  est la somme des contributions de toutes les espèces ioniques  $i$  existantes dans la solution, elle est proportionnelle à la concentration de l'ion, à sa mobilité électrique et à la valeur absolue de sa charge  $z_i$ .

$$K = \sum z_i^2 F^2 D_i C_i / RT$$

Le nombre de transport d'un ion  $i$  est défini comme étant sa conductivité divisée par la conductivité totale de la solution, ou sa fraction de courant.

$$t_i = z_i^2 D_i C_i / \sum_i z_i^2 D_i C_i$$

### II-5.1.2.Courant limite:

Au voisinage des interfaces Membranes-Solutions, on observe initialement dans le diluat, une diminution de la concentration des cations, s'accompagne nécessairement par celle des anions (neutralité électrique). Dans le concentrat, nous observons une augmentation de la concentration de l'électrolyte.

Nous avons alors le flux des cations traversant la membrane:

$$\bar{J}_+ = \frac{i \bar{t}_+}{zF}$$

Le flux de ces mêmes ions dans la solution voisine a pour expression:

$$J_+ = \frac{i t_+}{zF}$$

Avec :

$i$ : densité de courant appliquée.

$t_+$ ,  $\bar{t}_+$  sont les nombres de transport respectivement dans la membrane et dans la solution.

L'écart entre les deux flux de migration (membrane-solution) est compensé par le flux de diffusion  $J' = D_+ dc / dx$

$$\frac{D_+ (C - C_0)}{\delta zF} = i (\bar{t}_+ - t_+)$$

$C$  : Concentration de la solution.

$C_0$ : Concentration à l'interface.

$D_+$  : Coefficient de diffusion du cation dans la solution.

$\delta$  : L'épaisseur de la couche limite.

Le gradient  $dc/dx$  constitue le phénomène de polarisation primaire en électrodialyse, ce phénomène devient important lorsque l'intensité de courant appliquée est élevée. La densité de courant limite est atteinte lorsque la valeur de la concentration à l'interface solution-membrane tend vers zéro, dans ce cas la polarisation est dite totale.

$$i_{lim} = \frac{z C D_+ F}{(t_+ - t_-)}$$

La densité du courant limite ( $i_{lim}$ ) dépend donc de la concentration de la solution et de l'épaisseur de la couche limite. Cette dernière dépend des conditions hydrodynamiques et de la géométrie des espaceurs placés entre les membranes. Ces espaceurs remplissent la double fonction de promoteurs de turbulence et de joint d'étanchéité.

La courbe intensité-potential représentée par la Figure 5 nous permet de déterminer la valeur de la densité de courant limite  $i_{lim}$ . On observe sur cette courbe trois parties distinctes:

- Une région pratiquement linéaire:

La variation de la densité de courant  $i$  en fonction de la tension appliquée  $V$  est linéaire  $V = R i$ , la pente  $R$  de cette droite représente la somme des résistances de l'électrolyte et des membranes.

- Un palier: Cette partie représente la polarisation totale de la cellule de l'électrodialyse, le flux ionique traversant la membrane atteint sa valeur maximale et la densité de courant reste constante quand la tension augmente.

- Une croissance au-delà du palier: L'augmentation de la tension provoque au niveau de l'interface solution-membrane une dissociation de l'eau en ions  $OH^-$  et  $H^+$  qui sont responsables de l'augmentation de la densité de courant.

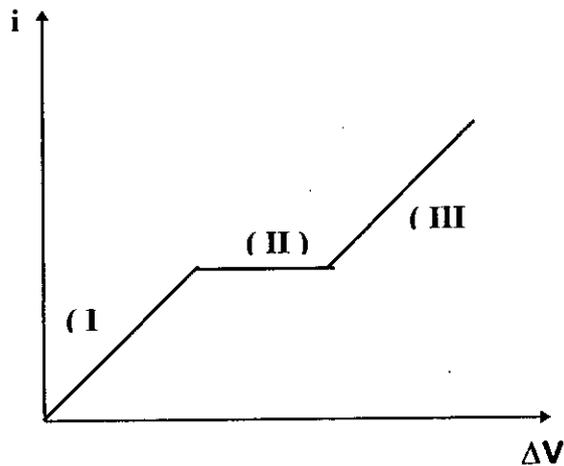


Figure 5: Courbe intensité-potentiel

Les conséquences de cette polarisation sont d'une importance capitale :

- Formation près des membranes de couches de faibles concentrations qui augmentent la résistance électrique et la consommation d'énergie.
- Transport du courant par les ions  $H^+$  et  $OH^-$  de l'eau, d'où diminution du rendement faradique.
- Variations locales de pH qui peuvent entraîner des précipitations, en particulier d'hydroxyde de magnésium lorsque ce dernier élément est présent.

Un électrodialyseur doit donc toujours fonctionner aux densités de courant inférieures à celle de la densité limitée.

### **II- 5-2.Polarisation secondaire et colmatage des membranes:**

La polarisation secondaire traduit les effets irréversibles ou difficilement réversibles de la polarisation primaire . Ces effets résident dans la formation de dépôts insolubles sur les membranes. En effet, les variations locales de pH lors de dépassement de l'intensité limite provoquent la précipitation des hydroxydes insolubles à la surface ou au sein de la membrane.

Le colmatage est un phénomène qui correspond au dépôt de matières organiques ou minérales à la surface et au sein de la membrane, en

électrodialyse plusieurs termes sont utilisés pour décrire les différentes formes de colmatage. KORNGOLD [29] en a donné trois:

“fouling” (encrassement):

il correspond à la précipitation des colloïdes ou des matières organiques à la surface de la membrane.

“scaling” (entartrage):

il correspond à la précipitation des composés minéraux cristallins tels que:  $\text{CaCO}_3$  ,  $\text{MgCO}_3$  ,  $\text{Mg(OH)}_2$  ,  $\text{CaSO}_4$  à la surface ou au sein de la membrane.

“poisoning” (empoisonnement):

il correspond à la fixation des contre-ions volumineux ou multivalents à l’intérieur du matériau membranaire.

Le colmatage des membranes permselectives est un problème majeur en électrodialyse, en effet la polarisation qui lui est souvent liée empêche l’obtention de conditions opératoires optimales.

Comme les matières colloïdales sont présentes sous forme très légèrement ionisées (chargées négativement) dans la plupart des eaux saumâtres, ce sont les membranes échangeuses d’anions qui sont principalement affectées par le phénomène de colmatage.

### **I-5.3.Le transport d’eau à travers les membranes:**

La déminéralisation par électrodialyse s’accompagne d’un transport d’eau du circuit de dilution vers le circuit de concentration.Ce transport d’eau est la résultante de plusieurs phénomènes élémentaires [32]:

- Le phénomène d’osmose dû à la différence de concentration entre les deux solutions.
- Le phénomène d’électro-osmose dû à l’eau amenée par entraînement visqueux.
- Le phénomène de solvatation des ions dû à la forte liaison de l’eau aux ions par des forces électrostatiques.

Le transfert d'eau est un facteur limitant le niveau de reconcentration par électrodialyse des solutions électrolytiques. Le transport d'eau à travers les membranes dépend de plusieurs paramètres:

- Les conditions expérimentales (densité de courant, agitation, différence de concentration de part et d'autre de membrane).
- Les caractéristiques des membranes (longueur des chaînes, teneur en eau et capacité d'échange).

**TOMBALAKIAN et COLL( 32 )** ont trouvé que le transport d'eau décroît pour les faibles densités de courant.

**LAKSHMINARAYA NAIHAH(33)** a observé que le transport électro osmotique augmente aux faibles densités de courant et diminue aux plus fortes.

**BOUDET-DUMY (34 )** a étudié le transport d'eau à travers une membrane échangeuse de cations CMV et une autre membrane échangeuses d'anions ARA en présence de solution d'acide chlorhydrique concentré. Les résultats obtenus avec ces deux membranes montrent que la variation du volume d'eau est une fonction linéaire du temps et de l'intensité de courant appliquée et le transport d'eau diminue quand l'intensité appliquée augmente.

**BENKADA A. ( 35)** a déterminé la concentration limite(  $C_{sl}=2,02$  M) lors de la reconcentration de la solution d'acétate de sodium par électrodialyse.

**CHAPITRE III**

**APPAREILLAGES  
ET  
TECHNIQUES ANALYTIQUES**

### III-1.Types d'électrodialyseurs utilisés:

Nous avons travaillé sur trois types d'électrodialyseurs:

- **Micropilote de laboratoire:**

Cet électrodialyseur est réalisé par le laboratoire de CNRS de Montpellier, il est composé de cinq compartiments (figure 6 ):

- Le compartiment central ( P ) ou circule la solution à traiter et qui est délimité par deux membranes, une membrane anionique et une membrane cationique. La surface utile de chaque membrane est  $S=20 \text{ cm}^2$
- Deux compartiments (  $C_A$  et  $C_C$  ) ou circulent les solutions de concentration de part et d'autre du compartiment centrale.
- Deux compartiments ( E ) ou circulent les solutions de rinçage des électrodes

- **Pilote de laboratoire à deux compartiments (P1):**

Nous avons opéré avec un electrodialyseur de type aqualyseur de la société CORNING. La vue éclatée de cet appareil est représentée par la figure7. Il est constitué d'un empilement de 19 membranes anioniques ( AMV ) et de 20 membranes cationiques ( CMV ), la surface utile de chaque membrane est de  $69 \text{ cm}^2$ . A chaque extrémité de l'empilement se trouve une électrode en graphite, munie d'un circuit de rinçage d'électrodes.

- **Pilote de laboratoire à 4 compartiments (P4):**

Il est du fabricant EURODIA modèle EUR2D - 5p9 . Le principe de fonctionnement de cet appareil est représenté par la figure 8 .Chaque cellule de cet électrodialyseur est constitué de deux concentrats ( $C_1$  et  $C_2$ ) et deux diluats( $D_1$  et  $D_2$ ) (figure 9 ). Les membranes qui délimitent ces compartiments ont une surface utile de  $200 \text{ cm}^2$ . L'ensemble constitué de cinq cellules élémentaires développe une surface totale de  $1000 \text{ cm}^2$ . Les Membranes échangeuses d'ions utilisées sont du fabricant de membranes NEOSEPTA-TOKOYAMA SODA suivant l'empilement ci dessous :

- Membranes cationiques : 5 CR2- 7 CMX Sb
- Membranes anioniques : 10 AMX S

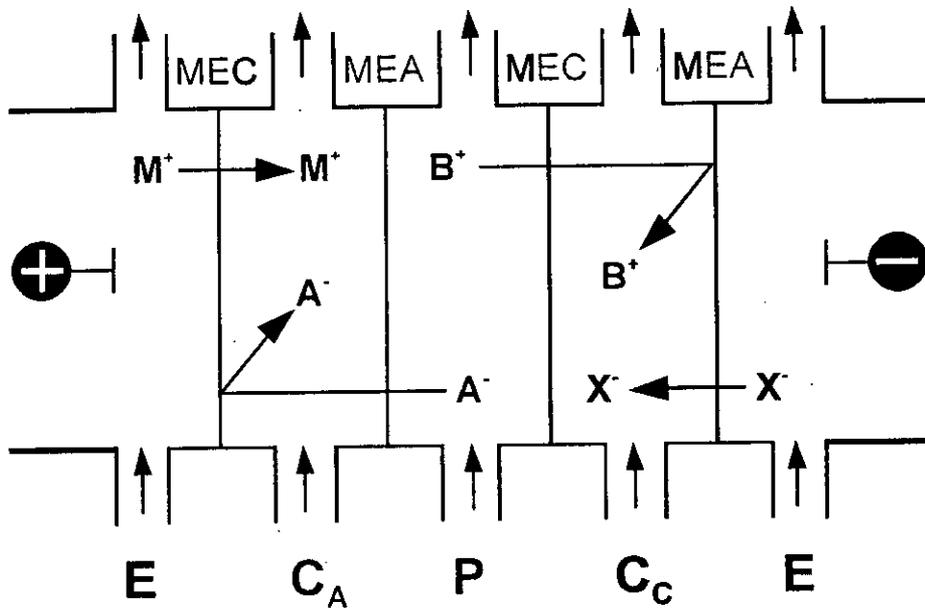


Figure 6 : Schéma simplifié de l'électrodialyseur micropilote

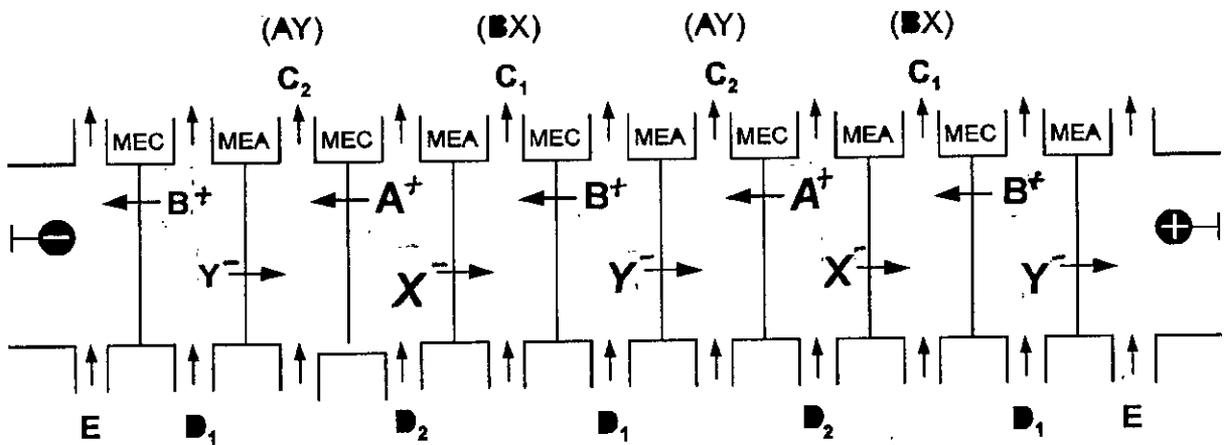


Figure 8: Schéma simplifier de l'électrodialyseur pilote à 4 compartiments

Structure du module de l'électrodialyseur pilote "SODETEG" type "AQUALYSER"

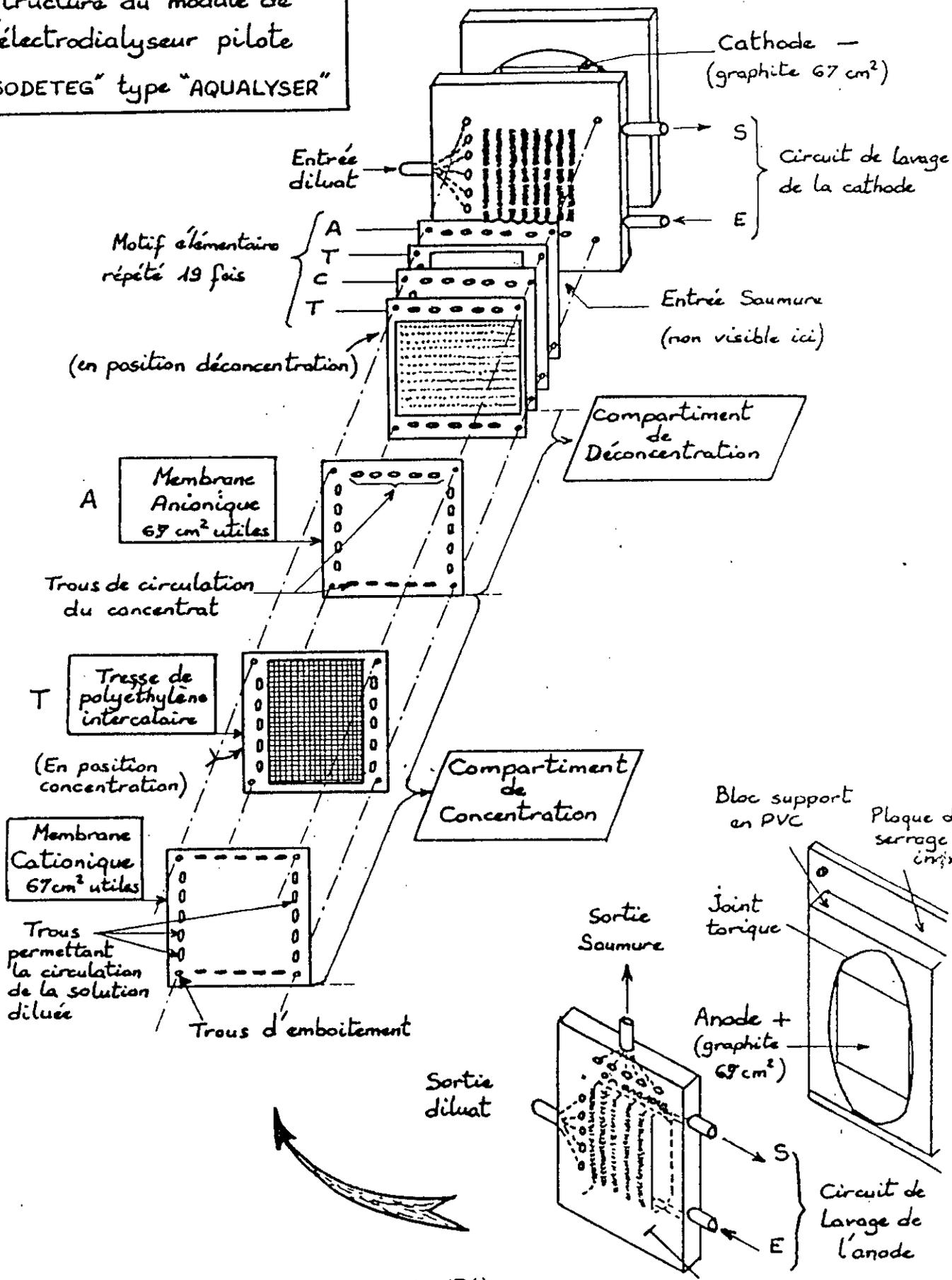


Figure 7: Vue éclatée du pilote de laboratoire (P1).

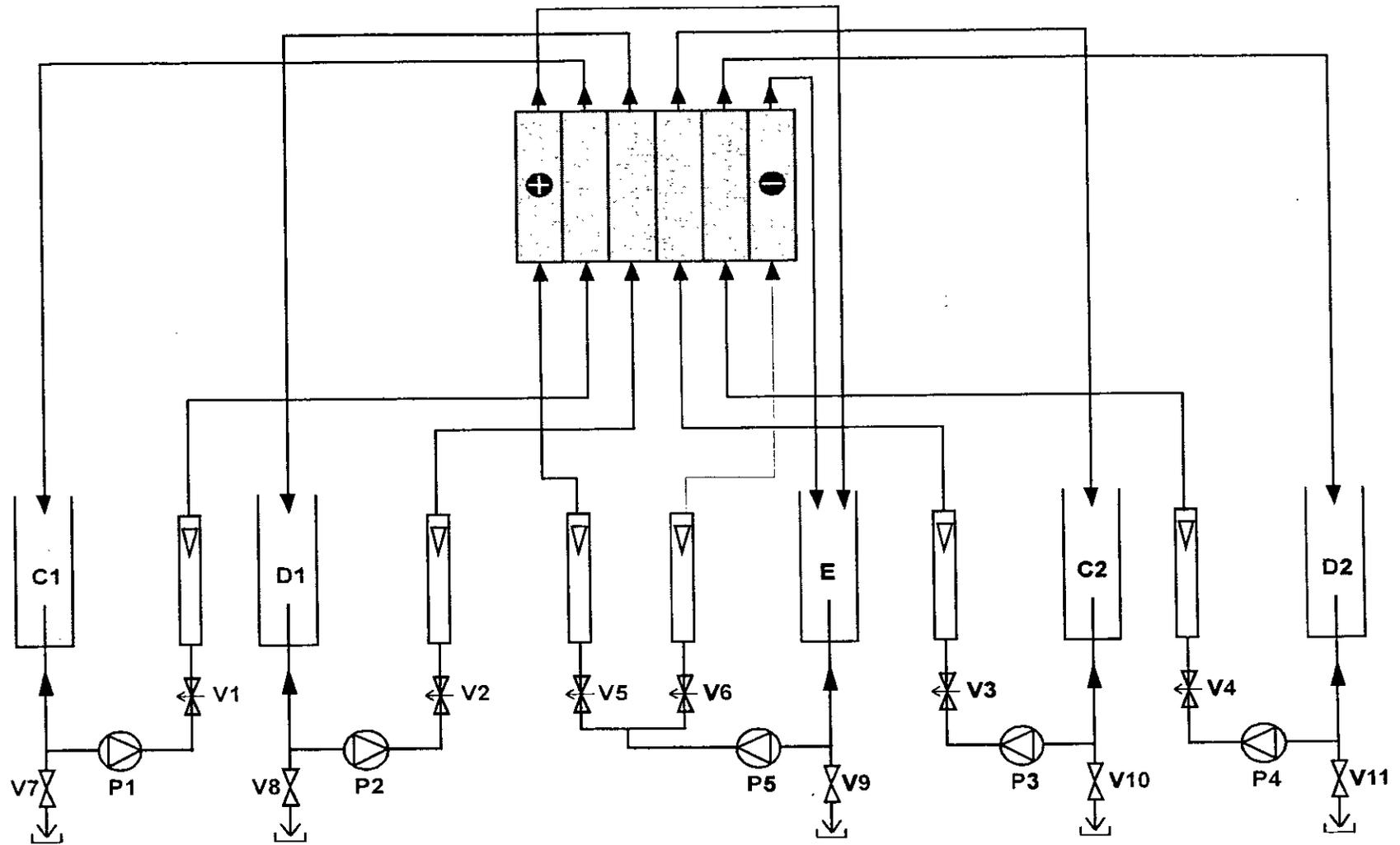


Figure 9: Diagramme de circulation du pilote de la laboratoire (P4).

## 2. Analyse des acides aminés :

Depuis la découverte des acides aminés comme éléments de base des protéines, leur analyse et séparation sont devenus indispensables pour l'étude des protéines.

La technique d'analyse la plus dominante ces dernières années est la chromatographie en phase liquide. Les deux types de chromatographie liquide utilisés sont post-colonne et précolonne dérivatisation. En effet, Les acides aminés ont des chromophores faibles dans la région UV et visible et ne possèdent pas de fluorescence native, il ne peuvent donc pas être détecté directement par un détecteur spectroscopique ou un détecteur à fluorescence, et leur dérivatisation s'impose .

La technique de dérivatisation post-colonne développée par Spackman et al [45] en 1958, est caractérisée par un mécanisme de séparation sur résine échangeuse d'ions et une dérivatisation par la ninhydrine à la sortie de la colonne. cette méthode a été utilisée pour l'analyse des acides aminés dans une large variété d'échantillons. Cependant, certains désavantages de cette méthode tels le long temps de rétention, basse sensibilité et les coûts élevés des instruments rendent cette technique inutilisable dans beaucoup de cas [46] . c'est une technique qui nécessite en plus de chromatographie phase liquide une pompe à réactifs et un réacteur placé entre la colonne et le système de détection[47]. La dérivatisation précolonne ne nécessite quant à elle aucun appareillage supplémentaire.

Depuis l'utilisation par SANGER de 2,4 dinitrofluoro benzène pour l'identification de N-terminal amino-acides, plusieurs réactifs ont été développés pour le même objectif. Parmi ces réactifs on rencontre les dérivés fluorescents[48] et les dérivés absorbant dans l'U.V. ou le visible [49].

Dans ce présent travail, l'analyse des acides aminés par HPLC a été effectuée suivant la technique ACQ-TAG WATERS. Le mode opératoire est le suivant:

- diluer les échantillons;
- introduire dans chaque tube d'analyse 10  $\mu$ l de l'étalon interne;
- préparer trois tubes d'analyse pour les étalons externes à concentration 0.25, 0.5 et 1 mmoles/l;
- introduire 10 $\mu$ l de chaque échantillon dans les tubes contenant l'étalon interne;
- ajouter dans chaque tube:
  - 25  $\mu$ l de produit de dérivation
  - 50  $\mu$ l de tampon phosphaté
- chauffer pendant 10 mn à 55°C;

L'analyse quantitative des acides aminés a été effectuée aussi par la ninhydrine suivant le mode opératoire ci-dessous:

- dissoudre 0.4g de la ninhydrine dans 2 ml de l'ethermonoethylique de l'éthylène glycol;
- dissoudre 50 mg de l'hydridantine dans 2 ml de l'ethermonoethylique de l'éthylène glycol;
- mélanger les deux solutions avec 50 ml de la solution tampon pH=5.5 (4M);
- mettre dans un tube à essai :

0.5 ml de la solution à analyser ;  
 1 ml de la solution tampon pH = 5.5 (1M)  
 2 ml de la solution de la ninhydrine;

- chauffer dans un bain marie pendant 15 mn;
- laisser refroidir à l'obscurité pendant 30 mn;
- faire la lecture au spectrophotomètre à  $\lambda = 570$  nm;

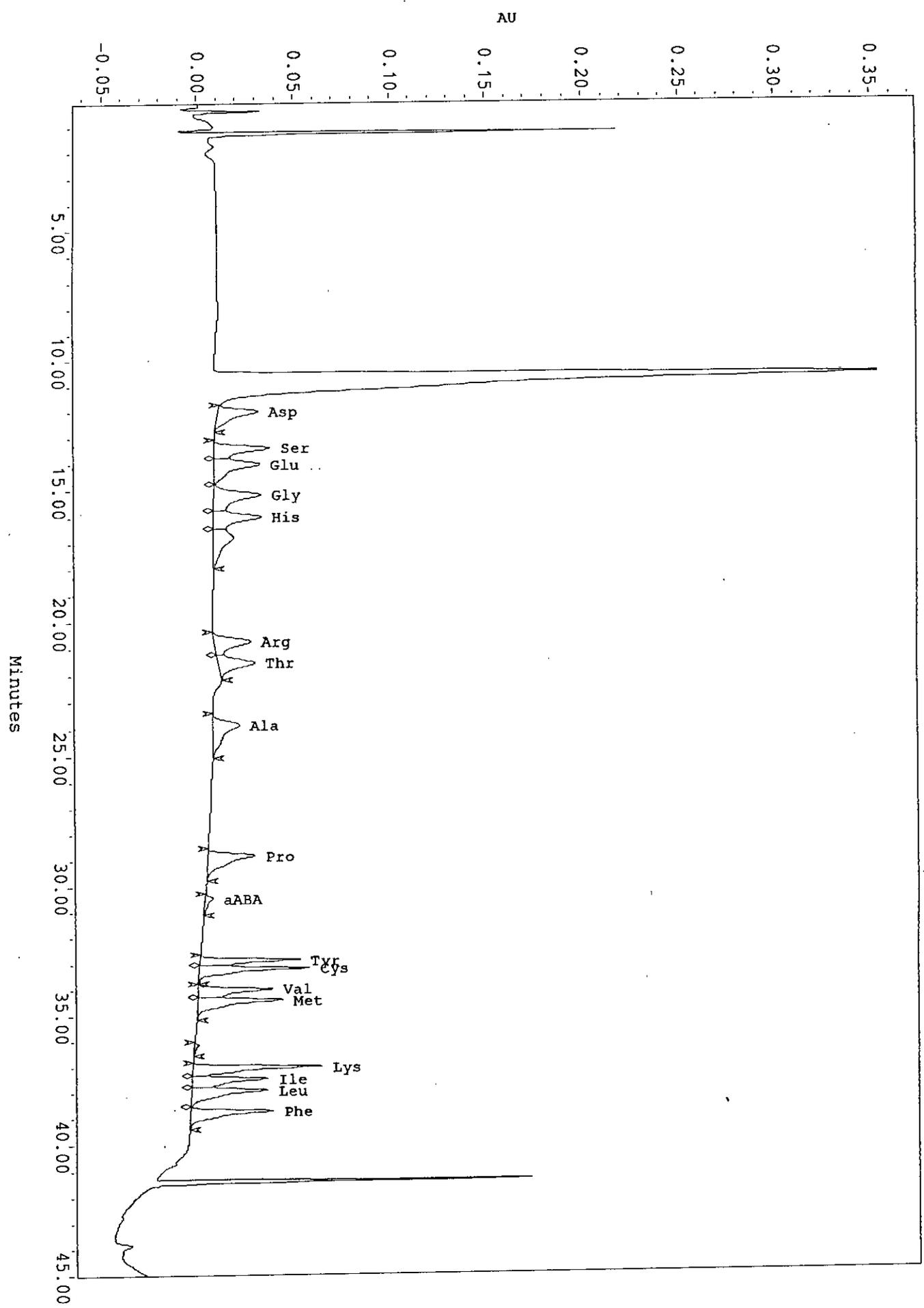
### 3. Analyse des chlorures :

Le dosage des ions chlorures s'effectue par la méthode électrochimique selon le principe d'ampérométrie à électrode d'argent, en utilisant un titrateur automatique Tacussel de type TACL 2.

### 4. Dosage de sodium :

Le dosage de sodium s'est fait par spectrophotomètre de flamme . L'appareil utilisé est un spectrophotomètre d'adsorption atomique de type SPECTRAA 620 ABQ .

SampleName: Stand0.50 Vial: 3 Inj: 1 Ch: 254nm Type: Standard



## **CHAPITRE IV**

### **HYDROLYSE DU CRUOR**



### **a- Hydrolyse enzymatique:**

- La concentration en cruor : 50 g/l.
- La concentration en enzyme (papaine) : 3 g/l.
- Température : T = 55°C.
- PH de l'hydrolysat : 8.

### **b- Hydrolyse chimique :**

En vue d'une hydrolyse totale, nous avons opéré avec les conditions opératoires suivantes: L'acide chlorhydrique 6N pendant 24 heures à température de 110° C et sous reflux. L'hydrolysat est ensuite neutralisé par la soude et la partie non hydrolysée est éliminée par centrifugation ou ultrafiltration.

La concentration initiale en cruor introduite pour produire les hydrolysats H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, est C<sub>0</sub> = 300 g l<sup>-1</sup>. Pour l'hydrolysat H<sub>4</sub> nous avons utilisé 500g l<sup>-1</sup>.

### **V-2. Décoloration des hydrolysats :**

Cette opération est réalisée dans le but d'éliminer les résidus humiques de coloration brunes contenus dans les hydrolysats de cruor. Ces résidus sont susceptibles d'empoisonner les membranes d'électrodialyse [72]. Les conditions expérimentales utilisées sont celles obtenues par D. MARTINEZ [21]:

Les hydrolysats sont agités pendant 1 heure dans une solution à 1 % en charbon actif à la température T=80° C

### **Résultats et discussion :**

Les résultats des différentes hydrolyses effectuées sont présentées dans le tableau II. Les hydrolysats H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> et H<sub>3</sub> sont obtenus avec les mêmes conditions d'hydrolyse. Au cours de la production de l'hydrolysat H<sub>4</sub> nous avons essayé d'augmenter la concentration en acides aminés en opérant avec une concentration en cruor plus élevée que les précédentes et en ajoutant un plus faible volume de NaOH.

La figure 10 présente les pertes en acides aminés après décoloration avec le charbon actif.

**Tableau II: Concentrations en acides aminés dans les hydrolysats de cruor (mmole.l<sup>-1</sup>)**

Acides Aminés	Hydrolysats chimiques				Hydrolysat enzymatique
	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>	H <sub>4</sub>	
Asp	38.9	29.66	42.9	87.92	--
Glu	25.1	20.34	24.5	34.23	--
Ser	21.15	17.53	17.65	52.53	0.465
Gly	24.5	24.86	27.6	71.71	1.27
His	17.45	16.93	21.95	52.78	0.04
Arg	8.8	6.33	9.95	22.29	--
Thr	17.15	14.93	18.75	41.20	0.065
Ala	44.7	43.13	41.3	113.55	1.22
Pro	12.9	11.46	13.15	27.31	0.15
Tyr	3.1	4.73	5.8	3.89	--
Val	28.7	26.82	33.95	79.22	0.50
Met	4.95	2.46	5.35	21.27	0.10
Cys	0.9	-	1.75	6.17	0.05
Iso	0.25	-	0.55	8.76	--
Leu	37.9	37.26	40.9	85.49	1.1
Phe	12.35	14.06	14.45	49.06	0.11
Lys	29	26.2	27.0	47.82	0.72
[Cl <sup>-</sup> ](mole l <sup>-1</sup> )	2.04	1.91	2.1	2.2	45.10 <sup>-3</sup>
[Na <sup>+</sup> ](mole l <sup>-1</sup> )	1.80	1.71	1.86	2.0	34.10 <sup>-3</sup>

Nous constatons que les concentrations en acides aminés dans l'hydrolysat enzymatique de cruor sont très faibles et que certains acides aminés ( Asp , Glu , Tyr , Iso...) n'existent pas dans cet l'hydrolysat. Ces résultats peuvent s'expliquer d'une part par la concentration relativement faible en cruor introduite initialement dans l'hydrolysat (50g/l), mais surtout par le caractère spécifique de l'enzyme ( papaine ) utilisée. En effet, les enzymes sont des réactifs plus ou moins spécifiques d'un certain type de liaisons peptidiques [2].

On remarque aussi sur ce même tableau que la Tyrosine, la cysteine et l'isoleucine se trouvent en très faibles quantités dans l'hydrolysat chimique. On peut donc penser à la dégradation des acides aminés au cours de l'hydrolyse acide des protéines.

Les résultats de la décoloration de l'hydrolysat présentés par la figure 10 montrent que certains acides aminés sont piégés par le charbon actif. Ces pertes sont relativement faibles excepté la phénylalanine qui est un acide aminé aromatique.

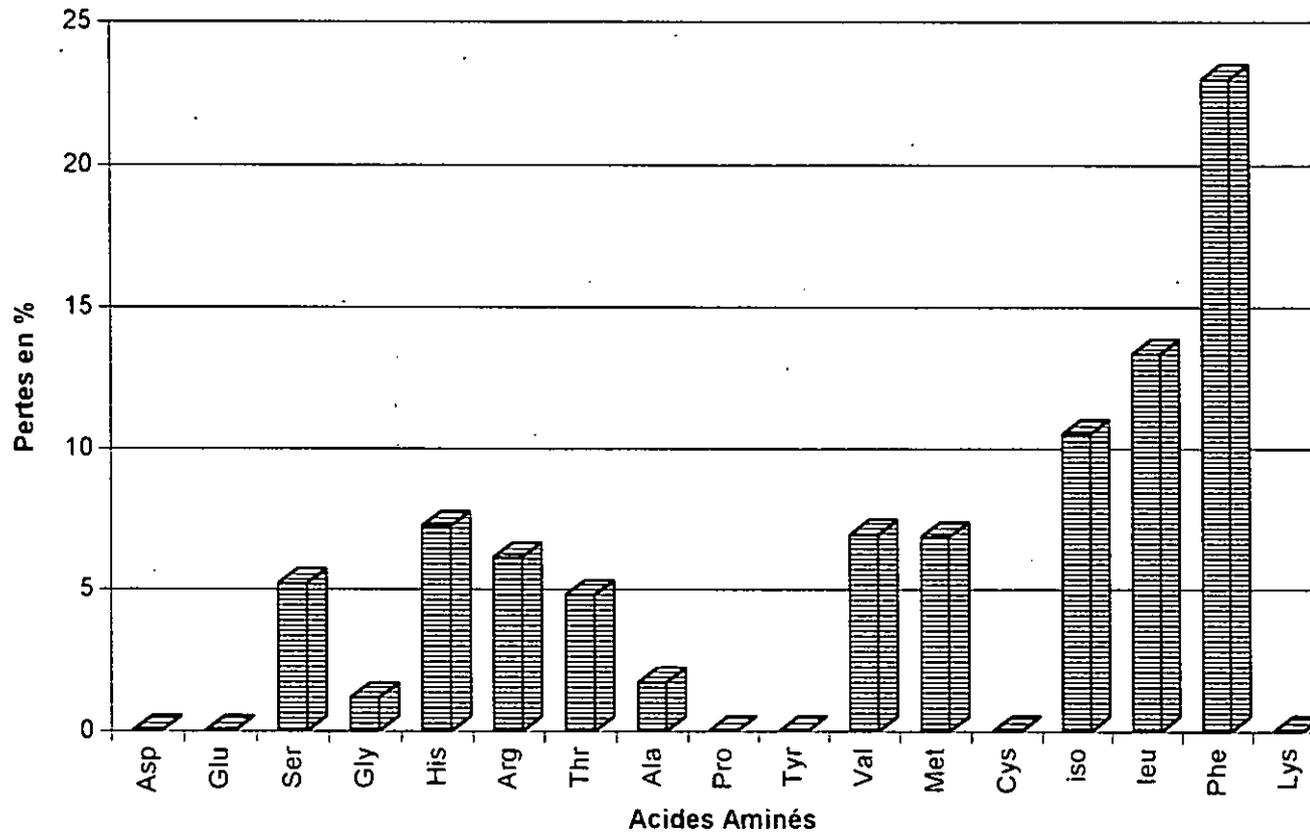


Figure 10 : Pertes en acides aminés après décoloration par charbon actif

## **CHAPITRE V**

### **DEMINERALISATION DES HYDROLYSATS**

## V-1. Etude du phénomène de transport d'eau :

L'électro-migration des ions à travers les membranes d'électrodialyse s'accompagne d'une diminution de volume de la solution contenue dans le compartiment produit et d'une augmentation de volume dans le compartiment saumure.

L'objectif de cette expérience est de montrer l'effet de transport d'eau à travers les membranes sur la reconcentration d'un soluté par électrodialyse .

### Conditions expérimentales:

- Electro-dialyseur : P<sub>1</sub>
- Membranes : AMV-CMV
- Tension électrique appliquée : 17 Volts  
Intensité du courant électrique : 1 Ampère
- Dans le compartiment concentrat Nous avons introduit initialement 1 litre de la solution  
NaCl 10<sup>-2</sup> M.

Dans le compartiment diluat on introduit plusieurs fois une solution NaCl 1 Molaire. Cette solution est renouvelée lorsque la tension électrique commence à augmenter.

La concentration de NaCl a été déterminée au cours de cette expérience à l'aide de conductimètre de type OSK 6603 du fabricant OGA WASIKI .

### Résultats et interprétation:

Au cours de cette expérience nous avons suivi l'évolution du volume d'eau ainsi que la concentration en NaCl dans la saumure. La figure 11 montre que le volume de la solution dans le compartiment saumure augmente lors de la déminéralisation par électrodialyse d'une solution salée. Par conséquent, la concentration en NaCl dans ce même compartiment tend vers une valeur limite et atteint un palier autour de 2.1 Molaire ( Figure 12). Toutefois, on constate que le nombre de moles en NaCl continue à augmenter de façon linéaire (figure 13).

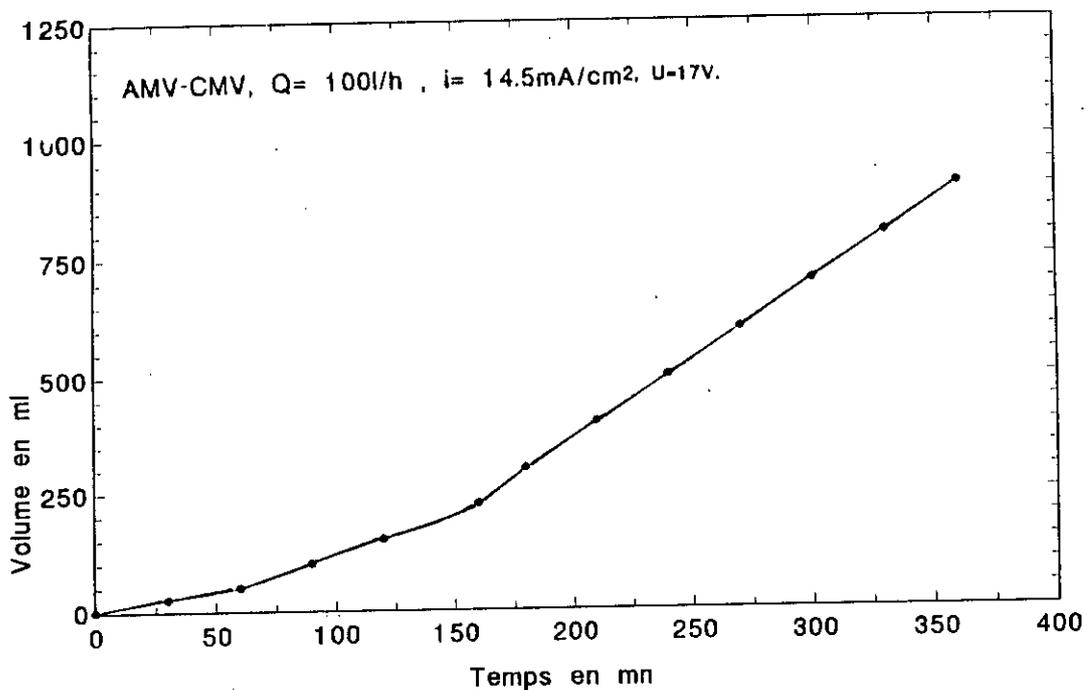


Figure 11: Evolution du volume d'eau en fonction du temps dans la saumure.

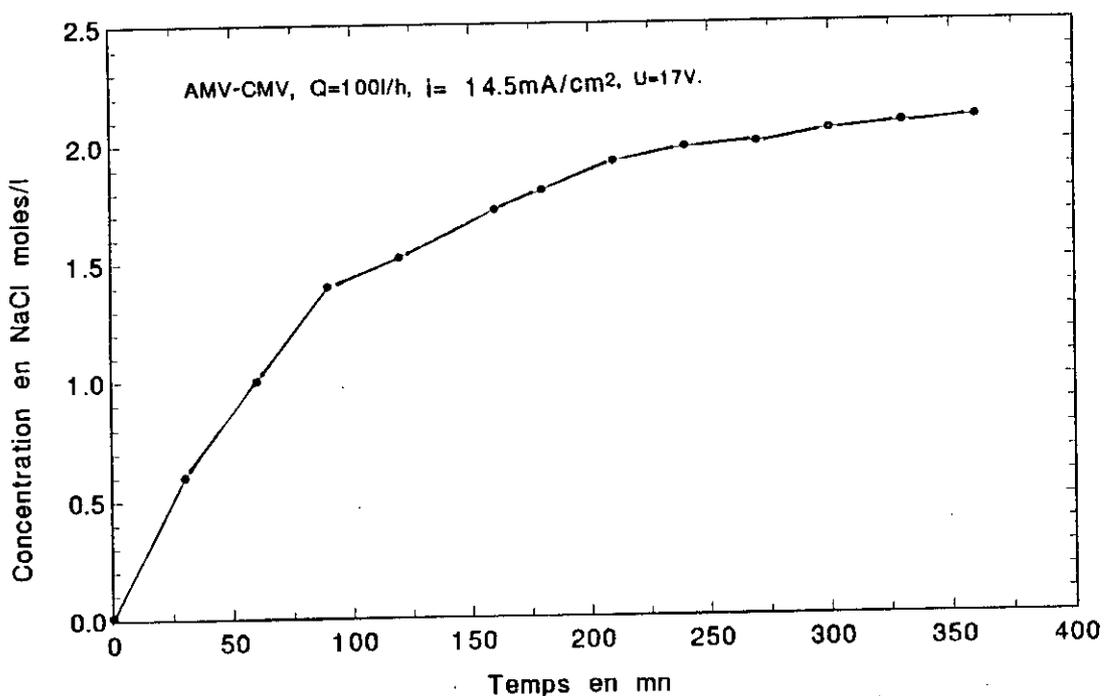


Figure 12: Evolution de la concentration en NaCl dans la saumure.

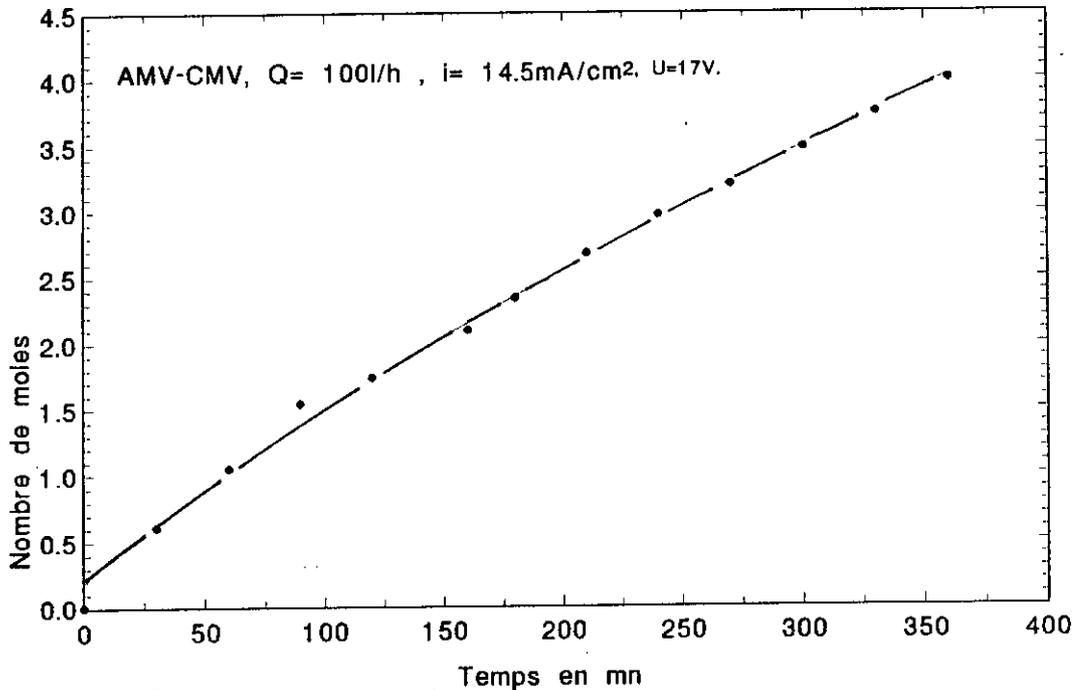


Figure13: Evolution du nombre de moles de NaCl dans la saumure.

Ces résultats s'expliquent par le fait qu'en régime stationnaire, la concentration  $C_s$  de NaCl dans la saumure est exprimée par la relation suivante:

$$C_s = \frac{n_s}{V_s} = \frac{Kt + n_s^0}{K't + V_s^0} = \frac{9.7010^{-3}t + n_s^0}{3.3310 \cdot 10^{-3}t + V_s^0}$$

Avec

- t : temps de déminéralisation.
- k : pente de la droite représentant l'évolution de nombre de moles de NaCl dans la saumure (fig 14).
- k' : pente de la droite représentant l'évolution du volume dans la saumure (fig13).
- $n_s$  : nombre de moles de NaCl dans la saumure à l'instant t.
- $V_s$  : volume de la saumure à l'instant t (mn).
- $n_s^0$  : nombre de moles initiale de NaCl dans la saumure.
- $V_s^0$  : Volume initiale de la saumure.

Pour un temps très longs ( $t \rightarrow \infty$ ),  $C_s$  tend vers une valeur limite  $C_{s,l} = 2.91 \text{ mol / l}$ . On déduit à partir des résultats de cette expérience que la déminéralisation des hydrolysats de cruor est nécessaire, pour éviter les faibles valeurs des concentrations limites en acides aminés lors de leur extraction par électrodialyse.

## V-2. Déminéralisation des hydrolysats

L'objectif de cette étape est de produire un mélange d'acides aminés épuré de la plus grande partie des sels minéraux. Ces derniers composés réduisent les rendements d'extraction des acides aminés et limitent leur niveau de reconcentration par électrodialyse.

### V-2-1. Déminéralisation de l'hydrolysat enzymatique.

Nous avons réalisé une déminéralisation de l'hydrolysat enzymatique de cruor sur l'électrodialyseur pilote à deux compartiments (P1), les conditions opératoires sont les suivantes:

- Intensité du courant : 0.1 A
- Membrane : AMV-CMV
- Compartiment produit : 1 litre de hydrolysat enzymatique de cruor.
- Compartiment concentrat : 1 litre de solution NaCl  $10^{-2}$  M
- Compartiment électrodes : 1.5 litre de la solution Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>  $10^{-1}$  M

### Résultats et discussion:

L'évolution de nombre de moles et des pourcentages de pertes en acides aminés en fonction du temps d'électrodialyse pendant la déminéralisation de l'hydrolysat enzymatique sont présentés respectivement sur les figures 14 et 15.

A partir de ces résultats on remarque que dès le début de l'expérience, une quantité non négligeable des acides aminés migrent en même temps que le NaCl (fig 15). Cela est dû à la faible concentration en sel dans cet hydrolysat (45 mmole.l<sup>-1</sup>). En effet, pendant les premières minutes (15min) les pertes sont déjà importantes pour pouvoir continuer la déminéralisation. Le dessalement de cet hydrolysat ne semble donc pas nécessaire avant d'entamer l'extraction des acides aminés par électrodialyse.

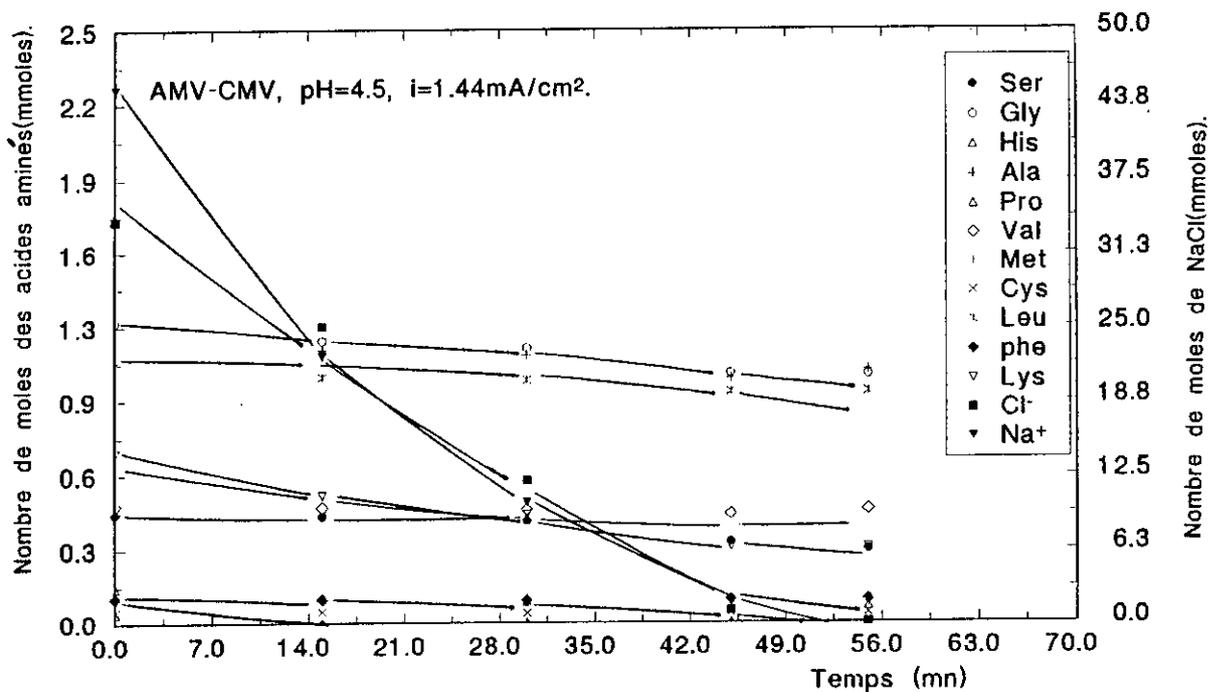


Fig 14: Evolution de nombre de moles de NaCl et des acides aminés dans le produit lors de la déminéralisation de l'hydrolysate enzymatique

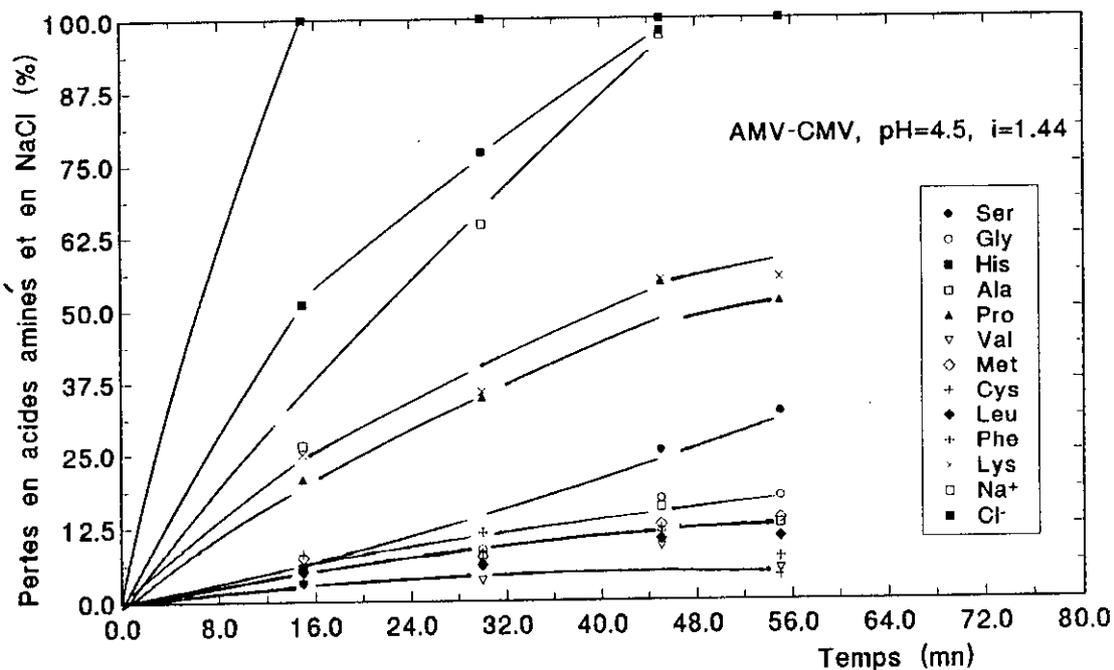


Fig15: Evolution des pertes en acides aminés et en NaCl dans le produit lors de la déminéralisation de l'hydrolysate enzymatique sur le pilote P1.

## V-2-2. Déminéralisation de l'hydrolysate chimique:

l'hydrolysate acide de cruor contient une quantité importante en NaCl issue de la neutralisation de HCl par la soude.

### Mode opératoire:

Quatre expériences de déminéralisation ont été réalisées sur le P1, les deux premières ont été effectuées au pH de hydrolysate ( pH=2.6 ), l'une à densité du courant constante(  $i = 29 \text{ mA /cm}^2$  ) et l'autre à densité du courant régressive au cours de la manipulation (  $29-7 \text{ mA/cm}^2$  ). les deux autres sont réalisées à pH=6 avec regression de la densité du courant au cours du temps et à deux concentrations finales en NaCl différentes dans le produit.

Les conditions expérimentales communes à ces quatre expériences sont :

- Membranes : AMV-CMV
- Produit : 0.5 litre de l'hydrolysate chimique.
- Saumure : 1.5 litre de solution NaCl  $10^{-2}$  M
- Electrolyte : 1.5 litre de solution  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,1 M.

Avec les conditions opératoires suivantes nous avons effectué deux déminéralisations sur le micropilote de laboratoire, l'une à pH=2.6 et l'autre à pH=6:

- Membranes: AMV-CMV.
- Produit :  $V_p=150$  ml de l'hydrolysate.
- Saumure :  $V_s =500$ ml de la solution NaCl  $10^{-2}$  M.
- électrolyte : 5 litres de la solution  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,1 M.

### Résultats et Discussion:

Lors de la première expérience de déminéralisation de l'hydrolysate chimique, les pertes en acides aminés étaient trop élevées. Nous avons alors effectué une déminéralisation avec réduction du courant au cours de l'expérience. Les résultats de ces deux expériences sont présentés dans le tableaux III.

**Tableau III** : Effet de la régression du courant sur les pertes en acides aminés lors de la déminéralisation sur le pilote P1 avec les membranes AMV-CMV à pH=2.6.

Acides aminés	Produit avant déminéralisation		Déminéralisation sans régression du courant			Déminéralisation avec régression du courant		
	[AA] <sub>0</sub> (mmole/l)	N <sub>0</sub> (mmole)	[AA] <sub>r</sub> (mmole/l)	N <sub>r</sub> (mmole)	pertes (%)	[AA] <sub>r</sub> (mmole/l)	N <sub>r</sub> (mmole)	pertes (%)
Asp	40.6	20.3	30.7	10.43	48.62	49.5	17.32	14.67
Ser	19	9.5	12.8	4.48	52.82	18.9	6.61	30.42
Glu	23	11.5	17	5.78	49.73	27.7	9.69	15.73
Gly	20.5	10.25	15.4	5.23	48.97	17.4	6.09	40.58
His	22.5	11.25	6.3	2.14	80.97	8.1	2.83	74.84
Arg	8.5	4.35	-	-	100	-	-	100
Thr	20.3	10.15	16.1	5.47	46.10	23.8	8.33	17.93
Ala	46.7	23.35	28.8	9.79	58.07	40.4	14.14	39.44
Pro	15.2	7.6	11.4	3.87	49.07	16.5	5.77	24.07
Cys	2	1	2	0.68	32	2.7	0.94	5.5
Tyr	4.5	2.25	3	1.02	54.60	5.4	1.89	16
Val	35.1	17.55	26.3	8.94	49.05	40.3	14.10	19.62
Met	5.8	2.9	4.4	1.49	48.6	0.5	0.17	93.96
Lys	27.9	13.95	7.0	2.38	82.93	9.5	3.32	52.57
Iso	0.6	0.3	0.3	0.102	66	0.7	0.23	22
Leu	43.9	21.95	33.8	11.49	47.65	51.6	18.06	17.72
Phe	16	8	16.8	5.71	28.62	23.2	8.12	0
[Cl <sup>-</sup> ]	2100	1050	280	95.2	90.93	260	91	91.33
[Na <sup>+</sup> ]	1860	930	210	71.40	92.32	200	70	92.42
Volume	500 ml		340 ml			350 ml		

Nous constatons que la déminéralisation avec régression du courant au cours de l'expérience permet de réduire les pertes en acides aminés. Cela pourrait être expliqué par le fait que l'intensité du courant totale dans la membrane échangeuse d'ions est donnée par la relation suivante:

$$i = \sum i_j = i_{(Na^+ \text{ ou } Cl^-)} + i_{(acides \text{ aminés})}$$

Quand le courant transporté par les ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> atteint sa valeur limite, toute augmentation du courant sera conduite par les acides aminés. Cependant, ces résultats nous montrent que les pertes en acides aminés restent encore importantes pour cette deuxième expérience. Nous avons alors pensé à l'effet du pH de l'hydrolysat sur les pertes au cours de la déminéralisation. Pour cela, nous avons effectué deux études cinétiques de déminéralisation sur le micropilote, l'une à pH=6 et l'autre à pH de l'hydrolysat (pH =2.6). Les résultats sont présentés sur les figure16 à 19.

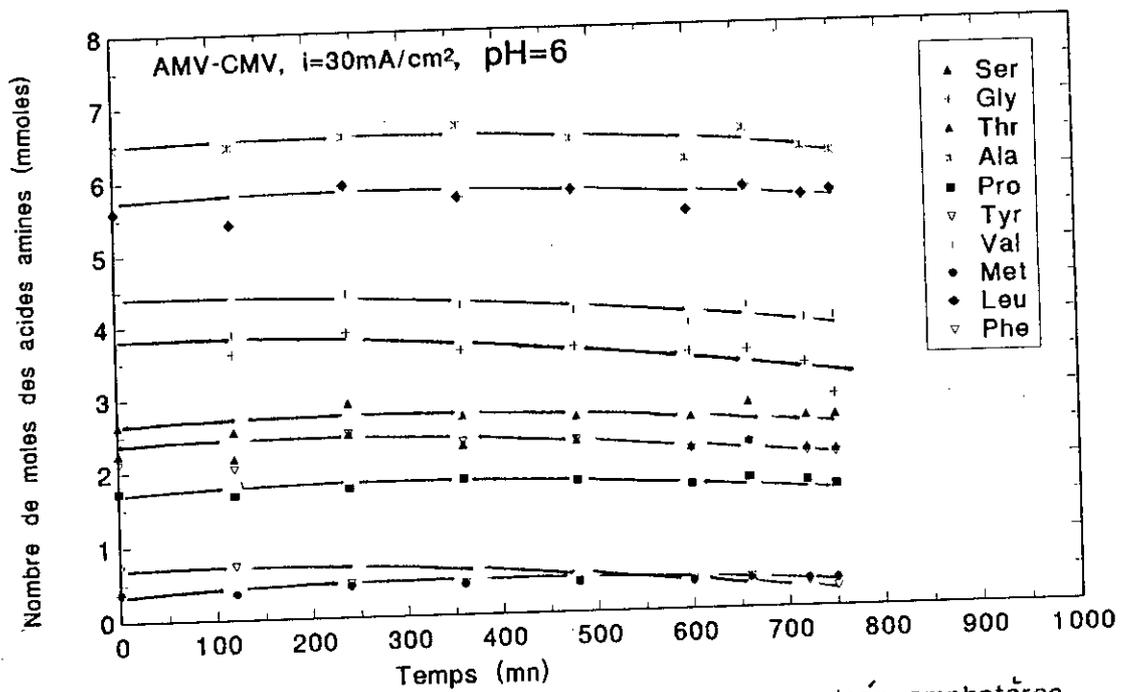


Figure16: Evolution du nombre de moles des acides aminés amphotères dans le produit lors de la déminéralisation sur le micropilote.

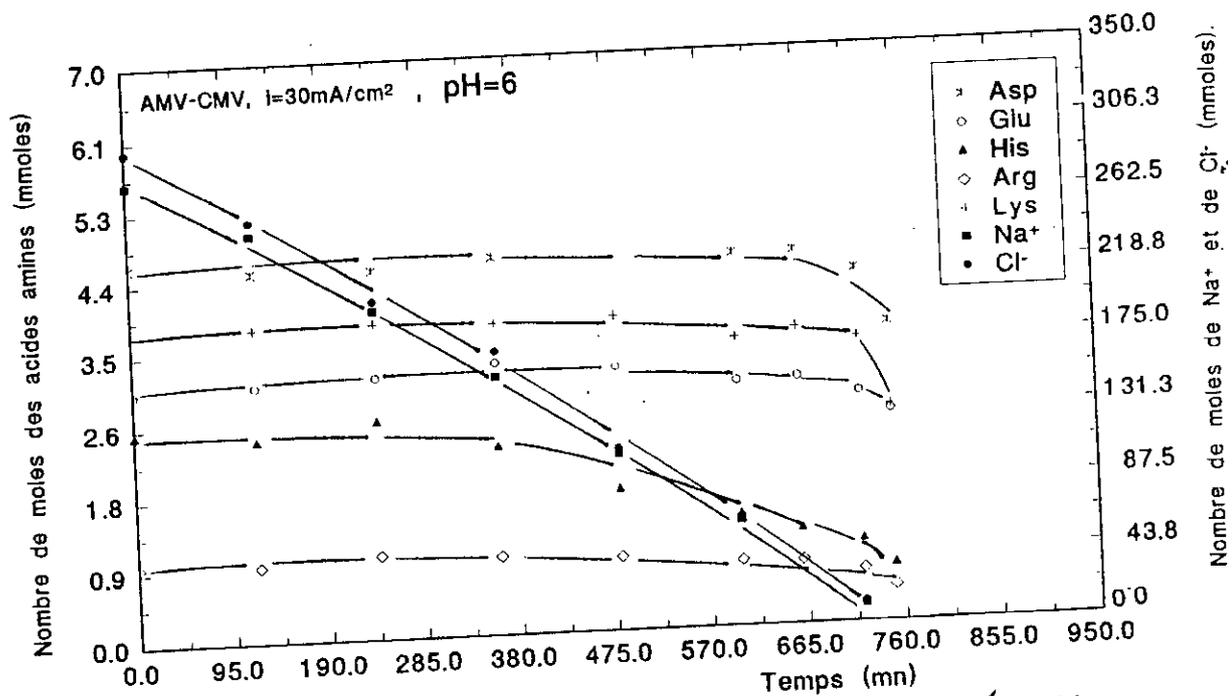


Figure17: Evolution de nombre de moles de  $\text{NaCl}$  et des acides aminés acides et basiques dans le diluat lors de la déminéralisation sur le micropilote

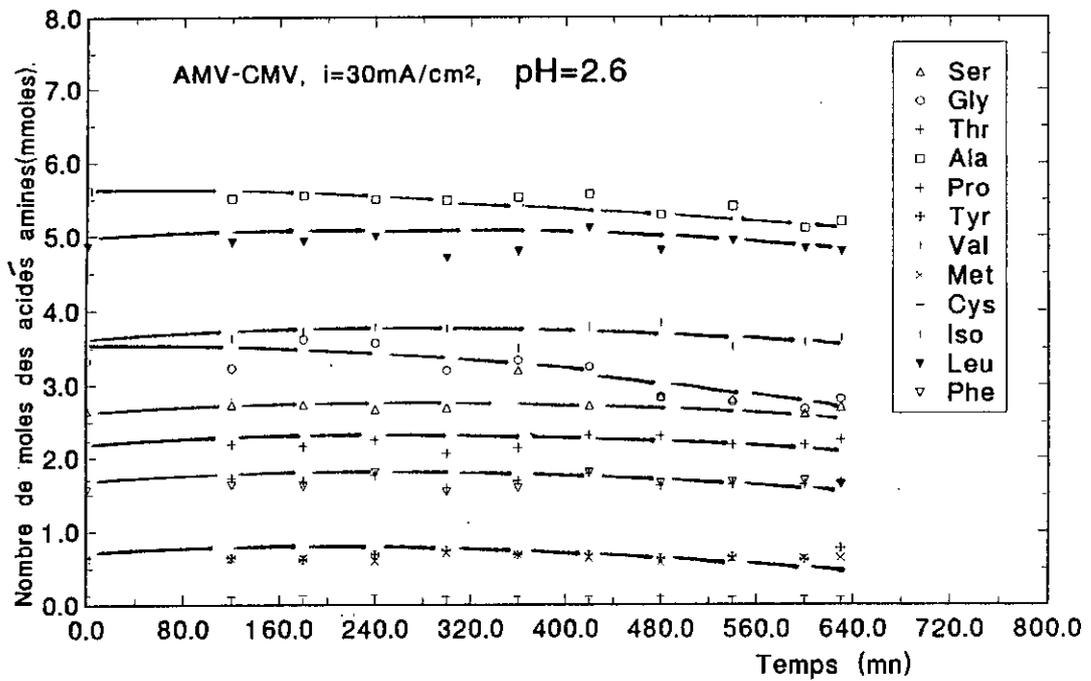


Fig18: Evolution de nombre de moles des acides aminés amphotères dans le produit lors de la déminéralisation sur le micropilote.

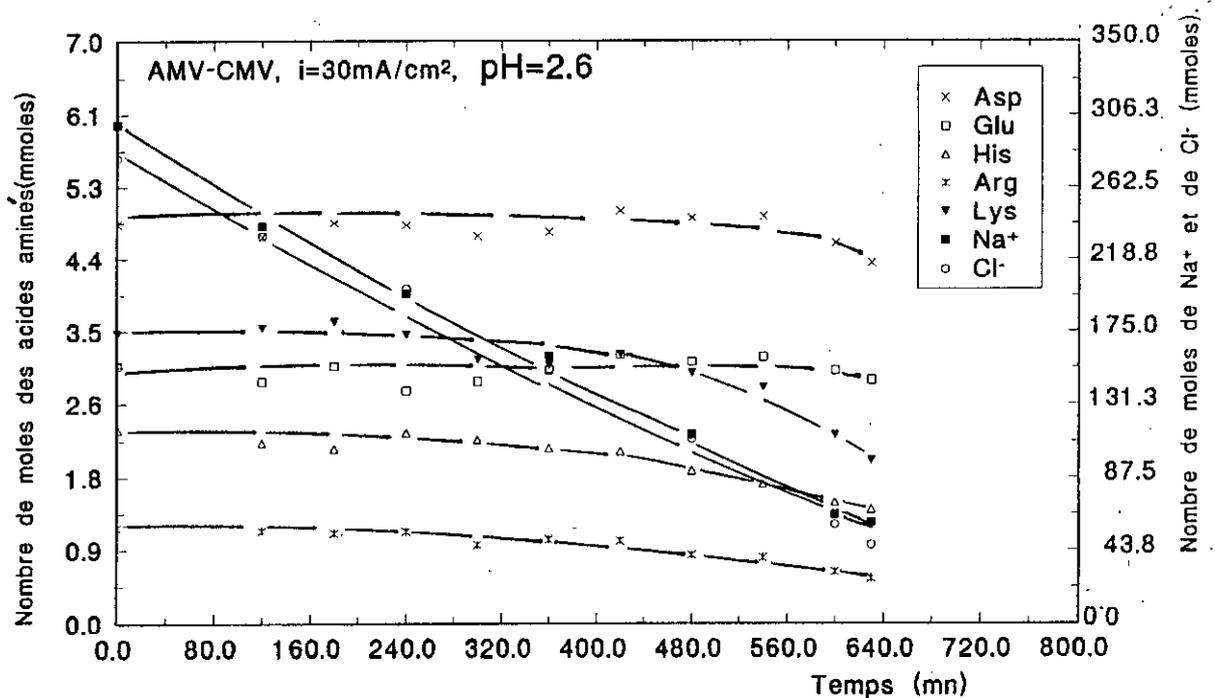


Fig 19: Evolution de nombre de moles de NaCl et des acides aminés acides et basiques dans le produit lors de la déminéralisation sur le micropilote.

Nous constatons sur ces figures (16 à 19) qu'au début de l'électrodialyse, le nombre de moles en acides aminés contenus initialement dans le produit reste pratiquement constant. C'est à dire que la totalité du courant est transporté par les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , mais quand la concentration de ces ions dans l'hydrolysats devient faible, se sont les acides aminés chargés qui conduisent une partie du courant imposé(fig17et19).

Les figures 20 et 21 représentant les pertes en acides aminés en fonction de la concentration finale en  $\text{Cl}^-$  dans le produit pour ces deux expériences, montrent que la déminéralisation de l'hydrolysats est limitée par les pertes en acides aminés. En effet, il y a une concentration finale limite en  $\text{NaCl}$  qu'on ne pourra pas dépasser sans pertes importantes en acides aminés. Toutefois, on remarque sur ces mêmes figures et sur le tableau IV qu'avec une déminéralisation à pH voisin de 6, nous pouvons atteindre une concentration finale en  $\text{NaCl}$  plus faible que celle obtenue à pH acide, et ceci avec des pertes moins importantes en acides aminés basiques et amphotères qui possèdent des  $\text{pH}_i$  élevés .

**Tableau IV** :Effet du pH de l'hydrolysats sur les pertes (%) en acides aminés lors de la déminéralisation sur micropilote et sur le pilote P1 avec les membranes AMV-CMV.

Acides Aminés	Déminéralisation sur le micropilote		Déminéralisation sur le pilote P <sub>1</sub>	
	pH=2.6	pH=6	pH=2.6	pH=6
Asp	9.79	0	14.67	21.27
Ser	5.51	0	30.42	17.00
Glu	0	0	15.73	22.70
Gly	15.6	5.89	40.58	-
His	41.37	54.33	74.84	63.88
Arg	53.01	18.94	100	39.76
Thr	0	0	27.93	21.79
Ala	9.96	0	39.44	23.03
Pro	2.35	0	24.07	20.75
Cys	0	0	5.5	12.85
Tyr	0	0	16	20
Val	0	0	19.62	10.61
Met	-	0	93.96	0.8
Lys	43.54	11	52.57	31.66
Iso	1.58	0	22	-
Leu	0	0	17.72	20.78
Phe	0	0	0	0
[Na <sup>+</sup> ] finale	0.49	0.34	0.26	0.25
[Cl <sup>-</sup> ] finale	0.38	0.32	0.20	0.20
Volume initial	100 ml	100 ml	500 ml	500 ml

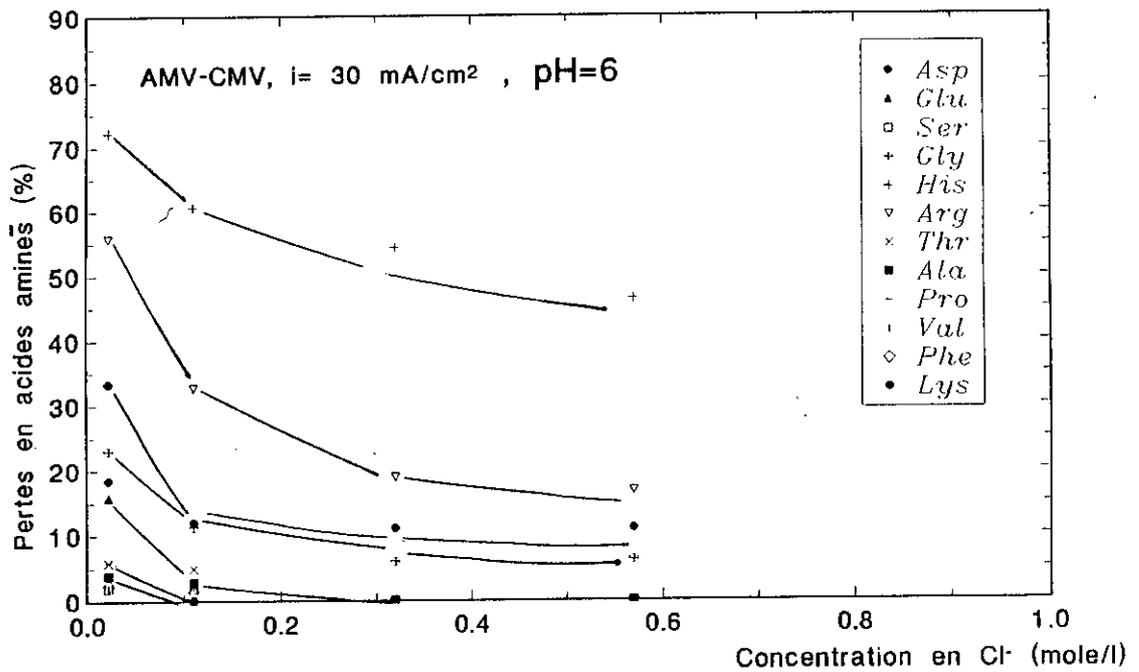


Figure 20: Effet de la concentration finale en  $\text{Cl}^-$  sur les pertes en acides aminés au cours de la déminéralisation sur le micropilote.

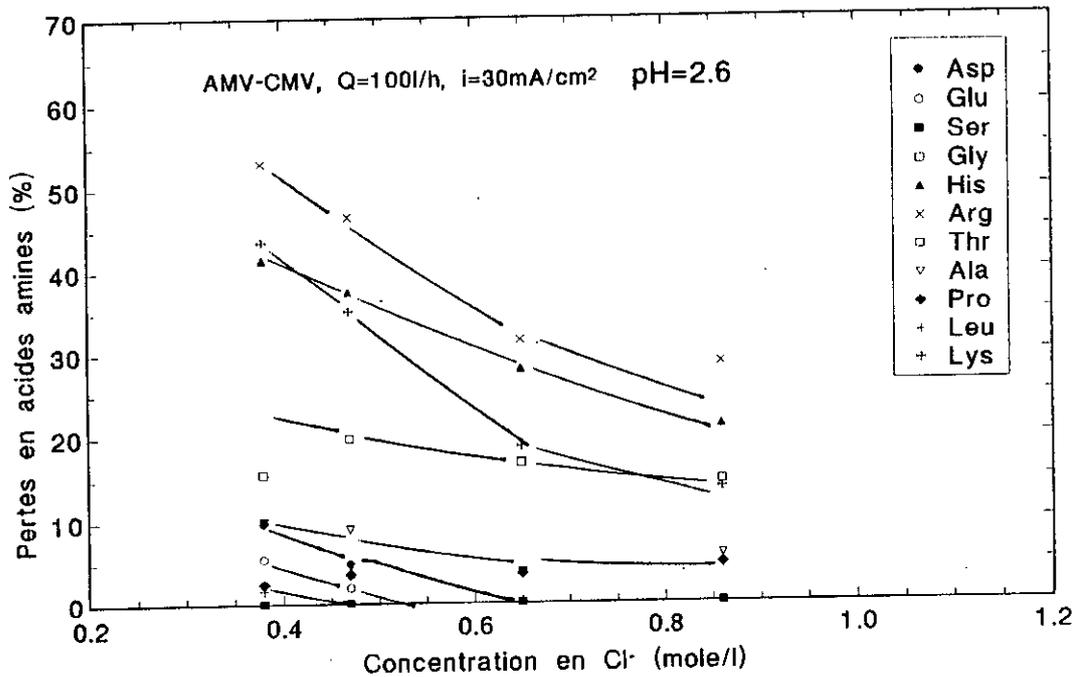


Figure 21: Effet de la concentration finale en  $\text{Cl}^-$  sur les pertes en acides aminés lors de la déminéralisation sur le micropilote.

Une déminéralisation sur P1 avec régression de la densité du courant a été réalisée à pH =6, cette expérience a été arrêtée lorsque la concentration finale en Cl<sup>-</sup> dans le produit est égale à la concentration limite ( C=0.3-0.4 M) déterminée sur la figure 20. Les résultats de cette expérience sont présentés sur le tableau V.

**Tableau V:** Résultats de la déminéralisation sur le pilote P<sub>1</sub> avec les membranes AMV-CMV et à pH=6

Acides aminés	[AA] <sub>0</sub> (mmoles/l)	[AA] <sub>f</sub> (mmoles/l)	N <sub>0</sub> (mmoles)	N <sub>f</sub> (mmoles)	pertes (%)
Asp	38.9	36.1	19.45	14.44	25.75
Ser	21.2	21.65	10.6	8.66	18.30
Glu	25.1	24.4	12.55	9.76	22.23
Gly	24.55	26.2	12.27	10.4	15.24
His	17.45	15.35	8.72	6	31.19
Arg	8.8	9.5	4.4	3.48	20.90
Thr	17.15	18.35	8.57	7.34	14.35
Ala	44.7	44.85	22.35	17.94	19.73
Pro	12.9	13.7	6.45	5.48	15.03
Cys	0.9	2.25	0.45	0.9	2
Tyr	3.1	7.95	1.55	3.18	-
Val	28.7	30.95	14.35	12.38	13.72
Met	4.95	6.05	2.47	2.42	
Lys	29	29.25	14.5	11.7	19.31
Iso	0.25	1.35	0.125	0.54	
Leu	37.9	41.25	18.95	16.5	
Phe	12.35	16.95	6.175	6.78	
[Cl <sup>-</sup> ]	2.04	0.36	1020	144	86
Volume	500 ml	400 ml			

L'ensemble des résultats obtenus lors de la déminéralisation des hydrolysats chimiques nous a permis de constater l'effet du pH de produit, de la concentration finale en NaCl et de la densité de courant sur les pertes en acides aminés au cours de cette opération. Les pertes les plus faibles sur le pilote de laboratoire(P1) sont obtenues à pH 6, avec regression du courant et à un taux de déminéralisation de 86 % (TableauV). Nous constatons également que les pertes sont moins importantes lors de la déminéralisation sur l'électrodialyseur micropilote. Cela est du au temps de séjour des acides aminés plus long et à la surface importante développée par les membranes dans la cellule de l'électrodialyseur pilote.

# **CHAPITRE VI**

## **EXTRACTION DES ACIDES AMINES**

## VI-1. Etude de l'electro-migration de la glycine, de l'acide glutamique et de la lysine

Nous avons vu dans la partie bibliographique que suivant le caractère acido-basique des acides aminés, l'ensemble de ces derniers est constitué de trois familles :

- Les acides aminés basiques.
- Les acides aminés acides .
- Les acides aminés amphotères.

Afin de pouvoir envisager la séparation en groupes de familles, nous avons choisi un acide aminé pour chacun d'eux ( Gly, Lys, Glu ) et nous avons étudié l'effet du pH sur les capacités d'extraction par électrodialyse. Nous avons ensuite étudié au pH optimisé (pH=6) l'effet de la tension électrique sur l'extraction de l'acide glutamique.

### VI-1-1: Effet du pH

L'extraction de la glycine, de la lysine et de l'acide glutamique est réalisée sur l'électrodialyseur P<sub>1</sub> . Les conditions expérimentales sont décrites ci dessous:

- Membranes : AMV-CMV.
- Compartiment produit : 1 litre de solution à 0.1M de l'acide aminé étudié ( 0.05M pour la lysine ).
- Compartiment saumure : 1 litre de solution de NaCl 10<sup>-2</sup> M.
- Compartiments électrodes : 1,5 litres de la solution Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M.
- Tension électrique : U = 15 Volts

Le pH dans le compartiment produit est fixé par ajout d'une solution de soude (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl). Les concentrations en acides aminés sont déterminées par colorimétrie à l'aide de la ninhydrine ( $\lambda=570$  nm).

### Résultats et Interprétation:

Au cours de ces expériences, nous avons suivi la variation de la concentration en acides aminés dans le compartiment produit et saumure. Les résultats présentés sur les figures 22 à 27 montrent que l'extraction d'un acide aminé par électrodialyse est dépendant du pH de milieu dans lequel il se trouve.

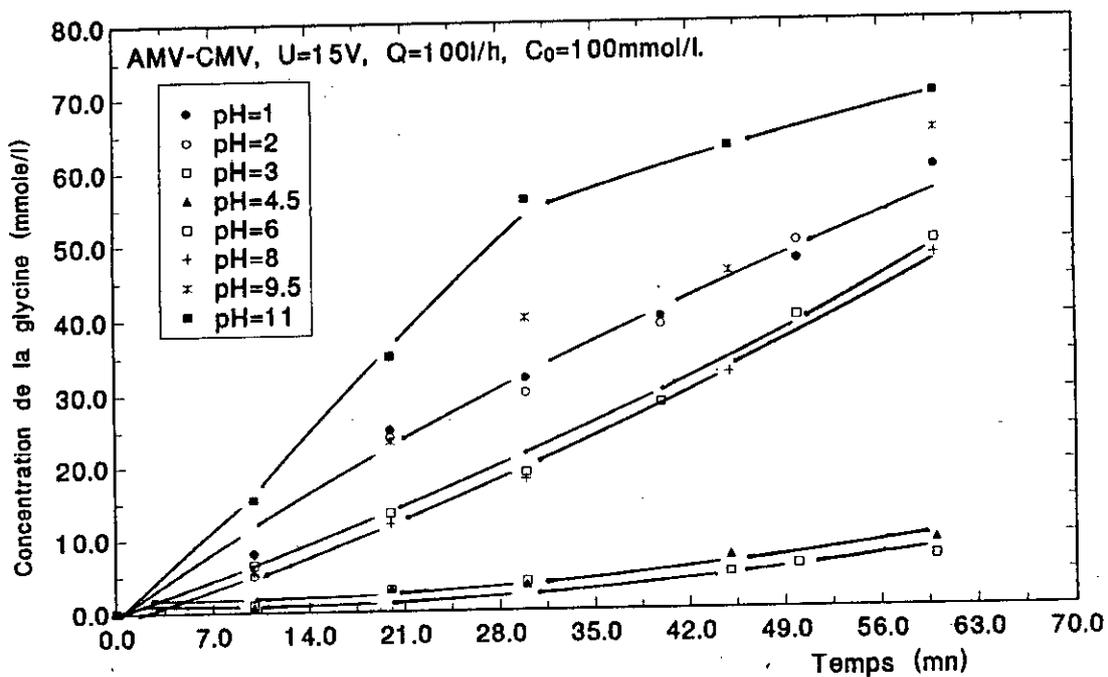


Fig22: Effet du pH sur l'évolution de la concentration de la glycine dans le concentrat lors de l'extraction par l'électrodialyseur P1

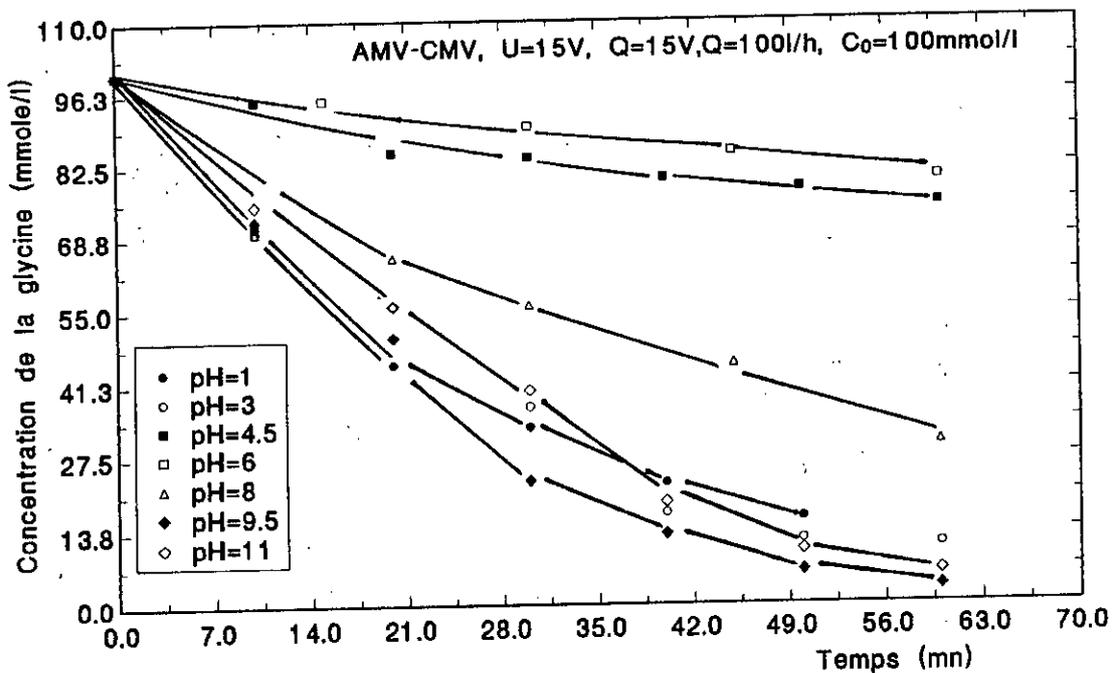


Fig23: Effet du pH sur l'évolution de la concentration de la glycine dans le compartiment produit lors de l'extraction par le l'électrodialyseur P1.

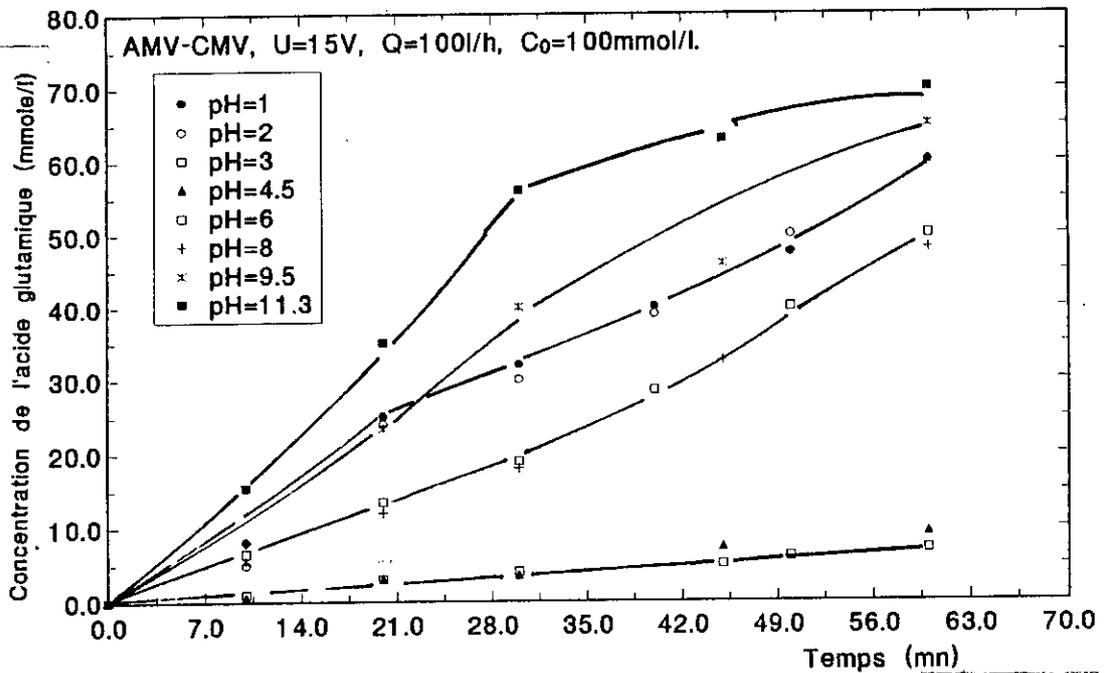


Fig 24: Effet du pH sur l'évolution de la concentration de l'acide glutamique dans le concentrat lors de l'extraction par électrodialyseur P1

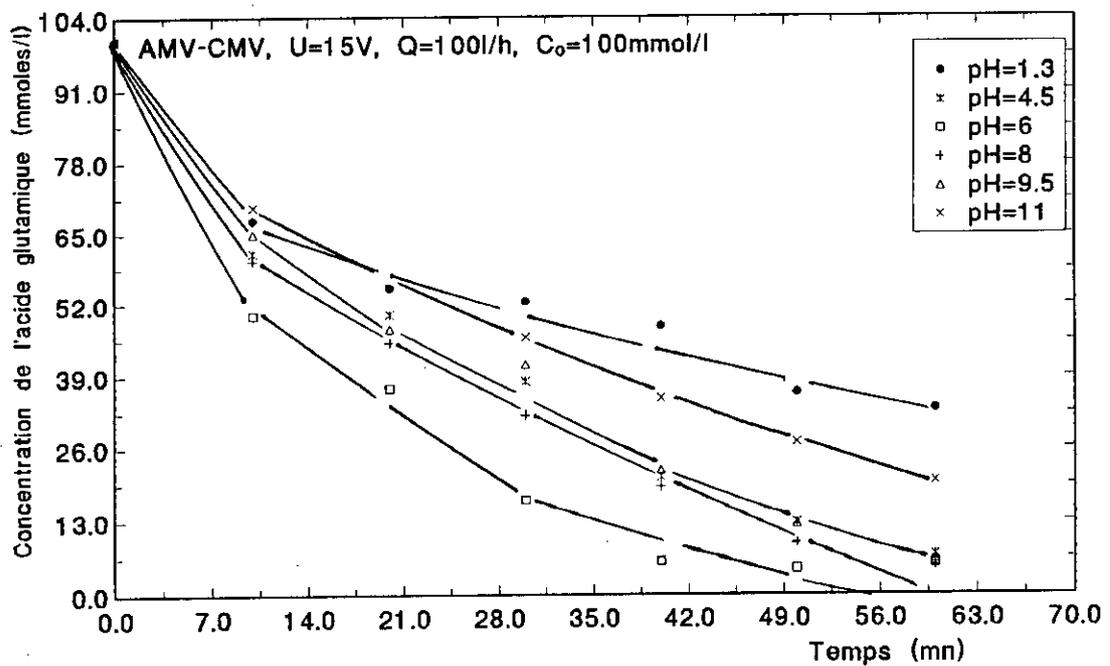


Fig 25: Effet du pH sur l'évolution de la concentration de l'acide glutamique dans le compartiment produit lors de l'extraction par électrodialyseur P1

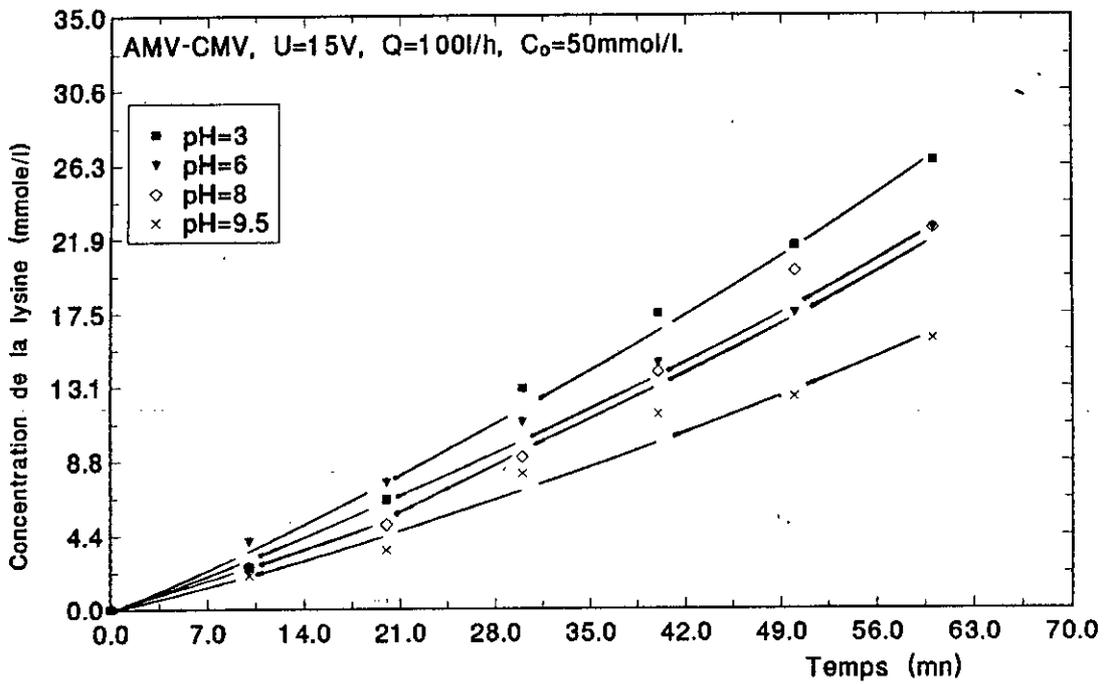


Fig26: Effet du pH sur l'évolution de la concentration de la lysine dans le compartiment concentrat lors de l'extraction par l'électrodialyseur P1

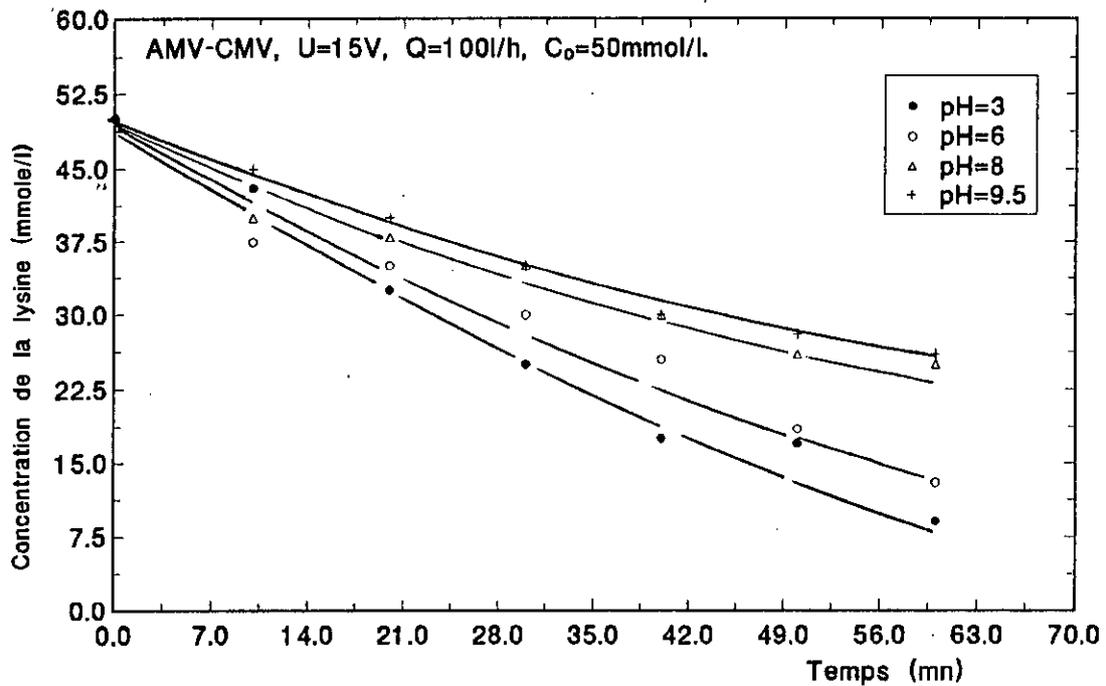


Fig 27: Effet du pH sur l'évolution de la concentration de la lysine dans le compartiment produit lors de l'extraction par l'électrodialyseur P1

Afin de pouvoir interpréter ces résultats, nous avons déterminé les flux transmembranaires, les rendements d'extractions, les taux d'appauvrissement, les taux de pertes et les rendements faradiques correspondant à chaque extraction.

**a/ calcul des flux transmembranaires:**

Le flux transmembranaire est défini comme étant le nombre de moles d'acides aminés transportés à travers la membrane par unité de temps et de surface de la membrane.

A partir des pentes des droites représentant l'évolution des concentrations en acides aminés dans la saumure (fig 22, 24 et 26), nous avons calculé les flux transmembranaires pour chaque valeurs du pH ( figure 28).

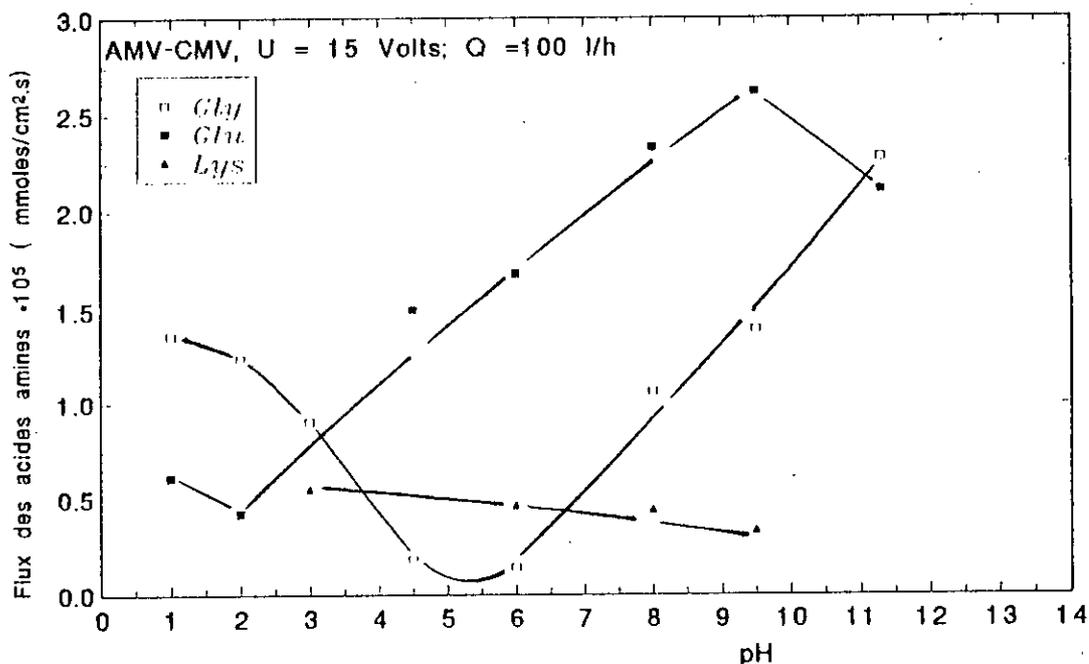


Figure28: Evolution du flux des acides aminés en fonction du pH de diluat lors de l'extraction par l'électrodialyseur pilote (P1).

Pour interpréter l'évolution du flux en fonction du pH de diluat, nous allons schématiser l'état du système solution -membrane à différents domaines de pH pour les trois acides aminés extraits :

	Solution 1(diluat)		Solution 2 (concentrat)
pH Basiques	Glu <sup>-</sup> Lys <sup>-</sup>	MEI →	Na <sup>+</sup>
	Na <sup>+</sup> Glu <sup>-</sup> Lys <sup>0</sup>		Cl <sup>-</sup>
	OH <sup>-</sup> Lys <sup>+</sup> Gly <sup>-</sup> Gly <sup>0</sup>		
pH Neutres	Glu <sup>-</sup> Lys <sup>+</sup> Gly <sup>-</sup>	MEI →	Na <sup>+</sup>
	Glu <sup>0</sup> , Lys <sup>0</sup> Gly <sup>0</sup>		Cl <sup>-</sup>
	Gly <sup>+</sup>		
pH Acides	H <sup>+</sup> Gly <sup>-</sup> Lys <sup>+</sup> Glu <sup>+</sup>	MEI →	Na <sup>+</sup>
	Cl <sup>-</sup> Gly <sup>0</sup> Lys <sup>++</sup> Glu <sup>0</sup>		Cl <sup>-</sup>
	Glu <sup>-</sup>		

Sous l'effet conjoint du potentiel chimique et de la différence de potentiel électrique appliqué, les ions contenus dans la solution 1 vont se déplacer vers la solution 2 en traversant la membrane échangeuse d'ions. Le flux traversant cette membrane est la somme du flux de diffusion et du flux d'électro-migration. Il s'exprime en chaque point de la membrane par :

$$J = -U_i^m C_i^m RT \ln a_i^m / dx - U_i^m Z_i C_i^m dQ^m / dx$$

avec

$U_i^m$  : la mobilité ionique du soluté dans la membrane.

$C_i^m$  : la concentration du soluté dans la membrane.

$a_i^m$  : l'activité du soluté dans la membrane

$Q^m$  : potentiel électrique dans la membrane.

R : Constante des gaz parfaits.

T : Température ( °K )

Toutefois, l'étude effectuée par D. MARTINEZ [21] sur la diffusion et l'électrodifusion de l'alanine montre que les flux d'électro-diffusion sont très supérieurs à ceux dus à la simple diffusion de l'acide aminé, le flux d'électromigration peut donc être considéré comme seul responsable du transfert des ions :

$$J = - U_i^m Z_i C_i^m dq^m / dx$$

Cette expression montre que le flux de transfert des acides aminés chargés est dépendant de leurs concentrations dans la membrane et de la valeur du potentiel électrique appliquée. Ce dernier étant maintenu constant (  $V = 15$  Volts), le flux dépend donc uniquement de la concentration ionique des acides aminés au sein de la membrane .

La concentration des acides aminés à l'intérieure de la membrane est en relation avec leur concentration ionique dans le produit ( diluat ), la forme des courbes représentant les flux en fonction du temps (fig.30) traduit donc la distribution ionique des acides aminés en fonction du pH du milieu dans lequel ils se trouvent . Cette figure montre que chaque courbe des trois acides aminés passe par un minimum, ces valeurs minimales correspondent aux valeurs du pH voisines des pH isoélectriques de ces acides aminés. En effet, pour un pH de produit voisin de  $pH_i$  de l'acide aminé, ce dernier se trouve pratiquement sous forme neutre et sa concentration ionique est très faible, par conséquent la valeur du flux est minimale.

Cependant, on remarque que la valeur minimale du flux d'électro-diffusion de la glycine est plus faible que celle de l'acide glutamique et de la lysine qui possèdent respectivement un  $pH_i$  dans le domaine du pH acide ( $pH=3$ ) et basique ( $pH=9.5$ ). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'électrodifusion des ions  $OH^-$  et  $H_3O^+$  qui déplace l'équilibre acido-basique des acides aminés vers la formation de la forme chargée de ces derniers. Il est donc plus facile de maintenir la glycine dans le compartiment diluat.

On peut déduire ainsi à partir de ces courbes que la détermination d'une valeur adéquate du pH de diluat permettrait d'envisager une séparation en groupes de familles

d'un mélange d'acides aminés. En effet, pour un pH voisin du  $pH_i$  de la glycine, le flux de ce dernier est très faible, par contre, le flux de l'acide glutamique et celui de la lysine sont importants. Il est donc possible en opérant à pH voisin du  $pH=6$ , de bloquer la famille des amphotères ( $pH_i=6$ ) dans le compartiment produit et de transférer les autres familles vers les compartiments concentrés.

### b/ Calcul des taux d'appauvrissement, des rendements d'extraction et des taux de pertes en acides aminés:

Les taux d'appauvrissement et les rendements d'extraction présentés respectivement sur les figures 29 et 30, correspondent aux quantités d'acides aminés perdues dans le diluat et aux quantités retrouvées dans le concentrat à la fin de l'expérience, par rapport aux quantités introduites initialement dans le produit.

Le taux de pertes présenté sur la figure 31 correspond à la différence entre la quantité en acides aminés perdue dans le diluat et celle retrouvée dans le concentrat par rapport à la quantité perdue dans le diluat.

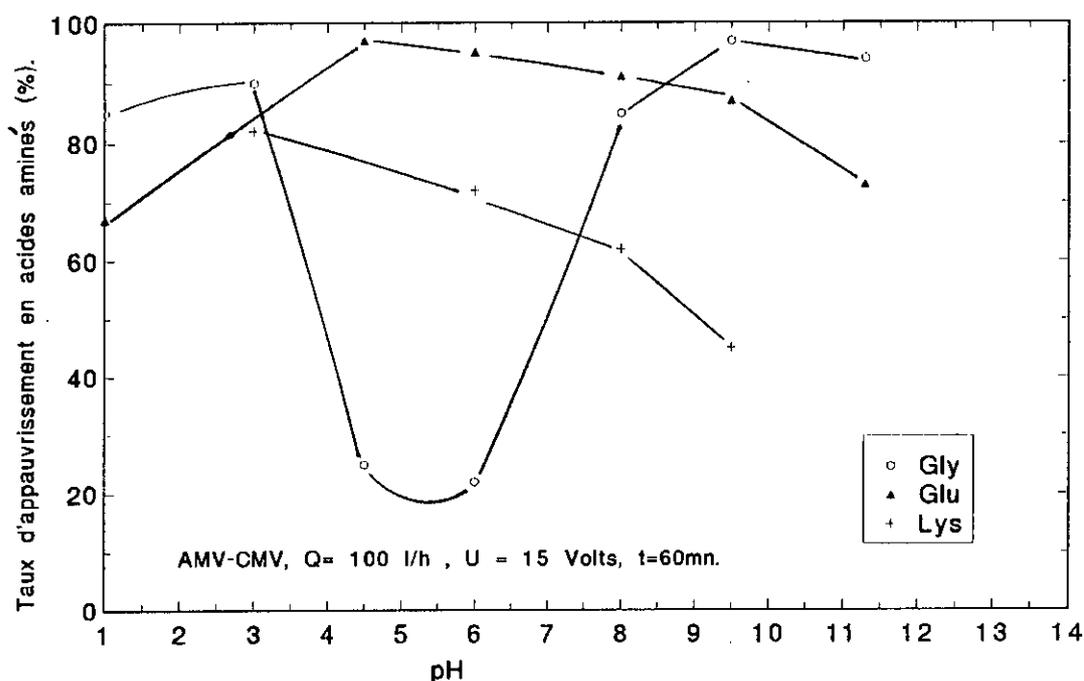


Figure29: Evolution du taux d'appauvrissement en acides aminés dans le diluat en fonction du pH au cours de l'extraction par le pilote P1.

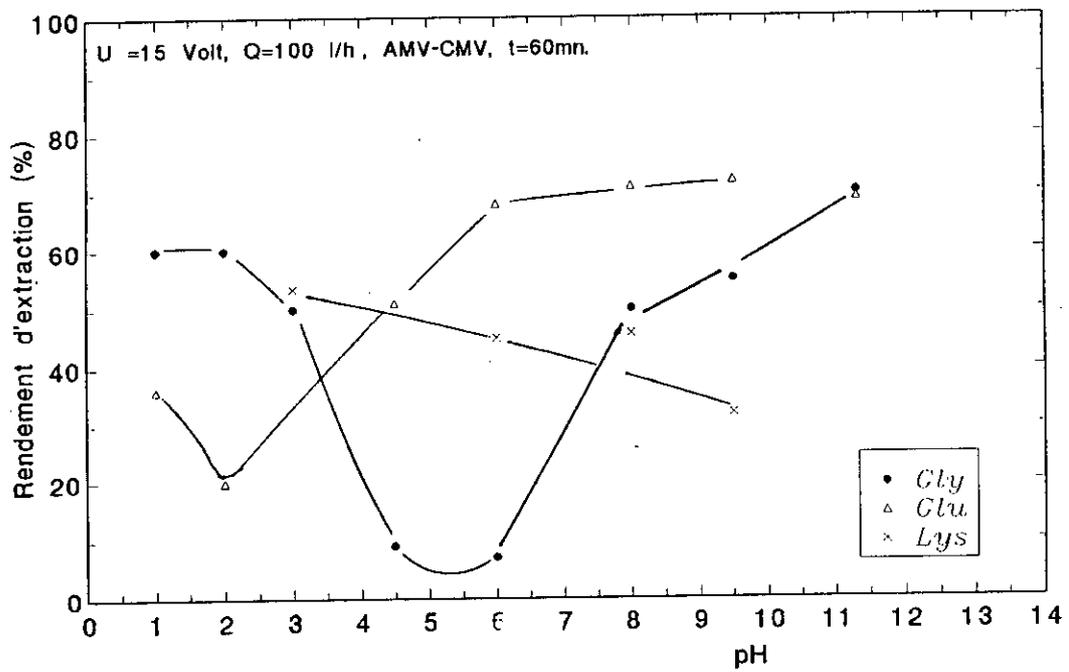


Figure 30 : Evolution du rendement d'extraction par le pilote P1 des acides aminés en fonction du pH de diluat

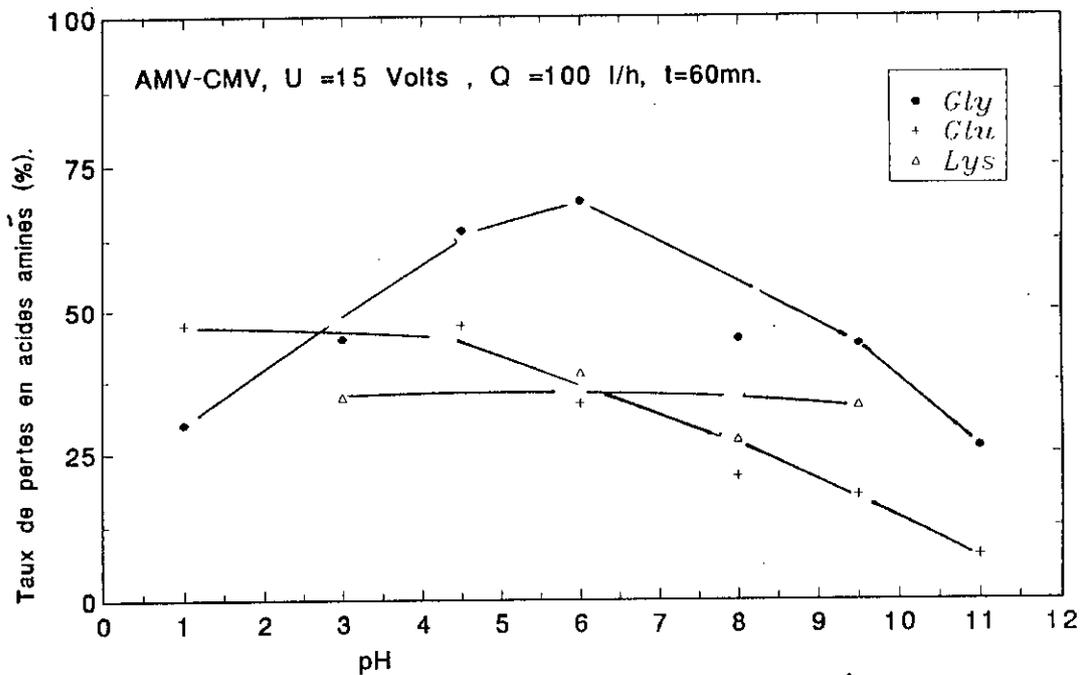
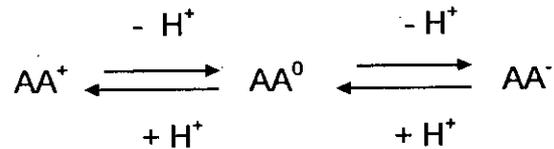


Figure 31: Evolution du taux de pertes des acides aminés en fonction du pH de diluat au cours de l'extraction sur le pilote P1.

Nous constatons à partir de ces figures (29-31) que la totalité des acides aminés perdus dans le diluat ne se retrouve pas dans le concentrat, il y a eu donc probablement adsorption ou blocage stérique de ces derniers au niveau des membranes .

Ces pertes pourraient être favorisées par la transformation à l'intérieure de la membrane, des acides aminés chargés en acides aminés neutres : :



La concentration en acides aminés chargés à l'intérieur de la membrane est plus élevée que celle des acides aminés neutres et l'équilibre sera déplacé vers la formation de ces derniers qui seront bloqués par les membranes.

La figure 31 montre que les quantités disparues pour les trois acides aminés étudiés sont maximales au voisinage de leur pH isoélectriques.

Ces figures nous permettent également de déduire que l'extraction de la glycine et de l'acide glutamique est plus intéressante en milieu basique qu'en milieu acide, cela pourrait être dû à la faible perméabilité aux acides aminés de la membrane échangeuse de cations ( CMV ) utilisée .

La forte mobilité des ions  $H_3O^+$  et la polarisation de leur concentration au niveau de la couche limite pourrait participer aussi au ralentissement de cette extraction en déplaçant l'équilibre vers la formation des acides aminés neutres :



En effet, la polarisation de la concentration en ions  $H_3O^+$  provoque une augmentation du pH au voisinages des membranes en s'approchant du  $pH_i$  de l'acide aminé, notamment pour l'acide glutamique qui possède un  $pH_i$  acide ( $pH_i=3$ ).

### C/ Calcul des rendements faradiques:

Le rendement faradique traduit l'efficacité du procédé d'électrodialyse considéré, c'est le rapport de la quantité d'électricité théoriquement nécessaire à la quantité réellement dépensée pour transférer une quantité donnée d'espèces chargées. Dans le cas d'un ion monovalent, le rendement faradique est donné par la relation suivante:

$$R_f = \frac{FV \Delta C}{n I \Delta t}$$

Où  $V$  est le volume du circuit de concentrat (en litre),  $\Delta C$  est la variation de la concentration du circuit pendant le temps  $\Delta t$  (en  $\text{mol l}^{-1}$ ),  $I$  est l'intensité appliquée (en Ampères),  $\Delta t$  la durée d'électrodialyse (en secondes) et  $n$  le nombre de cellules.

Nous constatons sur la figure 32 que Les rendements faradiques des trois acides aminés extraits à différentes valeurs de pH, présentent des sommets au voisinage de la neutralité. Ceci est dû au fait que dans ce domaine du pH, les concentrations en ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  et  $\text{OH}^-$  sont très faibles et que le courant est majoritairement transporté par les acides aminés. Toutefois, la forte mobilité des ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  et  $\text{OH}^-$  provoquent une chute considérable du rendement faradique dans les domaines de pH acide et basique.

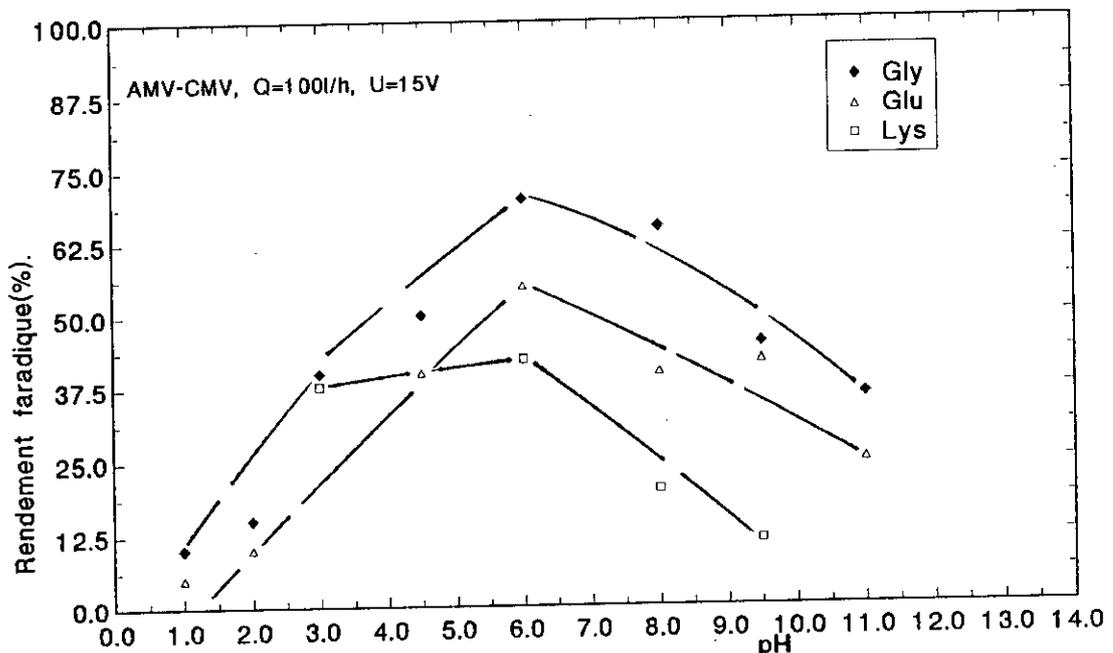
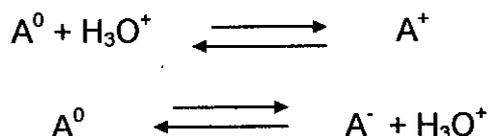


Figure 32: Evolution de rendement faradique des acides aminés  
Lors de l'extraction par l'électrodialyseur P1

#### d/ Evolution du pH:

L'ajout d'une solution acide ou alcaline pour maintenir le pH du diluat constant était nécessaire lors de l'extraction par électrodialyse des trois acides aminés étudiés.

Cette apport en ions  $\text{OH}^-$  et  $\text{H}_3\text{O}^+$  s'explique d'une part par l'électrodifusion de ces derniers, mais aussi par le déplacement de l'équilibre acido-basique de l'acide aminé extrait.



L'extraction en continu des acides aminés chargés déplace l'équilibre vers la formation de ces derniers, par conséquent, l'apport en ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  ou  $\text{OH}^-$  est nécessaire.

#### VI-1-2. Effet de la tension sur l'extraction de l'acide glutamique:

Nous avons réalisé des expériences d'extraction de l'acide glutamique à pH de produit constant en variant la tension électrique de 5 à 33 volts. Les conditions expérimentales utilisées sont décrites ci-dessous:

- Electro dialyseur : Pilote P1
- Membranes : AMV-CMV
- Compartiment produit : 1 litre de sol. 0.1M d'acide glutamique
- Compartiment saumure : 1 litre de la solution  $\text{NaCl } 10^{-2}$
- pH dans le compartiment produit : 6

#### Résultats et discussion:

Les figures 33 et 34 montrent que l'évolution de la concentration en acide glutamique respectivement dans le compartiment produit et saumure, dépend de la valeur du potentiel électrique appliqué. Nous constatons sur la figure 35 que l'évolution du flux transmembranaire de l'acide glutamique en fonction de la tension est lente lorsque les valeurs de cette dernière sont inférieures à 10 Volts. Cela pourrait s'expliquer par la faible mobilité ionique de l'acide glutamique dans les membranes utilisées. Pour des valeurs de tension comprises entre 10 et 25 Volts, l'évolution du flux est linéaire. Au delà, Le palier observé est dû à la polarisation de la concentration de

l'acide glutamique au niveau de l'interface membrane - solution. Par conséquent, le flux tend vers sa valeur maximale. Nous constatons également que l'augmentation de la tension électrique appliquée permet d'améliorer le rendement d'extraction de l'acide glutamique (figure36); les pertes de cet acide aminé au niveau des membranes sont donc réduites.

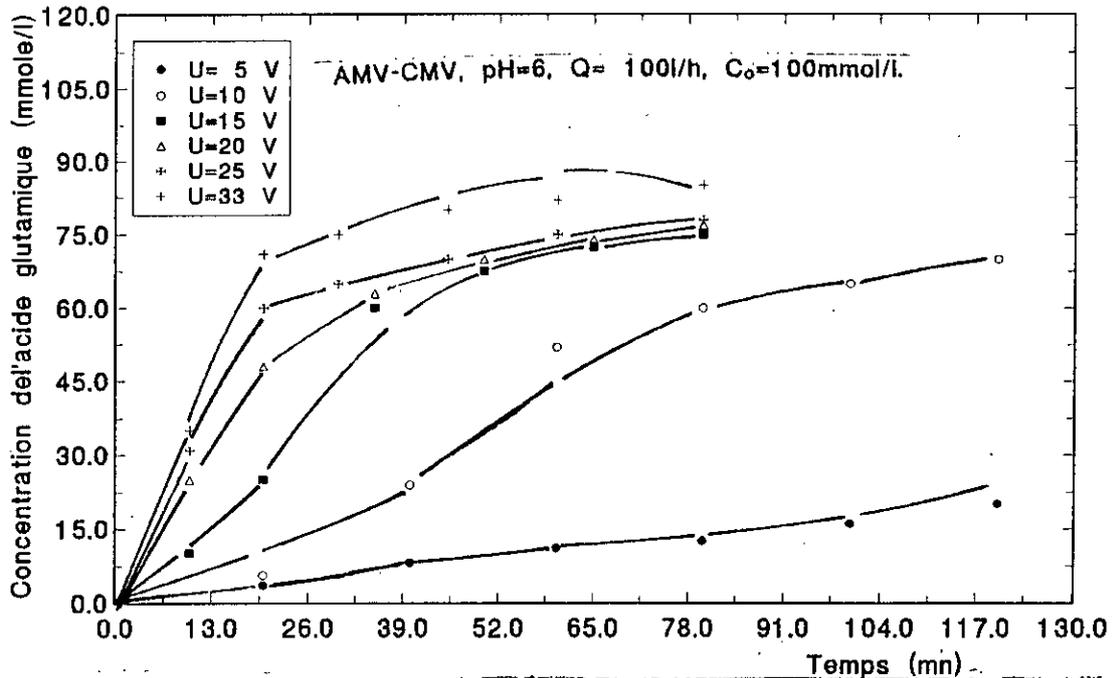


Fig 33: Effet de la tension sur l'évolution de la concentration de l'acide glutamique dans le concentrat lors de l'extraction par le pilote P1

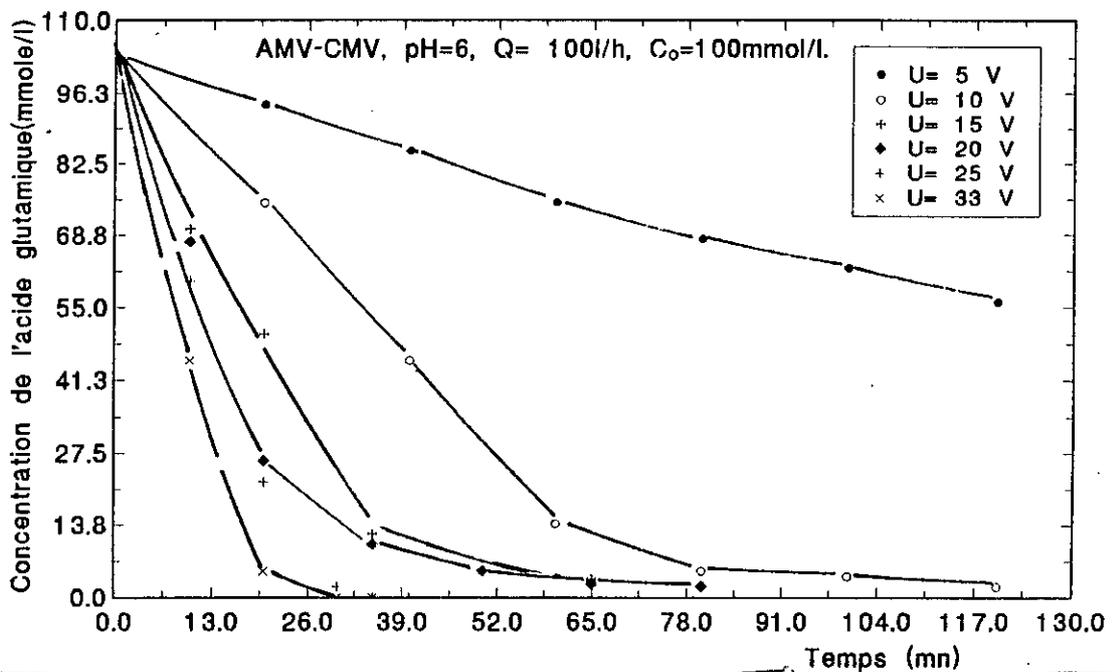


Fig34: Effet de la tension sur l'évolution de la concentration de l'acide glutamique dans le diluat lors de l'extraction par le pilote P1

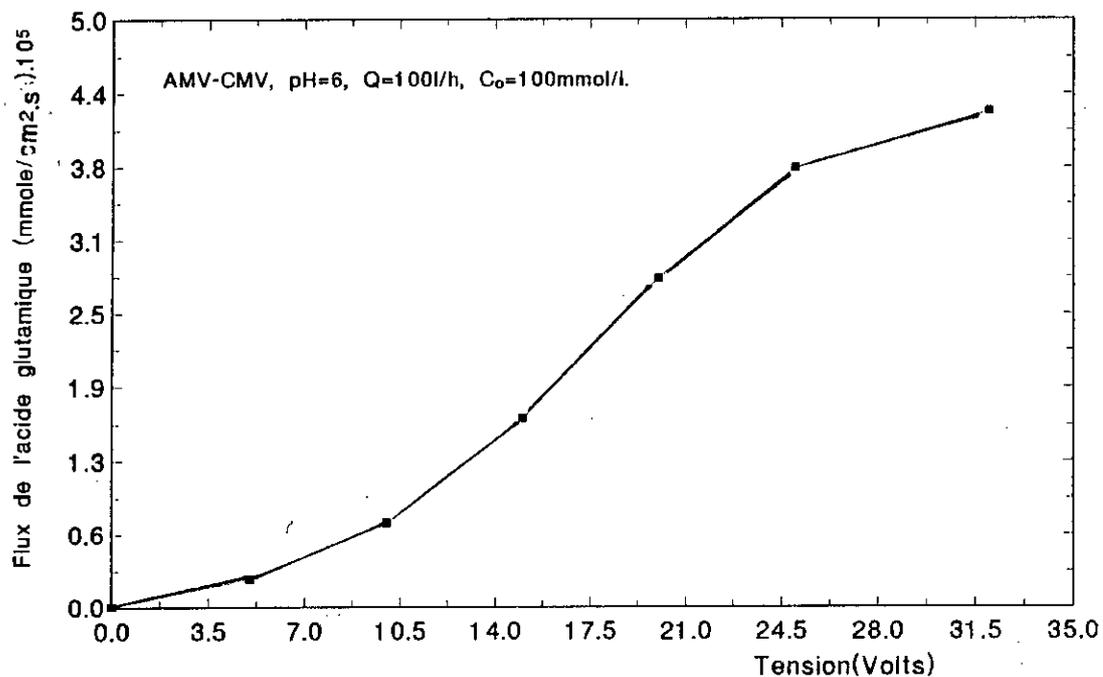


Fig35: Effet de la tension électrique sur le flux de l'acide glutamique lors de l'extraction par l'électrodialyseur P1.

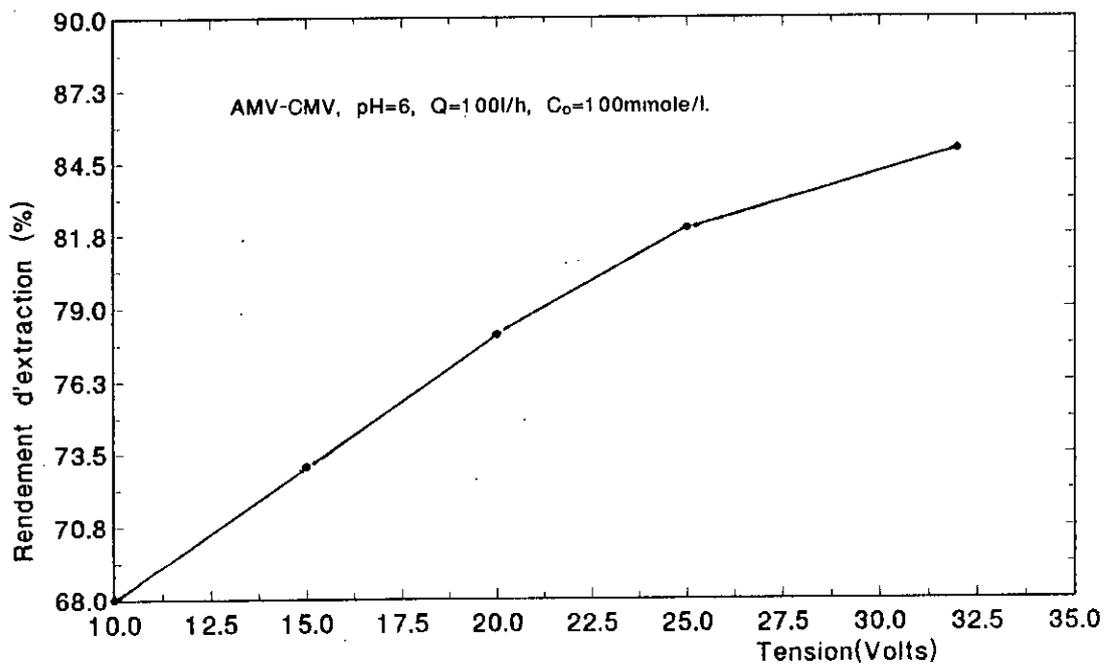


Figure36: Effet de la tension électrique sur le rendement d'extraction de l'acide glutamique par l'électrodialyseur P1.



#### **Pilote de laboratoire P4:**

- Compartiments Diluats:           D<sub>1</sub>     : V<sub>D1</sub> = 2000 ml de la solution NaCl 2M.  
  D<sub>2</sub>     : V<sub>D2</sub> = 1100 ml de l'hydrolysate.
- Compartiments Concentrats C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> : V<sub>C1</sub> = V<sub>C2</sub> = 1000 ml de sol. NaCl 10<sup>-2</sup>M.
- Densité de courant                         : 3mA/cm<sup>2</sup>; 7.5 mA/cm<sup>2</sup> et 20 mA/cm<sup>2</sup>

Les expériences sont arrêtées lorsque la tension appliquée atteint sa valeur maximale (U= 35 volts).

#### **Résultats et discussion:**

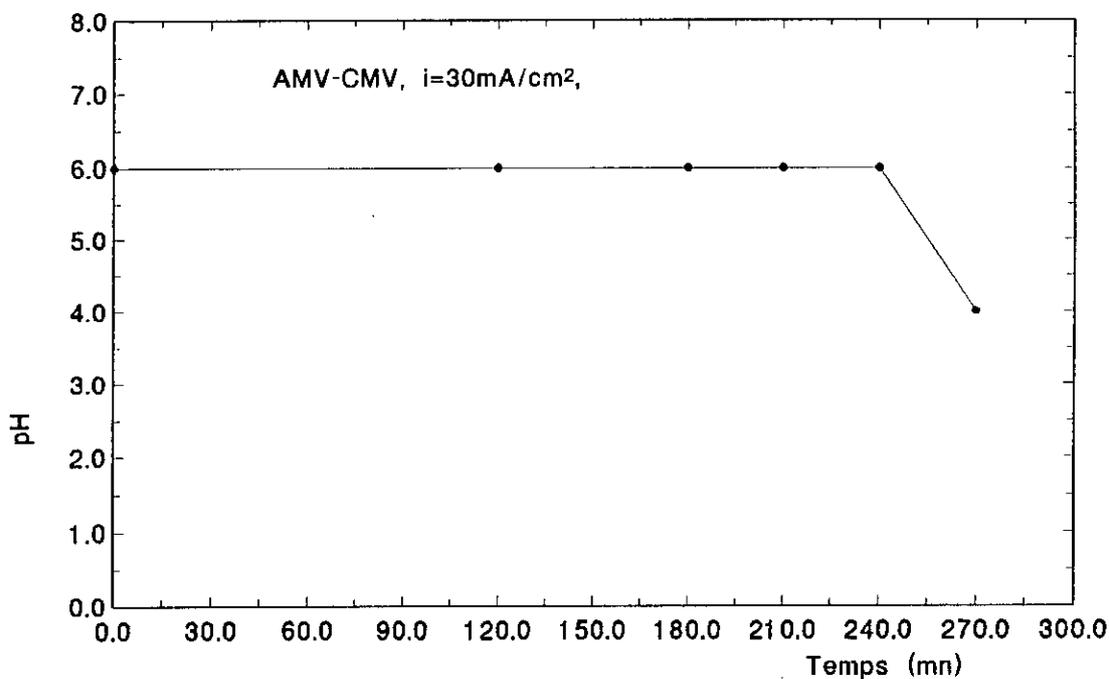
Les concentrations en acides aminés dans l'hydrolysate enzymatique de cruor étant très faibles, nous n'avons pas pu passer à l'extraction par électrodialyse. En effet, les acides aminés perdus dans le diluat lors d'un essai d'extraction ne se retrouvent pas dans le concentrat. Par contre, les concentrations élevées dans l'hydrolysate chimiques nous ont permis de réaliser plusieurs extractions.

Lors de la première expérience de séparation des acides aminés sur le micropilote, nous avons constaté que le pH du produit commence à diminuer après un certain temps d'électrodialyse (240mn) (fig.38). Or, la séparation à pH éloigné des p*H*<sub>i</sub> de la famille des amphotères favorise la fuite de ces derniers vers les compartiments concentrats.

Les résultats de cette première séparation exprimés en rendement d'appauvrissement pour les compartiments produit et d'extraction pour les compartiments concentrat sont présentés dans le tableau VI:

**Tableau VI : Résultats de la séparation sur le micropilote avec les membranes AMV-CMV à pH variable et  $i = 30 \text{ mA/cm}^2$**

	Produit No (mmole)	Produit Nf (mmole)	pertes %	C1 (-) Nf (mmole)	C2 (+) Nf (mmole)	Extraction (%)
Asp	6.89	1.97	71.29	-	3.35	48.62
Glu	4.16	1.89	54.56	-	1.33	32.11
Scr	3.69	3.46	1	0.19	-	5.12
Gly	4.22	3.62	15	0.58	-	13.81
His	1.94	0.192	90	1.40	-	72.57
Arg	1.52	0	100	1.023	-	67.30
Thr	3.04	2.8	7.89	0.17	-	5.60
Ala	8.03	7.43	7.37	0.131	-	1.63
Pro	2.36	2.19	6.93	0.029	-	6.89
Tyr	1.1	1.07	2.72	-	-	-
Val	5.20	4.84	6.78	-	-	-
Met	1.04	0.936	9.97	-	-	-
Cys	-	-	-	-	-	-
Iso	-	-	-	-	-	-
Leu	6.92	6.21	10.22	-	-	-
Phe	2.82	2.46	12.5	-	-	-
Lys	4.9	0	100	3.32	-	67.75
vol	200 ml	175 ml		115 ml	110 ml	



**Figure 38: Evolution du pH de Hydrolysats lors de la séparation des acides aminés en groupes de familles sur le micropilote.**

La figure 39 montre que le nombre de moles en acides aminés amphotères reste pratiquement constant dans le compartiment diluat lors de la séparation sur le micropilote. Par contre, sur la figure 40, nous constatons un appauvrissement important en acides aminés acides et basiques dans ce compartiment (diluat). Cette dernière montre également qu'au moment de la variation du pH au temps de 240mn, les concentrations en acides aminés chargés (acides et basiques) restent encore importantes. La poursuite de l'extraction et le maintien du pH voisin de 6 sont donc nécessaires. Pour ce faire, nous avons procédé de deux façons différentes :

- Ajout de NaOH ( 4M ) au cours de la manipulation.
- Réduction de la densité de courant au cours de la séparation.

Nous constatons sur les tableaux VII que l'ajout de NaOH a favorisé le transfert de certains acides aminés amphotères (Ser, Gly et Leu) et basique ( His ) vers le compartiment concentrat C<sub>2</sub>.

**Tableau VII** : Résultats de la séparation sur le micropilote avec les membranes AMV-CMV, pH=6, avec ajout du NaOH et  $i=30 \text{ mA/cm}^2$

Acides aminés	Produit Ni (mmoles)	Produit Nf (mmoles)	Pertes %	Nf (mmoles) C1(-)	Nf (mmoles) C2(+)	Extraction (%)
Asp	6.89	2.72	60.52	-	1.96	28.57
Glu	4.16	2.41	42.06	-	0.54	12.95
Ser	3.69	3.06	17.07	-	0.088	2.3
Gly	4.22	3.48	17.53	0.54	0.13	15.8
His	1.94	0.27	85.97	1.45	0.15	82.54
Arg	1.52	0	100	1.003	-	65.980
Thr	3.04	2.63	13.48	0.2	-	-
Ala	8.03	6.83	14.94	0.2	-	2.4
Pro	2.36	2.00	15.25	-	-	8.4
Tyr	1.01	0.23	79.09	-	-	-
Val	5.20	4.40	15.38	-	-	-
Met	1.04	0.4	61.53	-	-	-
Cys	-	0.2	-	-	-	-
Iso	0.25	0.21	16	-	-	-
Leu	6.92	6.08	12.13	0.035	-	0.5
Phe	2.82	2.39	15	-	-	-
Lys	4.9	0	100	3.091	-	63.08
Vf	200ml	170ml		115ml	110ml	

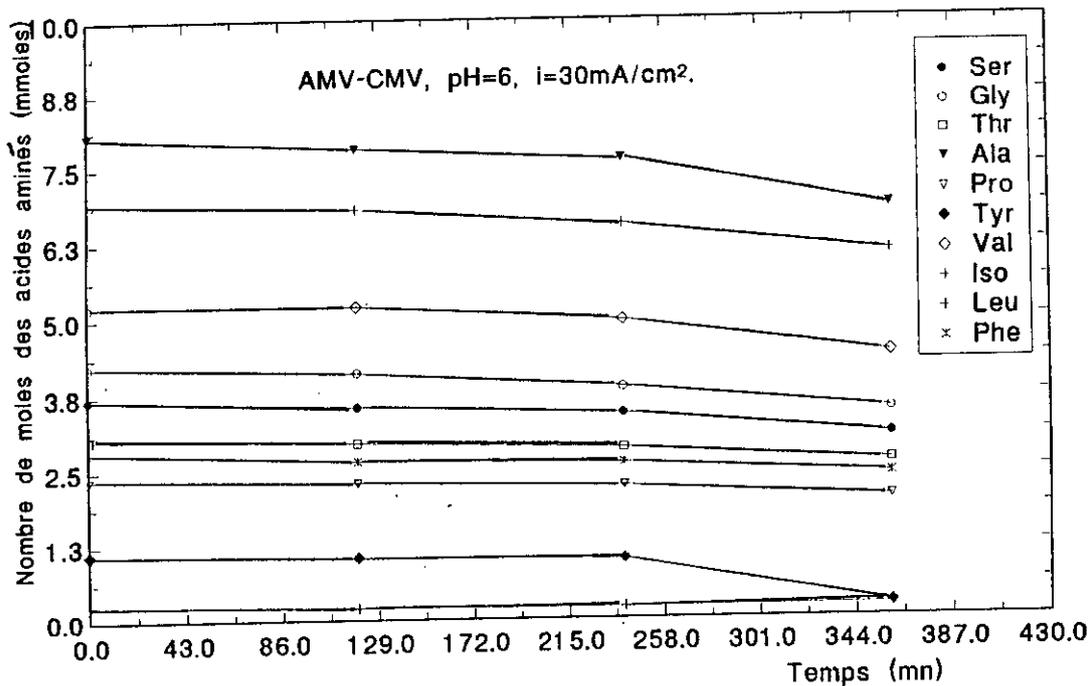


Figure39: Evolution du nombre de moles des acides aminés amphotères dans le compartiment produit lors de la séparation sur le micropilote.

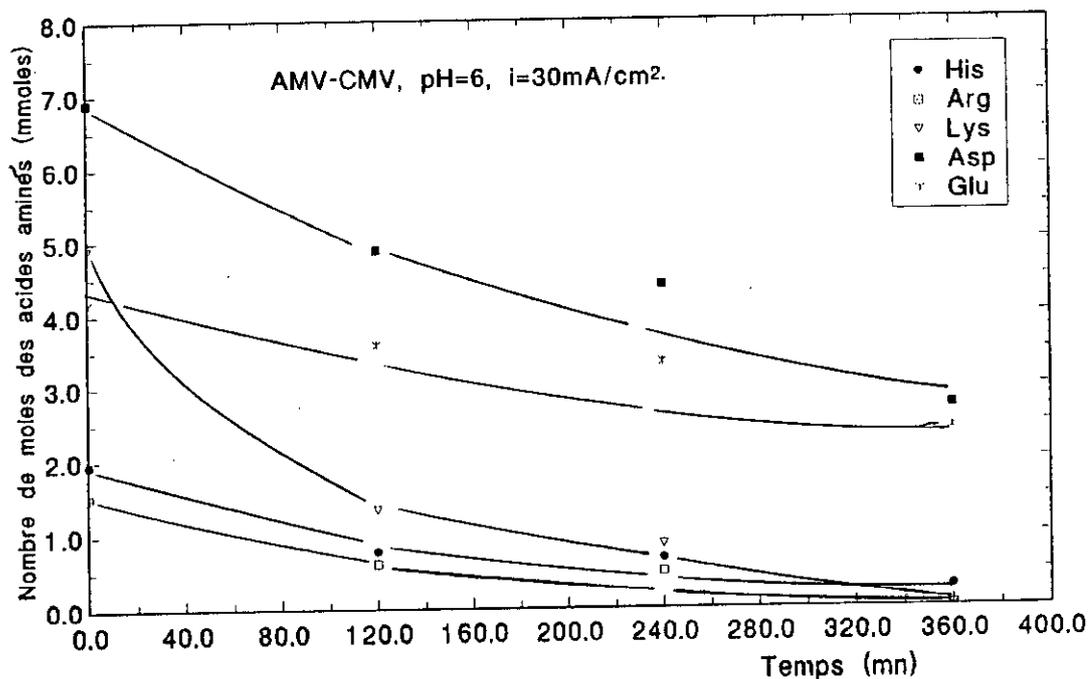


Figure40: Evolution du nombre de moles des acides aminés basiques et acides dans le compartiment diluat lors de la séparation sur le micropilote.

Les résultats présentés sur le tableau VIII montrent que les rendements d'extraction ne sont pas importants lors de la séparation avec régression de la densité de courant.

Le tableau IX présente la composition (%) en acides aminés dans chaque compartiment à la fin de chaque séparation sur le micropilote.

**Tableau VIII** : Résultats de la séparation sur le micropilote avec les membranes AMV-CMV à densité du courant régressive et pH=6.

Acides aminés	Produit N <sub>0</sub> (mmoles)	Produit N <sub>f</sub> (mmoles)	Pertes %	Nf C1(-) (mmoles)	Nf C2(+) (mmoles)	Extraction %
Asp	6.89	4.15	39.76	-	0.766	11.11
Glu	4.16	2.93	29.56	-	0.63	15.14
Ser	3.69	3.13	15.17	0.08	-	2.38
Gly	4.22	3.83	9.24	0.47	-	11.20
His	1.94	-	-	1.12	-	57.35
Arg	1.52	0.49	71.57	0.69	-	45.59
Thr	3.04	2.68	11.84	-	-	-
Ala	8.03	6.62	17.55	0.132	-	1.6
Pro	2.36	2.23	5.50	0.187	-	7.92
Tyr	1.1	0.36	67.27	-	-	-
Val	5.2	4.48	13.84	-	-	-
Met	1.04	0.19	81.73	-	-	-
Cys		-	-	-	-	-
Iso	0.25	-	-	-	-	-
Lcu	6.92	6.15	11.12	0.033	-	0.47
Phe	2.82	2.26	19.85	--	-	-
Lys	4.9	1.54	68.57	1.69	-	34.48
Vol.	200ml	170ml		112ml	118ml	

**Tableau IX :** Composition( %) des différents compartiments lors de la séparation sur le micropilote avec les membranes AMV-CMV

Acides Aminés	Produit	Séparation à pH variable			Séparation avec ajout de NaOH			Séparation Avec regression du courant		
	Produit t = 0	Produit Pf	C1f (-)	C2f(+)	Pf	C1 f (-)	C2f (-)	Pf	C1f (-)	C2f(+)
Asp	11.86	5.04	-	71.58	7.29	-	68.43	10.1	-	54.8
Glu	7.16	4.83	-	28.41	6.45	-	18.88	7.14	-	45.1
Ser	6.35	8.85	2.77	-	8.20	-	3.07	7.6	1.81	-
Gly	7.26	9.26	8.51	-	9.32	8.31	4.54	9.34	10.68	-
His	3.34	0.49	20.43	-	0.72	22.23	5.24	-	25.45	-
Arg	2.61	0	14.93	-	0	15.38	-	1.19	15.68.	-
Thr	5.23	7.16	2.48	-	7.04	-	-	6.53	-	-
Ala	13.82	19.01	1.91	-	18.3	3.06	-	16.1	3.0	-
Pro	4.06	5.60	0.42	-	5.36	3.06	-	5.43	4.25	-
Tyr	1.89	2.73	-	-	0.61	-	-	0.87	-	-
Val	8.95	12.40	-	-	11.7	-	-	10.7	-	-
Met	1.79	2.39	-	-	1.07	-	-	0.46	-	-
Cys	-	--	-	-	0.54	-	-	-	-	-
Iso	0.43	-	-	-	0.56	--	-	-	-	-
Leu	11.91	15.89	-	-	16.2	0.54	-	15	0.75	-
Phe	4.85	6.29	-	-	6.42	-	-	5.51	--	-
Lys	8.43	0	48.51	-	-	47.40	-	3.75	38.40	-

Il ressort des tableaux X et XI présentant les résultats des trois séparations réalisées sur le P<sub>4</sub> à différentes densités de courant, les remarques suivantes :

- L'extraction des acides aminés acides pour les deux premières densités de courant ( $i=3 \text{ mA} / \text{cm}^2$ ,  $i= 7.5 \text{ mA} / \text{cm}^2$ ) est pratiquement totale, alors que celle des acides aminés basiques est très faible notamment pour l'histidine et l'arginine. Cela pourrait s'expliquer par la faible perméabilité aux acides aminés des membranes échangeuses de cations (CMX Sb) utilisées.
- Les rendements d'extraction des acides aminés basiques sont plus importants pour une densité de courant de  $20 \text{ mA/cm}^2$ . Cela peut s'expliquer par le fait qu'à densité de courant élevée, l'acide aminé est soumis à une force motrice de transfert importante. Cette dernière lui permet de traverser la membrane échangeuse de cations (CMX Sb).

- Les pertes en acides aminés amphotères dans le compartiment produit sont dépendantes de la densité de courant appliquée, les plus faibles sont enregistrées à  $i = 7.5 \text{ mA/cm}^2$ . Nous constatons également qu'elles sont plus importantes que celles enregistrées sur le micropilote. Cela est dû à la différence de surface développée et aussi au long temps de séjour dans la cellule d'électrodialyseur pilote. En effet, ces deux paramètres favorisent la diffusion et l'adsorption des acides aminés.
- Les taux d'extraction des acides aminés amphotères dans les compartiments concentrats sont très faibles, les pertes en acides aminés sont donc plus importantes quand ils se trouvent sous forme neutre. Ces résultats confirment aussi les résultats préalablement obtenus.

**Tableau X** : Effet de la densité du courant sur la séparation des acides aminés sur le pilote P4 avec les membranes Neosepta à pH=6.

Acides Aminés	$i = 20 \text{ mA / cm}^2$			$i = 7.5 \text{ mA / cm}^2$			$i = 3 \text{ mA / cm}^2$		
	APP(%) Pf	EX(%) C1	EX(%) C2	APP(%) Pf	Ex(%) C1	EX(%) C2	APP(%) Pf	EX(%) C1	EX(%) C2
Asp	91.33		75.43	98.45	-	97.78	100		100
Glu	81.96		70.22	94.16	-	96.85	95.58		95
Ser	56.64	4.93	1.14	27.39	2.49	9.26	36.32	6.52	13.94
Gly	64.96	3.12	-	41.88	2.90	-	77.97	4.13	-
His	75.45	24.54	-	46.02	12.23	-	87.92	15	-
Arg	99.29	43.41	-	87.64	22.52		100	32.8	-
Thr	54.11	1.87	0.80	21.81	1	0.82	60.54	1.91	1.54
Ala	41.59	1.81	0.54	17.96	1.70	1.49	51.25	3.81	3.81
Pro	42.36	0.89	-	0.740	0.87	0.84	53.36	2.02	1.29
Tyr	43.33	3.55	-	0	-	-	-	-	-
Val	46.67	0.95	-	11.71	0.99	1.36	52.04	1.96	2.13
Met	45.92	-	-	9.73	-	0.59	52.46	0.94	1.18
Cys	49.52	1.14	-	-	-	-	60	-	--
Iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu	45.25	1.03	0.59	7.03	0.98	-	48.64	1.75	1.92
Phe	49.07	0.49	-	2.70	0.47	0.76	56.70	1	1.43
Lys	84.46	60.46	0.21	80.90	37.48	0.169	98	50.28	3.74
Vf (ml)	850	1200	1100	810	1150	1025	805	1150	1050

**Tableau XI** : Composition (%) des différents compartiments lors de la séparation en groupes de famille sur le pilote P4 avec les membranes Néozepta  $i = 30 \text{ mA/cm}^2$ .

Acides Aminés	Produit	$i = 20 \text{ mA / cm}^2$			$i = 7.5 \text{ mA / cm}^2$			$i = 3 \text{ mA / cm}^2$		
		t=0	Pf	C1	C2	Pf	C1	C2	Pf	C1
Asp	10.27	2.18	-	67.19	0.19	-	65.66	-		63.63
Glu	4.11	1.82	-	29.98	0.39	-	26.51	0.54		29.37
Ser	22.44	4.74	2.79	0.53	7.93	3.6	3.95	8.52	4.36	3.52
Gly	9.20	7.89	3.9	-	7.84	5.2	-	6.08	5.7	-
His	6.4	3.86	21.07	-	5.54	16.62	-	2.32	14.4	-
Arg	2.5	0.43	14.76	-	0.53	12.96	-	-	12.3	-
Thr	5.33	6.01	0.72	0.45	6.30	1.16	0.27	6.30	1.54	0.47
Ala	14.20	20.36	1.36	0.81	17.89	4.96	1.27	20.79	8.1	2.30
Pro	4.30	6.09	0.53	-	5.4	0.64	0.18	6.01	1.32	0.32
Tyr	0.42	0.59	0.20	-	0.56	-	0	0.63	-	-
Val	11.38	14.91	1.47	0.65	14.32	2.14	0.86	16.39	3.3	1.39
Met	2.95	3.92	-	-	3.86	-	0.1	4.21	0.42	0.20
Cys	0.61	0.75	0.94	-	0.67	-	0.067	0.71	-	0.76
Iso	-	0.95	-	-	1.00	-	-	0.97	-	-
Leu	11.54	15.53	1.52	0.77	16.55	2.35	0.74	17.80	3.12	1.27
Phe	6.39	8.00	0.43	-	9.10	0.59	0.270	8.32	1.06	0.53
Lys	5.87	2.23	48.02	0.13	1.89	49.63	0.067	0.34	44.2	0.12

Les résultats des différentes expériences effectuées sur les deux types d'électrodialyseurs à quatre compartiments, montrent que les séparations ont permis de récupérer chacune des trois familles dans le compartiment qui lui a été prévu initialement. Cependant, on remarque que la totalité des acides aminés perdus dans le produit ne se retrouve pas dans les concentrats. Ces résultats confirment ceux préalablement obtenus. Ils montrent également que les familles obtenues ne sont pas pures. Il semblerait donc difficile d'empêcher les fuites des acides aminés amphotères vers les compartiments concentrats. Toutefois, on remarque sur les figures 41 et 42 que les fuites de certains acides aminés sont faibles au début de la séparation, il est donc possible de limiter la migration de ces derniers si on se limite à un certain taux d'extraction. Il pourrait être obtenu avec une séparation en continu en opérant avec plusieurs cellules d'électrodialyse placées en série. Dans ce cas, les familles les plus pures seront récupérées au début de la série.

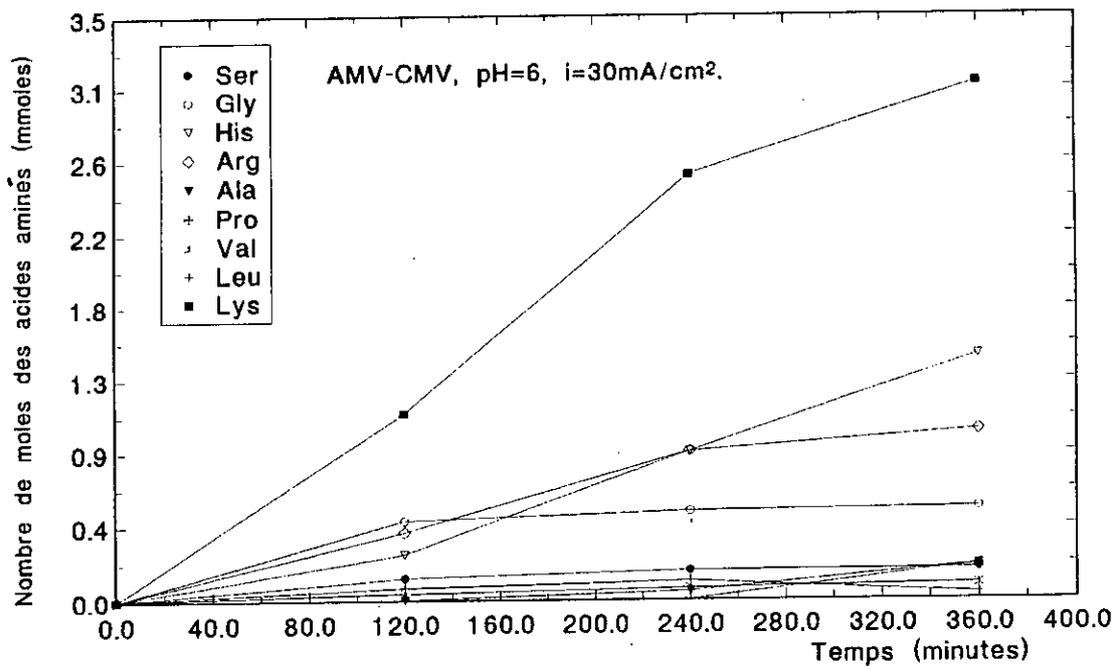


Figure41: Evolution du nombre de moles des acides aminés dans le concentrat cathodique lors de la séparation sur le micropilote.

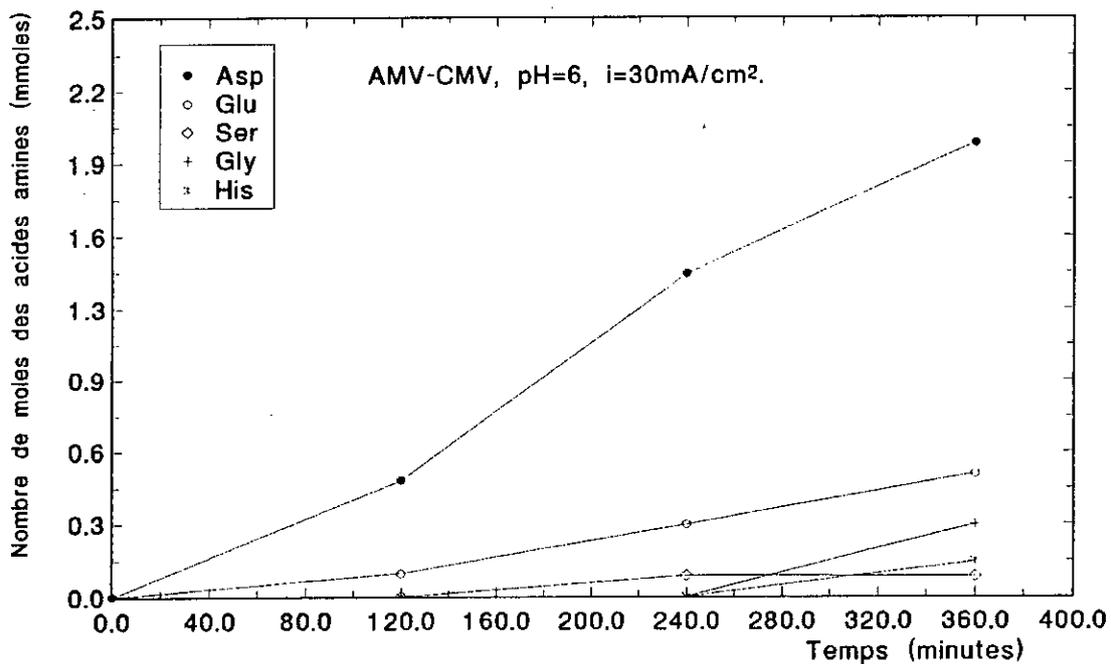


Figure42: Evolution de nombre de moles des acides aminés dans le concentrat anodique lors de la séparation sur le micropilote.

## VI-3. Fractionnement

Lors de cette partie, nous avons essayé de fractionner le mélange des acides aminés basiques ainsi que celui des amphotères obtenus lors de la séparation en groupes de famille .

### VI-3-1. Fractionnement des basiques

Les solutions récupérées dans le compartiment  $C_1$  après séparation en trois groupes de famille, sont composées majoritairement d'acides aminés basiques. Plusieurs expériences ont été réalisées dans le but d'effectuer une séparation au sein de cette famille en se basant sur le pH isoélectrique de chaque acide aminé.

Une première expérience de fractionnement des basiques a été réalisée sur le micropilote. Au cours de cette expérience, nous avons voulu maintenir la lysine dans le compartiment produit et ainsi récupérer l'arginine et l'histidine respectivement dans le compartiment cathodique et anodique. Pour cela, nous avons utilisé la solution ( $S_1$ ) récupérée dans le compartiment  $C_1$  lors de l'expérience précédente (séparation en groupes de familles) en fixant le pH du compartiment produit voisin du  $pH_i$  de la lysine. Les conditions expérimentales sont citées ci-dessous:

- Compartiments Diluat:  $D_1$  :  $V_{D1} = 200$  ml de solution  $S_1$ .  
 $D_2$  :  $V_{D2} = 500$  ml de solution NaCl 0.5 M.
- Compartiments Concentrat  $C_1$  et  $C_2$  :  $V_{C1} = V_{C2} = 100$  ml de sol. Na Cl  $10^{-2}$  M.
- Densité de courant :  $i$  :  $30 \text{ mA/cm}^2$ .
- pH de la solution  $S_1$  : : 9.5

Quatre autres essais de fractionnement ont été réalisés sur l'électrodialyseur pilote de laboratoire à différentes valeurs du pH (  $pH=10$  et  $11$ ); (  $pH= 8.5$  et  $10$  ). Pour les deux premières expériences, nous avons opéré avec les pH voisins du  $pH_i$  de la lysine et de l'arginine afin de les bloquer dans le compartiment diluat. La dernière expérience a été réalisée en deux étapes: la solution  $S_1$  récupérée dans le compartiment  $C_1$  à  $pH=8.5$  a été utilisée comme

produit dans le compartiment diluat à pH=10. Les conditions expérimentales pour ces quatre expériences sont les suivantes:

- Compartiments Diluat:  $D_1$ :  $V_{D1} = 2000$  ml de solution NaCl 2M.  
 $D_2$ :  $V_{D2} = 1100$  ml de la solution  $S_2$ .
- Compartiments Concentrat  $C_1$  et  $C_2$ :  $V_{C1} = V_{C2} = 1000$  ml de sol. Na Cl  $10^{-2}$  M.
- Densité de courant :  $i = 10 \text{ mA/cm}^2$ .

### Résultats et discussion:

Lors de l'essai de fractionnement des acides aminés basiques sur le micropilote, nous avons suivi au cours du temps la variation des concentrations en acides aminés dans les deux compartiments concentrat. Nous remarquons sur les figures 43 et 44 qu'au début de la séparation, l'évolution du nombre de moles des acides aminés est lente dans les deux compartiments. Après un temps de 300mn, nous observons une variation importante de lysine dans le compartiment cathodique ( $C_1$ ) et d'histidine dans le compartiment anodique ( $C_2$ ). L'évolution des autres acides aminés reste pratiquement linéaire. Cela s'explique par l'électromigration (au début de l'expérience) des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  contenu dans la solution  $S_1$ .

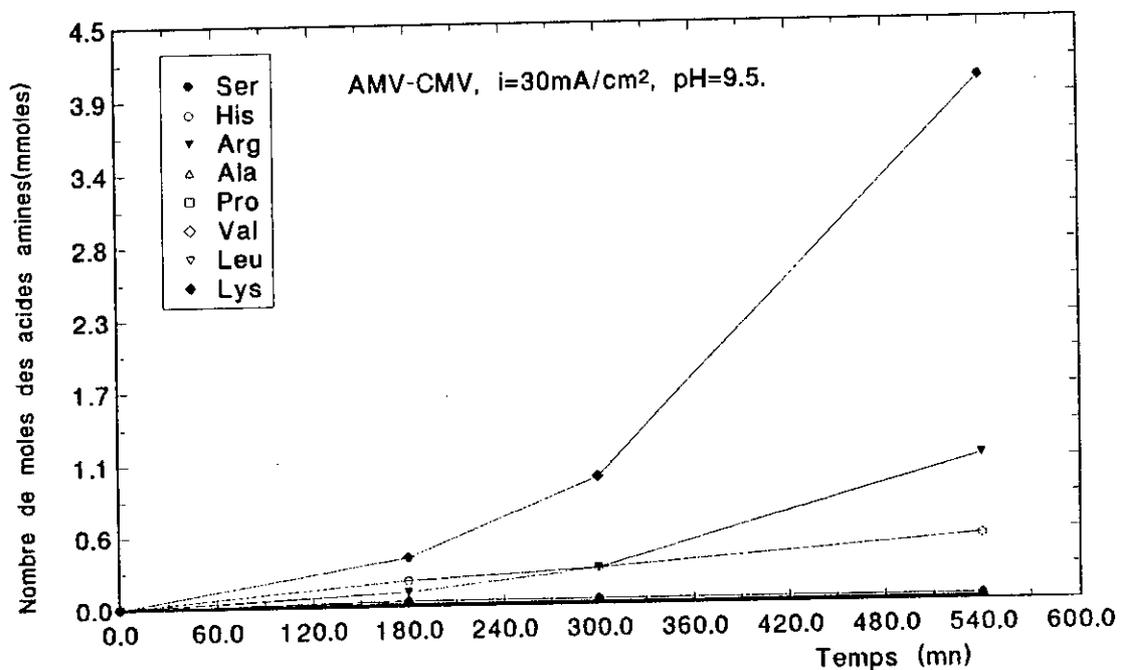


Figure 44: Evolution du nombre de moles des acides aminés dans le Concentrat cathodique lors de l'essai de fractionnement des basiques sur le micropilote

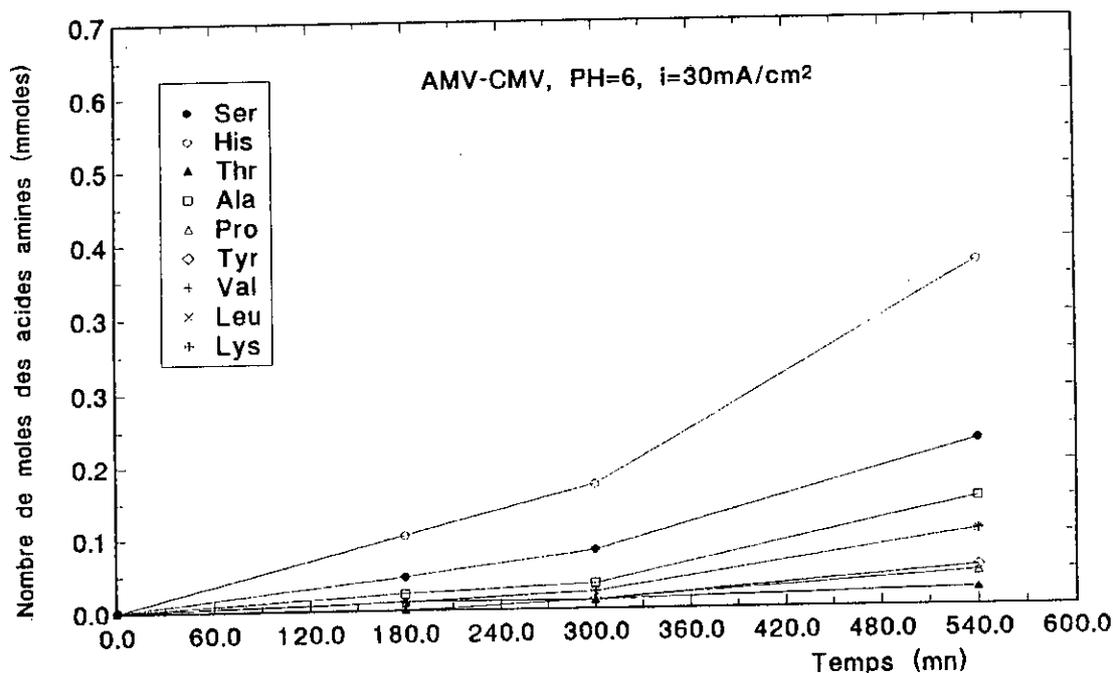


Figure44: Evolution du nombre de moles des acides aminés dans le concentrat anodique lors de fractionnement des basiques sur le micropilote

Nous avons reporté sur le tableau XII la composition (%) en acides aminés dans chaque compartiment au début et à la fin de l'expérience réalisée sur le micropilote à pH 9.5.

Tableau XII : Composition en acides aminés (%) des différents compartiments après fractionnement des basiques sur le micropilote à pH = 9.5 et  $i=30\text{mA/cm}^2$ .

Acides Aminés	Produit (%)		C1(-) (%) t = 540mn	C2(-) (%) t = 540mn
	t = 0	t = 540mn		
Asp	-	-	-	-
Glu	-	-	-	-
Ser	2.73	4.1	0.32	17.24
Gly	-	-	-	-
His	21.49	40.41	8.80	35.34
Arg	14.97	0.65	19.60	-
Thr	1.28	2.30	-	1.98
Ala	3.86	8.58	0.32	11.37
Pro	0.72	2.39	0.22	3.96
Tyr	0.56	1.31	0.102	3.96
Val	1.44	3.77	0.22	8.36
Met	0.32	0.68	0.85	1.46
Cys	0.08	-	-	0.43
Iso	-	-	-	-
Leu	1.36	4.80	0.1	8.36
Phe	-	-	-	-
Lys	50.96	30.82	69.62	7.93

Nous remarquons que le fractionnement n'a pas eu lieu comme prévu. En effet, nous avons récupéré un produit plus riche en histidine (40.41% ) qu'en lysine (30.82 %), et un concentrat cathodique plus riche en lysine (69.62 %) qu'en arginine (19.60%). Par contre, au cours du fractionnement sur le pilote P4 à pH 10 (tableau XIII), nous avons pu récupérer un diluat plus riche en lysine (49.60 %). Cependant, lors de cette dernière expérience, une quantité non négligeable d'histidine (15.79 %), d'arginine (11.60%) et d'acides aminés amphotères restent encore bloqués dans le compartiment produit. Toutefois, cette expérience nous a permis de récupérer un concentrat C<sub>2</sub> composé de 38.40 % d'histidine .

**Tableau XIII** :Résultats de fractionnement des acides aminés basique sur le pilote de laboratoire P4 avec les membranes Néozepa à pH=10 et i=10mA/cm<sup>2</sup>

	Concentrations finales (mmole/l)			Nombre de moles finales (mmole/l)			Composition des compartiments (%)		
	P <sub>f</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	N <sub>f</sub>	N <sub>ct</sub>	N <sub>c2</sub>	P	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
Asp	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	1.38	-	1.36	1.24	-	1.42	3.84	-	16.22
Gly	1.05	0.25	1.36	0.94	0.26	1.42	2.91	2.76	16.22
His	5.67	0.15	3.20	5.10	0.16	3.36	15.79	1.70	38.4
Arg	4.17	1.45	-	3.75	1.52	-	11.6	16.17	-
Thr	0.30	-	0.50	0.27	-	0.52	0.88	-	5.94
Ala	2.04	-	1.19	1.83	-	1.24	5.66	-	14.17
Pro	0.57	-	-	0.51	-	-	1.57	-	-
Tyr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val	1.17	-	0.26	1.053	-	0.27	3.26	-	3.08
Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cys	0.16	-	-	0.14	-	-	0.43	-	-
Iso	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu	1.30	-	-	1.17	-	-	3.62	-	-
Phe	0.28	-	-	0.25	-	-	0.77	-	-
Lys	17.81	-	0.50	16.02	7.46	0.52	49.62	79.36	5.94

Nous avons, lors de fractionnement à pH 11, essayé de bloquer l'arginine dans le compartiment diluat et de transférer la lysine et l'histidine vers le compartiment concentrat C<sub>2</sub>. Cependant, on remarque qu'à partir des résultats de cette expérience (tableau XIV) que la totalité de l'arginine est transférée vers le concentrat C<sub>1</sub> en même temps que la majeure partie de la lysine.

**Tableau XIV** : Résultats de fractionnement des acides aminés basiques sur le pilote de laboratoire P4 avec les membranes Néozeptra à PH =11 et  $i=10\text{mA/cm}^2$

Acides aminés	Concentration finales (mmoles/l)			Nombres de moles finales (mmoles)			Composition des compartiments (%).	
	P <sub>f</sub>	C <sub>1f</sub>	C <sub>2f</sub>	N <sub>pf</sub>	N <sub>c1</sub>	N <sub>c2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
Asp	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	0.7	0.11	1.79	0.054	0.12	1.96	0.42	7.94
Gly	-	-	1.33	-	-	1.46	-	5.91
His	-	0.088	7.46	-	0.1	8.20	4.10	33.23
Arg	-	5.39	-	-	6.19	-	25.38	-
Thr	-	-	0.47	-	-	0.51	-	2.06
Ala	-	-	2.74	-	-	3.014	-	12.21
Pro	-	-	0.31	-	-	0.34	-	1.37
Tyr	-	-	-	-	-	1.07	-	4.33
Val	-	-	0.98	-	-	-	-	-
Met	-	-	-	-	-	-	-	-
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-
Iso	-	-	-	-	-	-	-	-
Leu	-	-	1.07	-	-	1.17	-	4.74
Phe	-	-	0.28	-	-	0.30	-	1.21
Lys	0.28	15.63	6.05	0.21	17.95	6.65	73.70	26.97

Les fractionnements en deux étapes réalisés à pH 8.5 et 10 nous a permis d'obtenir une solution (S<sub>3</sub>) dans le compartiment C<sub>1</sub> (tableau XV) à partir de la solution S<sub>2</sub>, composée seulement de lysine (85,44%) et d'arginine (14,55%). La première opération (pH=8.5) nous a permis d'extraire la lysine et l'arginine avec une faible fraction en histidine et en acides aminés amphotères.

Au cours de toutes les expériences de fractionnement, nous avons remarqué que la lysine et l'arginine migrent vers le concentrat cathodique C<sub>1</sub>. Cela pourrait s'expliquer d'une part par le fait que les p*H*<sub>i</sub> de ces deux acides aminés sont très proches (p*H*<sub>i</sub> lysine=9.5, p*H*<sub>i</sub> arginine=10.7), mais aussi par l'électromigration des ions OH<sup>-</sup> et le déplacement de l'équilibre acido-basique de la lysine et de l'arginine vers la formation de leur forme positive.

**Tableau XV:** Résultats de fractionnement en deux étapes sur le pilote P4 avec les membranes Néozepta pH = 8.5 et pH= 10, =10 mA/cm<sup>2</sup>.

	pH= 8.5		pH = 10				
	Concentrat C <sub>1</sub>		Concentrat C <sub>1</sub>			Concentrat C <sub>2</sub>	produit final
Acides aminés	[AA] <sub>r</sub> (mmole/l)	Compos- (%)	[AA] <sub>r</sub> (mmole/l)	N <sub>r</sub> (mmole)	Comp- (%)	[AA] <sub>r</sub> (mmole/l)	[AA] <sub>r</sub> (mmole/l)
Asp	-	-	-	-	-	-	-
Glu	-	-	-	-	-	-	-
Ser	0.49	3	-	-	-	-	-
Gly	0.40	2.53	-	-	-	-	-
His	1.04	6.53	-	-	-	0.61	0.95
Arg	2.44	15.43	2.52	2.6	14.5	-	-
Thr	-	-	-	-	-	-	-
Ala	-	-	-	-	-	-	-
Pro	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	-	-	-	-	-	-	-
Val	0.18	1.1	-	-	-	-	-
Met	-	-	-	-	-	-	-
Cys	-	-	-	-	-	-	-
Iso	-	-	-	-	-	-	-
Leu	-	-	-	-	-	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-
Lys	11.29	71.37	14.7	15.5	85.4	0.09	0.23

### VI-3-2. Fractionnement des amphotères:

La solution (S<sub>4</sub>) récupérée dans le compartiment produit après séparation en groupes de famille est composée essentiellement des acides aminés amphotères. Ces derniers ont des p*H*<sub>i</sub> très voisins. Pour cela, la séparation entre les composés de cette famille est basée sur la concentration de chaque acide aminé, sur son encombrement stérique et sur le type de membranes utilisées.

Nous avons réalisé deux extractions sur l'électrodialyseur pilote à quatre compartiments au pH 8.5 et 3 éloignés des pH isoélectriques de ces acides aminés. Les conditions opératoires pour ces deux expériences sont les suivantes:

- Compartiments Diluat: D<sub>1</sub> : V<sub>D1</sub> = 2000 ml de solution NaCl 2M.  
D<sub>2</sub> : V<sub>D2</sub> = 1000 ml de solution S<sub>2</sub>.
- Compartiments Concentrat C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> : V<sub>C1</sub> = V<sub>C2</sub> = 1000 ml de sol. Na Cl 10<sup>-2</sup> M.
- Tension électrique : U = 34V0lts.

## Résultats et discussion:

Au cours du fractionnement des amphotères, nous avons suivi l'évolution de la concentrations des acides aminés dans le compartiment concentrat. Les résultats sont présentés sur les figures 45 et 46. La régression des concentrations des acides aminés acides et basiques ( Asp, Glu, His, Arg et Lys ) observée sur ces figures s'expliquent par le fait que le flux de ces produits s'annule après un certain temps d'extraction et aussi par l'augmentation du volume de la solution contenue dans le compartiment concentrat. Par conséquent, leurs fractions dans ce même compartiment chutent considérablement après avoir atteint des valeurs maximales au début de l'expérience (figure 47 et 48).

Nous constatons à partir des résultats de fractionnement des amphotères à pH 8,5 (fig47) que pour un temps inférieur à 15 minutes, la composition en acides aminés amphotères dans le compartiment concentrat est dominée par celle de l'alanine, de la glycine et de la serine. Ces résultats peuvent être expliqués par les concentrations relativement élevées de ces composés dans le produit de départ mais aussi par leurs encombrement stérique relativement faible. Cependant, le flux important des acides aminés acides (Asp et Glu) au début de l'expérience, réduit la fraction de chacun de ces trois acides aminés amphotères. Il est donc possible de récupérer un concentrat plus riche en ces derniers si on élimine totalement les acides aminés acides dans le produit de départ.

La solution contenue dans le compartiment concentrat lors du fractionnement à pH 3 (fig48) est composée essentiellement de l'alanine. Ce résultat pourrait être expliqué par la faible perméabilité aux acides aminés de la membrane échangeuse de cations utilisées, par l'encombrement stérique relativement faible de l'alanine, et aussi par sa concentration élevée (qui est de l'ordre de 20 % de la totalité des acides aminés dans le produit de départ , voir tableau IX ). Il est donc possible de récupérer une solution riche en alanine, en changeant la saumure ou en opérant en continu avec plusieurs cellules d'électrodialyse placées en série.

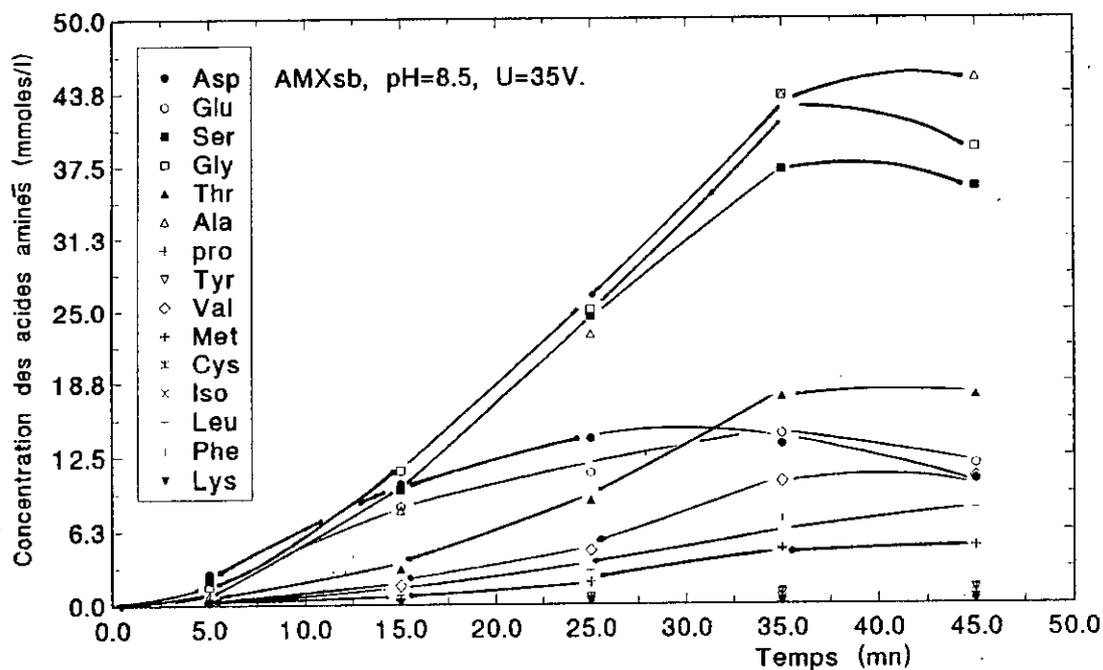


Fig 45: Evolution de la concentration des acides aminés dans le concentrat lors de fractionnement des amphotères sur l'électrodialyseur pilote

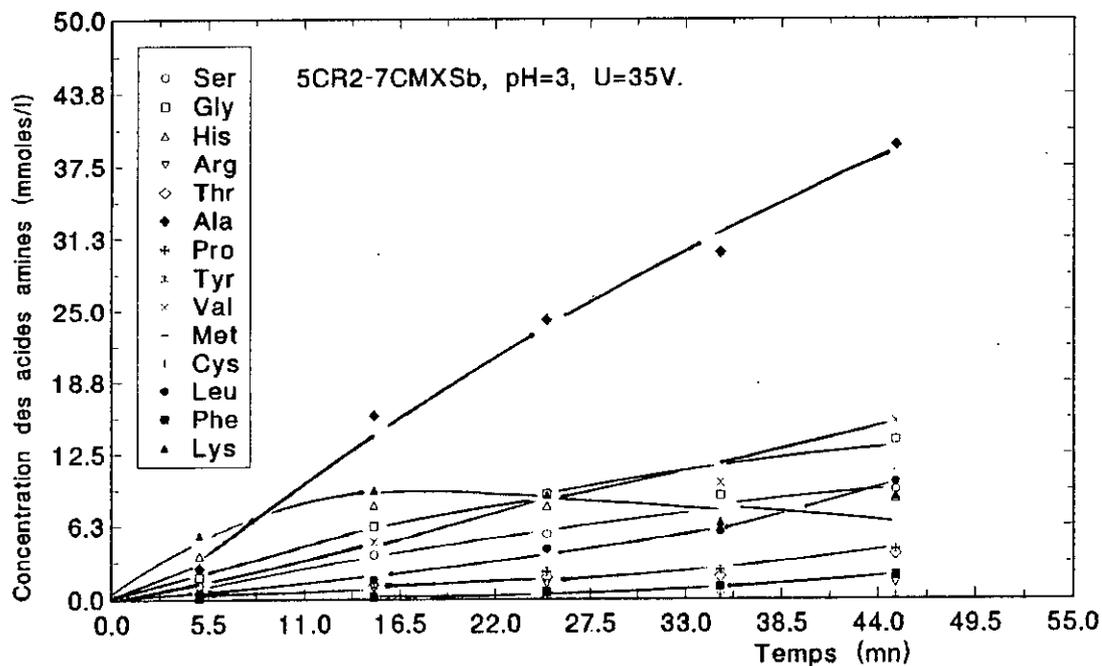


Fig46: Evolution de la concentration en acides aminés dans le concentrat lors de fractionnement des amphotères sur le pilote de laboratoire.

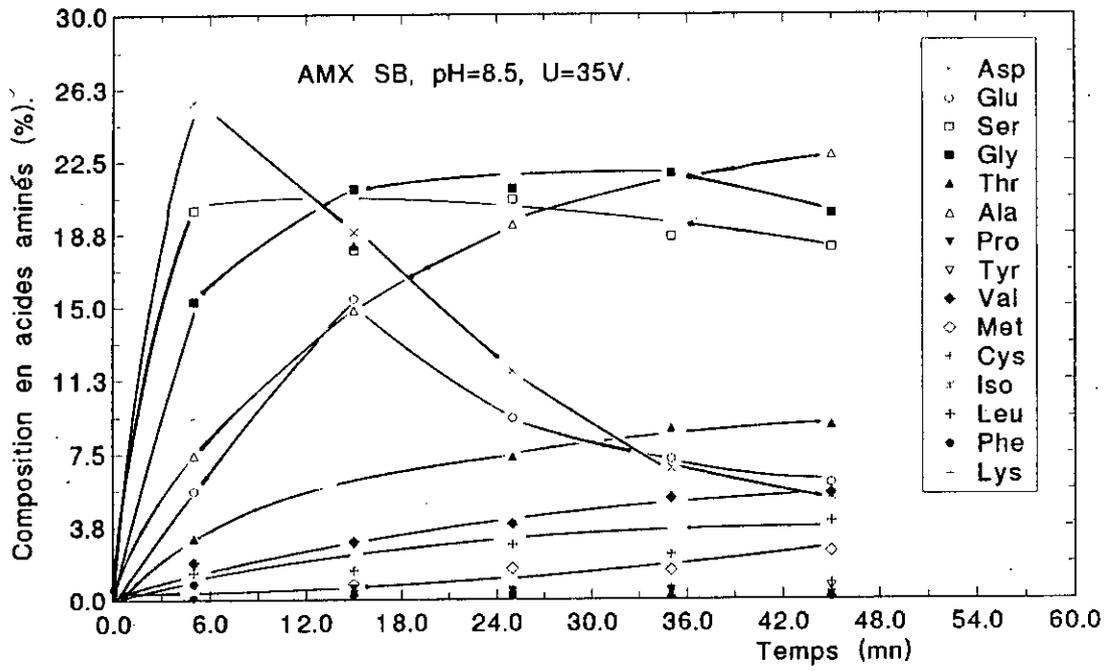


Figure47: Evolution de la composition en acides aminés dans le compartiment concentrat lors de fractionnement des amphotères sur le pilote P4.

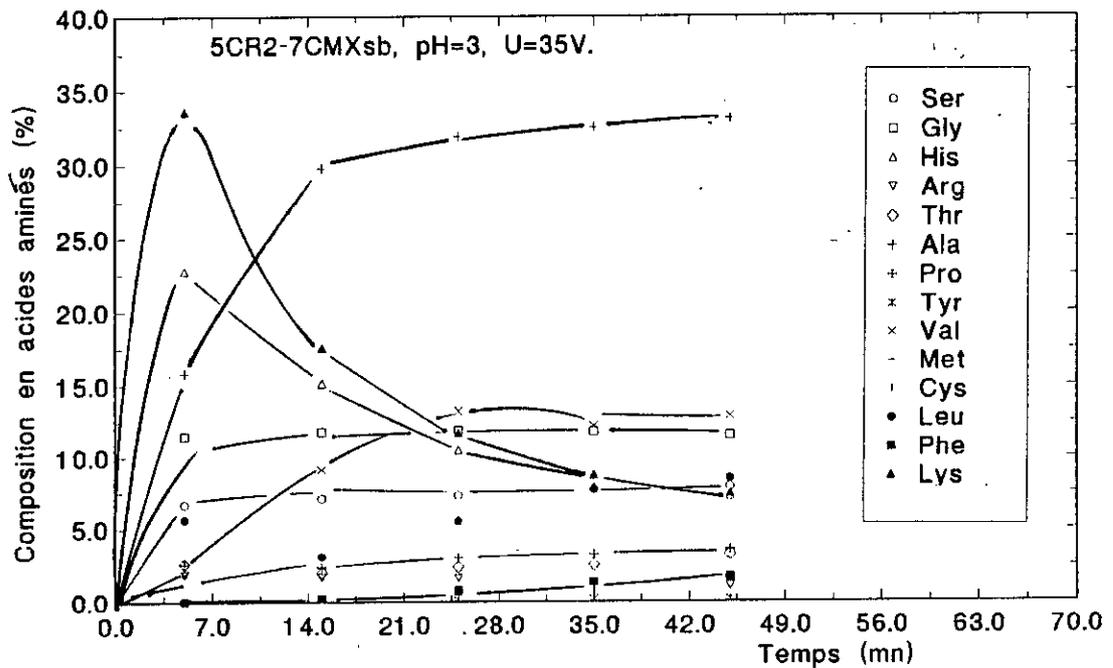


Figure48: Evolution de la composition en acides aminés dans le concentrat lors de fractionnement des amphotères sur le pilote de laboratoire.

## **CONCLUSION**

## **Conclusion:**

L'objectif de ce travail était d'étudier l'extraction par électrodialyse des acides aminés contenus dans l'hémoglobine bovine.

Au cours de la première partie nous avons montré que le sang est une matière première intéressante pour la récupération des acides aminés. En effet les concentrations de ces derniers dans l'hydrolysat acides sont largement suffisantes pour pouvoir effectuer la récupération. Toutefois, les concentration de ces produits dans l'hydrolysat enzymatique étant très faibles pour pouvoir effectuer l'extraction par électrodialyse, des études d'optimisation de cette méthode se déroulent actuellement au laboratoire dans le cadre d'une thèse de magistère. L'étude d'une optimisation de l'hydrolyse chimique du sang pourrait être aussi intéressante pour améliorer les résultats de cette partie.

Outre les acides aminés, les hydrolysats du cruor contiennent les résidus humiques de coloration brune et une quantité importante des sels minéraux. L'élimination de ces composés était alors nécessaire avant d'entamer l'extraction des acides aminés par électrodialyse.

Exception faite pour le phénylalanine qui est un acide aminé aromatique, les pertes en acides aminés au cours de la décoloration de l'hydrolysats par charbon actif étaient relativement faibles.

Les résultats de la déminéralisation nous ont permis de constater l'effet du pH de l'hydrolysats, de la concentration finale en NaCl et de la densité du courant sur les pertes en acides aminés. les meilleurs résultats sont obtenus à pH=6 à densité du courant régressive au cours de l'expérience.

L'étude du comportement des acides aminés pour chacune des trois familles nous a permis d'envisager la séparation du mélange en groupes de familles d'acides aminés. Les résultats de cette dernière opération ont été

satisfaisants et cohérents. En effet, nous avons pu récupérer les trois familles dans des compartiments séparés. Toutefois, les fuites des acides aminés amphotères vers les compartiments concentrés limitent la pureté de deux autres familles (basiques et acides). Nous avons constaté aussi qu'au cours de toutes les extractions, la totalité des acides aminés perdus dans le diluat ne se retrouvent pas dans le concentrât. On peut penser donc au blocage des acides aminés au niveau des membranes.

Les acides aminés amphotères possèdent des  $pH_i$  très voisins, le fractionnement de cette famille est basé sur la concentration, l'encombrement stérique et la mobilité ionique de chacun des acides aminés. Cette opération nous a permis d'augmenter la fraction de certains acides aminés mais il est difficile d'isoler chacun d'eux.

Les essais de fractionnement de la famille des acides aminés basiques, nous a permis de produire des solutions riches en lysine (73-85%). Ce dernier est parmi les principaux acides aminés ajouté aux aliments de bétail importés par l'Algérie.

D'une façon générale, les résultats obtenus sont satisfaisant, il serait intéressant d'envisager l'extrapolation de ces expériences à une échelle préindustrielle.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **M. W. GREENSTEIN**, "chemistry of the amino-acids" 3<sup>ième</sup> volume, Ed. Wiley, 1961
2. **LEHNINGER**, biochimie, Ed. Flammarion, 1979.
3. **F. PERCHERON, R. PERLES, M. J. FOGLIETTI** "Biochimie structurale et métabolique". 3<sup>ième</sup> édition Masson, 1991.
4. **A. MEISTER**, "Biochemistry of aminoacids". 2<sup>ième</sup> édition Académie presse, 1965.
5. **P. LOUISOT et R. GOT**, Biochimie structurale, édition Simep, 1972.
6. **E. TOROMANOFF**. "Substances naturelles. La compétition chimie- biotechnologies, le cas des acides aminés" Biofutur Sept (1986), p 39-46.
7. **C. P. E.** Production des acides aminés. état de recherche, bulletin CPE, N° 25, pp39-40 mars, 1986.
8. **R. S. HANSON, M. C. FLICKINGER, S. J. FREDERICK**. "Production of aminoacids by methylotrophic bacillus". Patent Coopération Treaty (PCT). WO 90/12105, 1990
9. **G. W. MALANEY, R. D. TANNER and A. M. RODRIGUES**. "The production of extracellular and intracellular free amino acids during aerated fermentation of glucose by baker's yeast (*saccharomyces cerevisiae*)" Folia microbiol. 36(5), 468-477 1991.
10. **T. NAOTO, K. HIROYUKI, M. HIROCHI**. "Recombinant DNA sequences encoding feedback inhibition released enzymes, plasmids comprising the recombinant DNA sequences, transformed microorganisms useful in the production of aromatic amino acids, and a process for preparing aromatic amino acids by fermentation", European Patent Application, N° 0488 424 A2, 1992.
11. **S. BERNARDI**. "Séparation of amino acids from proteins hydrolysates", Interchemical corp US, 1948.
12. **F. SHAKALOV, O. M. MARKOV, O. V. MARKELOV, M. SARBAEV, N. L. GAINRG**. "Production of amino acids from proteinaceous material", Kievmeat combine, (1976) L314 708
13. **A. GOLDNIK, M. GASEWSKA**. "Isolation of L-Aminoacids from protein hydrolysates from bovine skins". Acta pol Pharm. 1983, 40, 3. p 377-382.
14. **STROCCHI, DRAGO**. "Isolation of arginine and lysine from protein hydrolysates by ion exchange resins", Ann. Chem. Rome 1955, 45, 824-311
15. **E. LEDERER**. "Chromatographie et application en chimie biologique" Ed. MASSON, PARIS, 1960.
16. **N. TOSHIHIDE et H. KATO**. "Taste of Free aminoacids and peptides" Food Reviews International, 4(2), 175-194. 1988.
17. **S. Kimura et A. Tamand** "Separation of amino-acids by charged ultrafiltration membrane" Abstract Europe Japan Congress en membranes and process p 69, STRESA, 1984
18. **S. T. NAKAMURA**. "Pressure driven separation of aminoacids from acetyl DL aminoacid solution through anion exchange enzyme binding composite membranes". Abstract Europe-Japan congress on membranes and membranes processes, p 191, STRESA ITALY, 1984.
19. **M. DOYA, T KONDO, H. IGARASHI, T. UCHIYAMA**. Recovery of alpha-aminoacids, Eur Patent Ep 156513 A<sub>2</sub> 1985.
20. **RUMEAU ET MONFORT**  
"Purification et possibilité de séparation des acides aminés par électrodialyse" Analysis (1988) V 10 N°4
21. **D. MARTINEZ**. "Electrotransport des acides aminés dans les membranes échangeuses d'ions" Thèse de doctorat Montpellier, 1990

22. **GAVACH.** "Déminéralisation, extraction and separation of amino-acids by Electrodialysis" 5th World Filtration Congres (1990)
23. **T. NAOTO, K. HIRYUKI, M. HIROSHI.** European Patent Application N° 488424 A<sub>2</sub> 1992.
24. **A. BONNIN,** Technique de l'ingénieur, J2840, p 1-21.
25. **P. MEARS,** "Ion exchange membrane", Martnus nijhoff, 1983 p329
26. **J.P. BRUN.** "procédés de séparation par membranes", Ed. Masson, Paris 1989.
27. **A. MAUREL.** "dessalement des eaux par électrodialyse", Technique de l'ingénieur, J 2850-1, J2852-11.
28. **P. ZSCHOCKE and D. QUELLMALZ.** "Novel ion exchange membrane based on aromatic polyethersulfone", Journale of membrane, 22, 1985, p 325-332.
29. **E. KORNGOLD, E. KOROSY, F. RAHAV AND MF. TABOCH.** "Fouling anion selective membrane in électrodialysis", Desalination 8, 1970, p 195.
30. **ANNA NAREBKA, STANISLAW.** "Irreversible thermodynamics of transport across charged membranes", Journal of membranescience, 25, 1985, p 153-170.
31. **A. J. BAR, L. R. FAULKNER,** Electrochimie. Principes methodes et application Adaptation française de R. Rosset et D. Bauer, Masson, Paris, 1983.
32. **A. S. TOMBALKIAN, H. J. BARTON, W. F. GRAYDON,** J. Phys. chem, 66, 1962, 100.
33. **N. LASHMINARAYANAIAH,** Pro. and Aca sci, 55, 1959, 146
34. **M. BOUDET DUMY,** "Electrotransport de l'acide chlorohydrique dans des membranes échangeuses d'ions". Thèse de doctorat de l'USTL DE MONTPELLIER 1992.
35. **A. BENKHADA** "Eletrotransport des ions organiques dans les membranes échangeuses d'ions". Thèse de doctorat MONTPELLIER, 1993.
36. **A. A. SONIN et M. S. ISAACSON.** Optimization of flow designe in forced flow electrochemical systems, with special application telectrodialysis. Ind. Eng. Chem, Process Des. Develop. Vol 13, N° 3, 1974, p 241-248.
37. **A. MAUREL.** "Déminéralisation des eaux soumatres par électrodialyse.", Séminaire sur la technologie appropriée à la déminéralisation de l'eaux potables Alger, 14-19 novembre 1981
38. **H. STRATHMAN.** Synthétic Membrane Sciences, Engineering and application 197 223.
39. **K. HATTENBACH AND K. KNEIFEL.** The effect of cell thickness and flow velocity on water cost in desalination by electrdialysis, Desalination, 58 (1986) 33-41.
40. **F. LUTIN, G. GUERIF,** "Electrodialysis applied to denitration of drinking water". Récents progrès en génie des procédés vol 6 21 1992. p 79-84.
41. **K. SALEM** "Elimination des nitrates des eaux polluées par les procédés à membranes" Thèse de doctorat, MONTPELLIER, 1993.
42. **A. FARES .** "Compétition entre les électrotransport d'ions organiques et minéraux à travers une membrane échangeuse d'ions". Thèse de doctorat, MONTPELLIER, 1992.
43. **R. ROSSE, M. CAUD et , A. JARDY.** Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. 2<sup>ieme</sup> Edition masson 1982
44. **D. H. SPAKMAN W. H. STEIN AND MOOR.** Anal Chem 30, 1958 1190-1205
45. **HONG JI LIU.** Detemination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high- performance liquide chromatography with ultraviolet detection. Journal of chromatography, A, 670 (1994) 59-66.
46. **F. Boudah Khellaf.** "Utilisation de methodes chromatographiques dans l'analyse des acides aminés et applications" Thèse d'état USTHB (1991)
47. **J. GOTO,** "fluorescence dérivatisation", chromatography science 48, 1990, 323-358

48. **J.A. P. MEUENDIJK and W.J. M. UNDERBERG** "Ultraviolet-Visible derivatization", *Chromatography science* 48, 1990, 247-281
49. **A. VEGA, P. NUNN**, *Analytical Biochemistry* 32 446 1969.
50. **M. ROTH**, *Analytical chemistry* 43,880,1971.
51. **J.K. LIN et J.Y. CHANG**, *Analytical chemistry* vol 47, N 9 AUGUST 1975.
52. **BUCHERD**, *Chromatographia*, 10,723 1977.
53. **D.W. HILL, F.H. WALTERS, T.D. WILSON, J.D. STUAR**, *Anal. Chem.* 51(8),1338, 1978.
54. **M.H. FERNSTROM, J.D. FERNSTROM**, *Life sci.*,29,2119,1981.
55. **S. EINARSSON, B. JOSEFSSON and LARGELEVIST**, *J. Chrom.* 282, 1983, 609-618
56. **J.C. HODGIN, P.Y. HOWARD and B. DEANM**, An Automated device for in situ pre-column derivatization and injection of amino-acids for HPLC analysis *Journal of chrom sciences* vol 21, Novembre 1983.
57. **S. YUASA, M. ITOH and A. SHIMADA**. Resolution of amino acids by a native cellulose column, *Journal of chromatography sciences*, vol 22, july 1984.
58. **BORIS GREGO and MILTON T.W. HEARN**, "High performance liquide chromatography of amino acids, Peptides and proteins" *Journal of chromatography* 1984, 336
59. **J.B. KAFI and C.O. HUBER** "A nickel oxide amperometric detector in the chromatographic separation of aminoacids", *Analytica Chimica Acta*, 175, (1985), 275-280.
60. **A. THOMAS. WALKER and DONALD J. PIETRZYK**. "Separation of free amino-acids on reverse stationary phase using an alkyl sulfonate salt as a mobile phase additive", *Journal of liquide chromatography*, 8(11) ., 1985, 2045-2079.
61. **GRAHAM J. HUGHES. SEVERINE FRUTIGER and CRISTIAN FONCK** Quantitative high performance liquide chromatography analysis of Dabsyl-amino acids within 14 min. *Journal of chromatography\** 389, (1987), 327-333.
62. **H. TAN, A.C. SEN, W.B. WHEELER, J.A. CORNELL and C.I. WEI**. "A kinetic study of the reaction of aqueous chlorine and chlorine dioxide with amino acids , peptides and proteins", *Journal of food science*, volume 52 No 6 1987.
63. **MARK. C. MECROSKEY, JERRY. R. COLCA et JAMES. D. PEARSON** Detrmination of phosphoaminoacids in protein hydrolysates by Isocratic anion-exchange HPLC. *Journal of chromatography*, 442 1988, 307-315.
64. **J. MEULENDIJK and W. JM UNDERBERG**.  
*Journal of Chromatography science* 48 1990 247-281
65. **B GUSTAVSSON and I, BETNER**, *J Chromatography* 507, (1990). 67-77
66. **S.A. COHEN and D.P. MICHAUD**, *Anal Bioch.* 211 (1993), 279-287.
67. **J. MAIER. ROSENKRANZ, A MAISCH, A. KUPKA and P. FOLDI**. 512 LC, GC INT Volume 7 No 9 1994.
68. **AUDIGIE**. Manipulation d'analyse biochimique Edition Doin 1980
69. **O. QUEBRIAC** , « Valorisation du sang animale » Edition APRIA, 1985.
70. **H. FRUTEAU**. Contribution à l'étude de la valorisation de sous-produit d'abattoir. Thèse d'état 1986, UST du LANGUEDOC.
71. **B. Houlier**, « Récupération du sang des abattoirs » 2<sup>ieme</sup> édition CEMAGREF DICOVA, 1988.
72. **P.T. VAN DUIN** "Poisoning of electro dialysis Membranes " 4th inter. symp. on Fresh water from the see, Vol. 3.253-259.

## Index des symboles.

PI	:	Point isoélectrique.
pH <sub>i</sub>	:	PH isoélectrique.
K <sub>a</sub>	:	Constante d'acidité.
MEI	:	Membrane d'échangeuse d'ions.
MEC	:	Membrane échangeuse de cations.
MEA	:	Membrane échangeuse d'anions.
D	:	Compartiment de dilution.
C	:	Compartiment de concentration.
δ	:	Epaisseur de la couche limite.
C <sub>0</sub>	:	Concentration de l'électrolyte dans la solution.
C <sub>i</sub> '	:	Concentration de l'électrolyte à l'interface membrane-solution.
V <sub>i</sub>	:	Vitesse de la molécule.
f	:	Coefficient de friction.
U <sub>i</sub>	:	Mobilité ionique.
J <sub>i</sub>	:	Flux molaire.
C <sub>i</sub>	:	Concentration locale.
V	:	volume de la solution.
P	:	Pression en pascal.
R	:	Constante des gaz parfaits.
F	:	Faraday.
S <sub>i</sub>	:	Entropie.
D <sub>i</sub>	:	Coefficient de diffusion.
z	:	valence de l'ion.
K	:	Conductivité.
t	:	Nombre de transport dans la solution.
τ	:	Nombre de transport dans la membrane.
i	:	densité du courant.
U	:	Tension électrique appliquée.
C <sub>s,i</sub>	:	Concentration limite dans la saumure.
H	:	Hydrolysats de cruor.
PI	:	Electrodialyseur pilote à deux compartiments.

$Q$	:	débit de circulation.
$C_i^m$	:	Concentration à l'intérieur de la membrane.
$q^m$	:	Tension électrique dans la membrane.
$U_i^m$	:	Mobilité à l'intérieur de la membrane.
$A^-, A^0, A^+$	:	Formes ioniques des acides aminés.
$[AA]$	:	Concentration en acides aminés.
$[AA]_0$	:	Concentration initiale en acides aminés.
$N_i$	:	Nombre de moles initiale des acides aminés.
$N_f$	:	Nombre de moles finale des acides aminés.
$Ex$	:	Taux d'extraction (%).
$APP$	:	Taux d'appauvrissement en acides aminés.
$C1$	:	Compartiment 1 de concentration (cathodique).
$C2$	:	Compartiment 2 de concentration (anodique).
$D1$	:	Compartiment 1 de dilution.
$D2$	:	Compartiment 2 de dilution.
$V_{C1}$	:	Volume dans le concentrat 1.
$V_{C2}$	:	Volume dans le concentrat 2.
$V_p$	:	Volume dans le compartiment produit:

## Résumé:

Généralement, la récupération et la séparation des acides aminés s'effectue par précipitation ou par chromatographie d'échange d'ions. Pour le même objectif, en utilisant le caractère ionique des acides aminés, nous avons procédé avec la technique d'électrodialyse. Dans un premier temps, nous avons éliminé le sel contenu dans l'hydrolysât de cruor. Des essais de séparation par famille et de fractionnement des acides aminés basiques et amphotères sont ensuite réalisés à différentes valeurs du pH sur l'électrodialyseur à quatre compartiments.

## Abstract:

The recovery and the separation of aminoacids are in generally realised by precipitation and ion exchange chromatography. The aim of this work is to test electro dialysis using the electrolytic of these elements. In the first experiment the sodium chloride are removed from the solution of the mixtures of aminoacids. In the second time, we have shown that we can obtain several fraction of aminoacids by means of succession of electro dialysis operation.

## ملخص :

بصفة عامة عملية إسترجاع الأحماض الأمينية تحدث بالتريسيب أو بكرومانوغرافيا  
تبديل الشوارد ، لنفس الهدف و بإستعمال الخاصية الشاردية للأحماض الأمينية إستعملنا تقنية  
الإلكترودياليز في هذه الدراسة ، في البداية قمنا بنزع الملح الموجود في ميه الدم بعد ذلك تحقنا على  
الإلكترودياليز من أربع أقسام عملية تفرقة بالعائلة وكذا داخل نفس العائلة.