

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

Département: Génie de l'Environnement

Laboratoire des Biotechnologies

الدرسة الوطنية المتعددة التخصصات
المكتبة — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

Thèse de Magister

En Génie de l'environnement

Option: Biotechnologie

Présentée par:

MOKRANE HIND

**Valorisation de l'hémoglobine
bovine par hydrolyse enzymatique**

Soutenue devant le jury:

| | | |
|--------------------|-----------------------------|----------------|
| Mr KERBACHI, R. | Professeur (ENP) | - Président |
| Mme MAMERI, D. | Chargée de cours (ENP) | - Rapportrice |
| Mr MAMERI, N. | Maître de conférence (ENP) | - Rapporteur |
| Mme HELLAL, Y. | Maître de conférence (ENSA) | - Examinatrice |
| Mme BELHANECHÉ, N. | Maître de conférence (ENP) | - Examinatrice |
| Mme ABDI, N. | Chargée de cours (ENP) | - Examinatrice |
| Mr BELLAL, M. | Maître de conférence (ENSA) | - Invité |
| Mr NEDJMI, B. | Maître de conférence (ENS) | - Invité |

Année 1997

« Jusqu'ici nous n'avons fait qu'arracher quelques fragments au pied de la montagne de la connaissance », cependant ces fragments ont transformé notre manière de vivre. Dans les brumes du lointain, nous soupçonnons la présence d'une masse de faits fondamentaux dont la découverte d'un seul pourrait transformer notre civilisation »

CHARLES KETTERING

إن الهدف من هذه الدراسة هو إنتاج ميمه بيتيدات إنطلاقاً من خضاب الدم البقري و في هذا المضمار درست نتائج تفاعل الإماهة الأنزيمية في مفاعل بيولوجي ذي لترين، بأسلوب غير متواصل.

في مرحلة ثانية، ربط تقنية غشائية : ما فوق التصفية، مكنت من الحصول على تفريق جيد لمكونات الميمه الباييني لخضاب الدم.

RESUME

Le but de cette étude est la production d'hydrolysats peptidiques à partir de l'hémoglobine bovine.

Dans ce sens, les performances de la réaction d'hydrolyse enzymatique ont été étudiées dans un bioréacteur de 2 litres en mode discontinu.

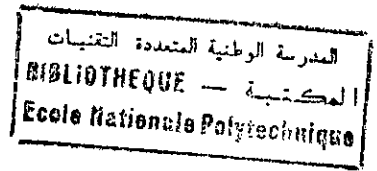
Dans une seconde étape, un couplage d'une technique membranaire: l'Ultrafiltration a permis d'obtenir une séparation fine des différents constituants de l'hydrolysat papaique de l'hémoglobine.

ABSTRACT

The aim of this study is the production of peptidic hydrolysate from bovin haemoglobin.

In this way, the performances of the enzymic hydrolysate reaction have been studied in a 2 liters batch bioreactor.

In a second stage, coupling a membrane technique: The Ultrafiltration, have permitted to obtain a fine separation of differents constituants of papaique hydrolysate of haemoglobin.



DEDICACES

Je dédie ce travail :

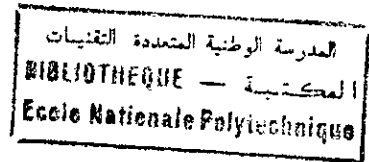
A mes parents qui ont consenti beaucoup de sacrifices à mon égard.

A ma grand mère.

A mes frères ainsi que Souad et Tarek

A mes oncles, tantes, cousins et cousines.

A tous mes amis (es).



AVANT PROPOS

La présente étude a été réalisé au niveau du laboratoire des biotechnologies de l'Ecole Nationale Polytechnique d'ALGER.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde reconnaissance à tous ceux qui par leur aide, par leur compétence ont contribué à la réalisation de ce travail.

En premier, Je tiens à remercier Mme et Mr. Mameri pour leur patience remarquable et leur disponibilité permanente.

Ils ont su m'amener par leurs conseils utiles à progresser tant sur le plan pratique que théorique. Je les remercie pour avoir accepté de diriger ce travail et de le finaliser.

Je remercie M^f. KERBACHI, Professeur à l'ENP.

M^{me} HELLAL, Maître de conférence à l'ENSA.

M^{me} BELHANECHÉ, Maître de conférence à l'ENP.

M^{me} ABDI, Chargée de cours à l'ENP.

M^f BELLAL, Maître de conférence à l'ENSA.

M^f NEDJMI, Maître de conférence à l'ENS.

Pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail

Je ne saurais oublier de remercier le personnel de l'abattoir de HUSSEIN-DEY pour l'aide précieuse durant les prélèvements.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues du Laboratoire pour leur soutien, leurs encouragements et leur amitié.

SOMMAIRE

| | |
|-------------------|---|
| INTRODUCTION..... | 1 |
|-------------------|---|

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|-----------|
| I- Généralités | 3 |
| I-1- Acides aminés..... | 3 |
| I-1-1- Définition..... | 3 |
| I-1-2- Sources et propriétés..... | 4 |
| I-2- Peptides..... | 5 |
| I-3- Protéines..... | 5 |
| I-3-1- Définition..... | 5 |
| I-3-2- Structure des protéines..... | 5 |
| I-3-2-1- Structure primaire..... | 6 |
| I-3-2-2- Structure secondaire..... | 6 |
| I-3-2-3- Structure tertiaire..... | 6 |
| I-3-2-4- Structure quaternaire..... | 7 |
| II- Le sang | 7 |
| II-1- Définition..... | 7 |
| II-2- composition du sang..... | 7 |
| II-3- Valeur nutritionnelle des protéines du sang..... | 8 |
| II-4- L'hémoglobine..... | 9 |
| II-4-1- Définition..... | 9 |
| II-4-2- Structure de l'hémoglobine..... | 9 |
| II-4-3- Caractéristiques de l'hémoglobine..... | 12 |
| III- Les enzymes | 12 |
| III-1- Définition..... | 12 |
| III-2- Classification des enzymes..... | 12 |
| III-3- Utilisation industrielle des enzymes..... | 13 |
| III-4- La papaïne..... | 14 |
| III-4-1- Définition et origine..... | 14 |
| III-4-2- structure et spécificité..... | 14 |
| III-4-3- Utilisation..... | 15 |
| III-5- Principe de cinétique enzymatique..... | 16 |
| III-5-1- Modèle cinétique de Michaélis- Menten..... | 16 |
| III-5-2- Influence de la présence d'effecteurs..... | 17 |
| III-5-2-1- Inhibition compétitive..... | 19 |
| III-5-2-2- Inhibition incompétitive..... | 19 |
| III-5-2-3- Inhibition non compétitive..... | 20 |
| III-5-2-4- Inhibition par le substrat..... | 20 |
| III-6- Influence des divers paramètres sur la réaction enzymatique..... | 22 |
| III-6-1- action du pH..... | 22 |

| | |
|--|----|
| III-6-2- action de la température..... | 22 |
| III- 6-3- Rayonnement et ondes sonores..... | 23 |
| III- 6-4- Action des effecteurs..... | 23 |
| III-7- Contrôle de la réaction d'hydrolyse enzymatique par suivi du degré d'hydrolyse..... | 23 |

IV- Les réacteurs enzymatiques..... 25

| | |
|---|----|
| IV-1- Définition..... | 25 |
| IV-2- Les procédés de type batch..... | 25 |
| IV-3- Les procédés continus..... | 26 |
| IV-3-1- Les réacteurs continus sans recyclage..... | 28 |
| IV-3-2- Les réacteurs continus à membranes..... | 27 |
| IV-4- Bilan de matière dans les réacteurs enzymatiques..... | 28 |
| IV-4-1- Cas des bioréacteurs discontinus..... | 28 |
| IV-4-2- Cas des bioréacteurs continus..... | 30 |
| IV-4-2-1- Réacteur continu parfaitement agité..... | 30 |
| IV-4-2-2- Réacteur continu à écoulement piston..... | 31 |
| IV-4-2-3- Réacteur continu couplé à un ultrafiltre..... | 32 |

V- L'ultrafiltration 35

| | |
|--|----|
| V-1- Principe de l'ultrafiltration | 35 |
| V-2- les membranes d'ultrafiltration | 37 |
| V-3- Les différents procédés d'ultrafiltration | 38 |
| V-3-1- Ultrafiltration en mode discontinue | 38 |
| V-3-2- Ultrafiltration en mode continue | 39 |
| V-3-3- Diafiltration | 39 |
| V-4 - Modèles d'ultrafiltration | 40 |
| V-4-1- Modèle du tamis moléculaire | 40 |
| V-4-2- Modèle du film | 41 |
| V-4-3- Modèle Osmotique | 42 |
| V-5- Mécanisme de colmatage..... | 43 |
| V-6- Domaines d'application de l'ultrafiltration | 44 |

VI- Etudes antérieures..... 45

| | |
|--|----|
| VI-1- Récupération du sang entier | 46 |
| VI-2- Récupération du plasma | 46 |
| VI-3- Récupération du cruor | 47 |
| VI-3-1- Utilisation directe | 47 |
| VI-3-2- Le masquage de la couleur | 47 |
| VI-3-3- La stabilisation de la couleur | 47 |
| VI-3-4- Décoloration du cruor | 48 |
| VI-3-4-1- Décoloration sans hydrolyse | 48 |
| VI-3-4-2- Décoloration avec hydrolyse..... | 50 |
| VI-4- Application des hydrolysats d'hémoglobine..... | 51 |
| VI-5- Situation en Algérie | 52 |

PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|--|--------|
| I- Matériels et méthodes | 53 |
| I-1- Récolte et prétraitement du sang | 53 |
| I-2- Détermination des caractéristiques du cruor | 53 |
| I-2-1- Dosage des protéines..... | 53 |
| I-2-2- Détermination de la densité | 54 |
| I-2-3- Détermination de la viscosité | 54 |
| I-2-4- Détermination de la demande biologique en oxygène | 54 |
| I-3- Détermination de l'activité enzymatique de la papaïne | 54 |
| I-4- Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine dans un réacteur discontinue | 56 |
| I-5- Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine dans un réacteur continue couplé à un ultrafiltre..... | 58 |
| I-6-1- Mise en service du module d'Ultrafiltration | 60 |
| I-6-2- Régénération des membranes | 60 |
| I-6- Analyses effectuées sur l'hydrolysât | 61 |
| I-7- Décoloration de l'hydrolysât | 63 |
| I-7-1- Caractéristiques de l'alumine utilisée | 63 |
| I-7-2- Dispositif expérimental | 63 |
| II- Résultats et Interprétations | 65 |
| II-1- Caractéristiques du Cruor | 65 |
| II-2- Etude de l'activité enzymatique de la papaïne | 65 |
| II-2-1- Détermination du temps de contact enzyme-substrat pour l'essai d'activité de la papaïne | 65 |
| II-2-2 - Etude de la thermostabilité de la papaïne | 66 |
| II-2-2-1- Détermination de l'activité enzymatique originelle de la papaïne..... | 66 |
| II-2-2-2- Cas d'un préchauffage de la papaïne pendant 1 heure | 67 |
| II-2-2-3- Cas d'un préchauffage de la papaïne pendant 4 heures | 69 |
| II-3- Etude de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine dans un réacteur discontinue..... | 71 |
| II-3-1- Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine sans régulation de pH | 71 |
| II-3-2- Influence du pH sur l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine | 72 |
| II-3-3- Influence de la température sur l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine | 73 |
| II-3-4- Influence de la concentration en enzyme sur l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine | 79 |
| II-3-5- Etude de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine | 82 |
| II-3-6- Etude du bilan de matière dans le réacteur discontinue | 86 |
| II-4- Etude de l'hydrolyse enzymatique en réacteur continue couplé à un ultrafiltre | 89 |

| | |
|---|---------|
| II-4-1- Détermination de la courbe du solvant | 89 |
| II-4-2- Influence de la vitesse de recirculation et de la pression transmembranaire sur le flux de perméat | 91 |
| II-4-2-1- Cas de la membrane M14 | 91 |
| II-4-2-2- Cas de la membrane M5 | 92 |
| II-4-3- Etude du couplage de l'ultrafiltration à l'hydrolyse enzymatique dans un bioréacteur en continu | 94 |
| II-4-3-1- Etude de la rétention de l'enzyme..... | 94 |
| II-4-3-2- Influence de la vitesse de recirculation sur les performances de l'hydrolyse enzymatique en réacteur continue couplé à un ultrafiltre..... | 98 |
| II-4-3-3- Etude de la cinétique d'hydrolyse enzymatique en réacteur continu couplé à un l'ultrafiltre..... | 108 |
| II-4-3-4- Etude du bilan de matière en réacteur continu couplé à un ultrafiltre | 114 |
| II-4-3-5- Etude du mécanisme de colmatage | 117 |
| II-4-3-6- Influence du seuil de coupure de la membrane sur l'hydrolyse enzymatique de 62,66 g/l d'hémoglobine en réacteur continu couplé à un ultrafiltre | 125 |
| II-5- Décoloration de l'hydrolysats..... | 132 |
| II-5-1- Détermination du temps d'équilibre..... | 132 |
| II-5-2- Influence de la masse d'alumine..... | 134 |
| II-5-3- Influence du pH..... | 134 |
| II-5-4- Influence de la température..... | 136 |
| II-6- Analyse de l'hydrolysats obtenu..... | 138 |
| II-6-1- Composition en acides aminés de l'hydrolysats..... | 138 |
| II-6-2- Eléctrophorèse..... | 141 |
| CONCLUSION..... | 143 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 146 |
| ANNEXES..... | 154 |

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, " La révolution enzymatique " connaît un essor considérable surtout dans les industries alimentaires.

La déficience nutritionnelle protéique chez les enfants en bas âge dans les pays du tiers monde fut probablement le point de départ de toute une série de valorisation de ressources protéiques jusqu'alors totalement ignorées.

Au début, les études se penchèrent surtout sur l'hydrolyse enzymatique des protéines de soja et de la caséine, mais depuis peu, d'autres substrats protéiques furent étudiés dont: le gluten, les protéines de poissons, de lactosérum et de sang (PIOT, 1989).

L'hydrolyse enzymatique de ces protéines génère un concentré protéique à haute valeur ajoutée, le produit ainsi obtenu est caractérisé par une amélioration de sa valeur nutritionnelle, de sa solubilité et de ses propriétés fonctionnelles physico-chimiques (viscosité, pouvoir émulsifiant, gélification et osmolarité). (LAHL et BRAUN, 1994), (MAHMOUD, 1994).

Selon les types d'enzymes et de substrats protéiques utilisés et en fonction des évolutions scientifiques et techniques, divers procédés d'hydrolyse ont été mis en oeuvre: en discontinu ou bien en continu avec couplage de techniques membranaires, avec utilisation d'enzymes libres ou immobilisées.

Le but de notre étude est la production d'hydrolysats peptidiques à partir de l'hémoglobine bovine par action d'une enzyme d'origine végétale: La papaïne.

Nous avons choisi de valoriser l'hémoglobine bovine pour plusieurs raisons.

- La reproductibilité parfaite de ses hydrolysats lui a permis d'accéder à des secteurs délicats tels que: la nutrition clinique, l'alimentation animale et humaine, l'utilisation dans les milieux de culture, et enfin plus récemment, la recherche de peptides héminiques à activité biologique aussi bien dans le perméat que dans le rétentat (CEMPEL et al, 1994).
- Il y a environ 12000 tonnes de cette protéine de bonne qualité annuellement rejetées dans le milieu naturel sans traitement (PIOT, 1989).
- Sa purification est très facile, sa composition en acides aminés est définie et constante.

Cependant, un obstacle majeur a limité son utilisation: sa couleur.

Plusieurs étapes ont donc régis nos recherches:

- La mesure de l'activité enzymatique de la papaïne sur un substrat standard: la caséine et l'étude de sa stabilité thermique.
- L'optimisation de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine dans un bioréacteur en mode discontinu, avec une étude cinétique approfondie, et une détermination du bilan de matière.
- L'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine bovine dans un bioréacteur en continu couplé à un ultrafiltre.

Deux membranes à seuil de coupure différents M14 (0.14 μm) et M5 (10.000 Da) sont donc utilisées et comparées.

La cinétique enzymatique est alors effectuée en réacteur continu à membrane.

Les deux procédés continu et discontinu sont donc comparés.

- Le produit ainsi obtenu est fortement coloré, il subi une étape de décoloration en mode batch avec l'alumine acide.
- En fin de procédé, plusieurs lots d'hydrolysats à différents stades de traitements sont donc analysés par Eléctroplorèse et leurs compositions en acides aminés déterminés par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

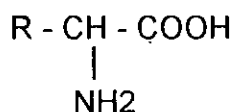
I- Généralités:

I-1- Acides aminés:

I-1-1- Définition:


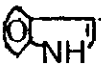


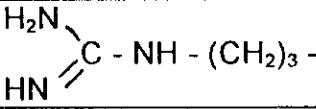
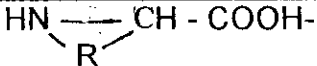
Les acides aminés sont des composés organiques caractérisés par deux fonctions, une acide (COOH) et l'autre basique (NH₃) (GRAY et HAIGHT, 1985).

La structure générale d'un acide aminé est la suivante:



Le radical R différencie un acide aminé d'un autre. Dans la nature, il existe une vingtaine d'acides aminés représentés dans le tableau 1.

**Tableau 1: Liste et structure des acides aminés
(BEREZIN et MARTINECK, 1977)**

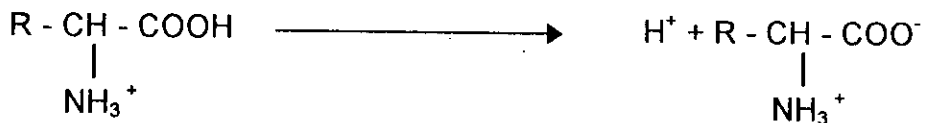
| Nom | Abréviation | Structure du radical R |
|------------------|-------------|---|
| Glycine | Gly | H - |
| Alanine | Ala | CH ₃ - |
| Valine | Val | (CH ₃) ₂ CH ₂ - |
| Leucine | Leu | (CH ₃) ₂ CH CH ₂ - |
| Isoleucine | Ile | CH ₃ CH ₂ CH (CH ₃) - |
| Méthionine | Met | CH ₃ S CH ₂ CH ₂ - |
| Phénylalanine | Phe |  - CH ₂ - |
| Cysteine | Cys | H - S - CH ₂ - |
| Tryptophane | Trp |  - CH ₂ - |
| Asparagine | Asn | H ₂ NC (O) CH ₂ - |
| Thréonine | Thr | CH ₃ CH (OH) - |
| Serine | Ser | HO CH ₂ - |
| Glutamine | Gln | H ₂ NC (O) CH ₂ CH ₂ - |
| Acide aspartique | Asp | HOC (O) CH ₂ - |
| Tyrosine | Tyr | HO -  - CH ₂ - |
| Histidine | His | HN  CH ₂ |
| Lysine | Lys | H ₂ N (CH ₂) ₄ - |
| Arginine | Arg |  - NH - (CH ₂) ₃ - |
| Proline | Pro |  - COOH - |
| Acide glutamique | Glu | HOOC - CH ₂ - CH ₂ - |

I-1-2- Sources et propriétés:

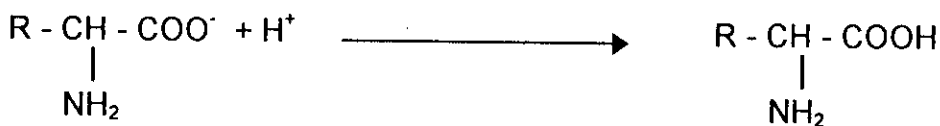
Les acides aminés sont des composés existant à l'état libres dans les cellules et dans le milieu intérieur des organismes vivants, mais les sources les plus abondantes en acides aminés sont les protéines (YON, 1969).

En effet, grâce à une simple hydrolyse chimique ou enzymatique des protéines, une multitude d'acides aminés peut être récupérée.

Ce sont des molécules aux propriétés très variées, ils peuvent prendre une charge équivalente à celle d'un ion en deux points différents, ils peuvent réagir comme des acides.



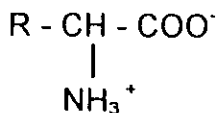
ou comme des bases:



Les acides aminés sont des cations en milieu acide, et des anions en milieu basique (GRAY et HAIGHT, 1985).

Chaque acide aminé a un pH pour lequel la charge nette de la molécule est nulle, ce pH est une caractéristique invariable et est dite point isoionique.

L'acide aminé est alors un zwitterion, sa charge globale est nulle.



Les acides aminés sont classés en deux familles:

a- Les acides aminés essentiels qui doivent obligatoirement être présents dans la ration alimentaire pour assurer une croissance normale. Ce sont des acides aminés indispensables, chez l'homme ils sont au nombre de neuf (TYBOR et al, 1975).

Lysine, Thréonine, Méthionine, Valine, Phenylalanine, Leucine, Isoleucine, Tryptophane, Histidine.

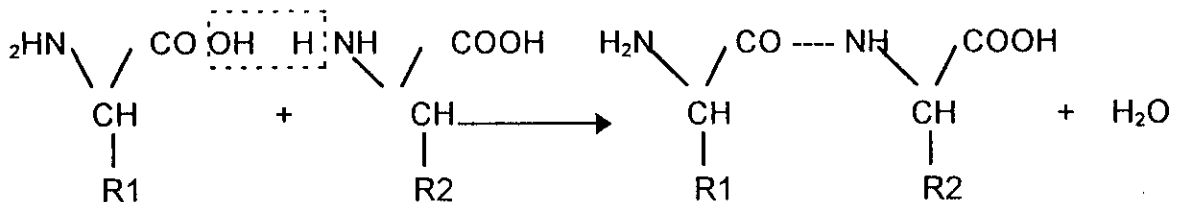
b- Les autres acides aminés sont considérés non essentiels par les normes de l'O.M.S.

I-2- Peptides:

Une réaction de condensation entre les acides aminés peut s'établir par l'élimination d'une molécule d'eau et la formation d'une liaison C - N (YON, 1969).

Cette condensation peut se répéter indéfiniment à chaque extrémité de la molécule, donnant des macromolécules d'un poids moléculaire de 100.000 Da voir 1.000.000 Da (GRAY et HAIGHT, 1985).

La liaison ainsi formée est dite liaison peptidique;



Un peptide est donc formé d'un enchaînement d'acides aminés reliés entre eux par ce type de liaison CO - NH.

I-3- Protéines:

I-3-1- Définition:

Les protéines sont des composés de poids moléculaire élevé, elles sont formés par un enchaînement d'acides aminés par liaisons peptidiques.

Les protéines ne sont pas des macromolécules planes, elles forment un édifice compact de conformation spatiale (YON, 1969).

Les protéines sont classés suivant leur forme en deux grandes familles (SCRIBAN, 1988).

- Les protéines fibreuses: Elles sont de forme allongée et sont peu solubles, cas de la chératine (protéine des cheveux).
- Les protéines globulaires: Elles sont de forme ramassée; cas de l'hémoglobine, la caséine et toutes les enzymes.

I-3-2- Structure des protéines:

La structure des protéines peut se décomposer en quatre niveaux d'organisation :

I-3-2-1- Structure primaire:

La détermination de la structure primaire d'une protéine, revient à définir toute la séquence des résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique.

Le nombre et la position des acides aminés conditionne l'activité biologique des protéines, le changement d'un seul acide aminé dans une molécule de cette taille peut générer des modifications importantes dans les propriétés biologiques de la protéine (YON, 1969).

I-3-2-2- Structure secondaire:

La structure secondaire des protéines résulte de la possibilité de formation de liaisons hydrogènes entre l'oxygène du groupement CO et l'hydrogène du groupement NH de la liaison peptidique (YON, 1969).

L'agencement de la chaîne polypeptidique peut s'effectuer selon deux formes: en hélice α ou en feuillets plissés β .

- Structure en hélice α : La liaison hydrogène s'effectue entre le groupement CO et le groupement NH de 3 acides aminés plus loin.
La distance entre les deux groupements ainsi liés est de 3.12 \AA
La chaîne polypeptidique a une forme hélicoïdale.
- Structure en feuillets plissés β : Dans une telle structure, il existe un plissement dans la chaîne au niveau du carbone - CH - R qui appartient à deux plans différents, dans l'un de ces plans est situé le groupement C = O, dans l'autre le groupement NH, le résidu R est placé perpendiculairement.
Les liaisons hydrogènes s'établissent généralement entre chaînes polypeptidiques différentes, il existe cependant dans une même chaîne polypeptidique des structures β dites intracaténaïres.
La structure β caractérise souvent les protéines fibreuses.

I-3-2-3- Structure tertiaire:

La chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire se replie sur elle même pour former une molécule compacte à configuration spatiale bien déterminée (YON, 1969).

Un certain nombre de liaisons intramoléculaires s'établissent: Les liaisons covalentes S - S, les liaisons hydrogènes autres que celles de la structure secondaire, les liaisons hydrophobes et hydrophiles et les liaisons ioniques.

Au cours des phénomènes de dénaturation les liaisons de la structure tertiaire sont détruites, et si la dénaturation est poussée, il ne subsiste que la structure primaire (YON, 1969).

I-3-2-4- Structure quaternaire:

Les protéines sont constituées de sous unités associées pour former des dimères ou oligomères d'ordre supérieur.

L'hémoglobine est ainsi formée de quatre sous unités deux de types α et deux de types β (LEHNINGER, 1981).

II- Le sang:

II-1- Définition:

Le sang est un coproduit d'abattage qui se compose d'un liquide biologique: le plasma, dans lequel baignent des éléments figurés (les hématies, les leucocytes, les plaquettes sanguines) (BOURGEOIS et LEROUX, 1982).

II-2- Composition du sang: (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985)

Le sang est très riche en eau (80 à 82 %) et en protéines (16 à 18 %).

Le fractionnement du sang additionné d'anticoagulants, par centrifugation permet de mettre en évidence deux phases:

- Le plasma représentant 60 à 65 % du sang: Il est constitué de 6.7 % de protéines (la sérumalbumine, les globines α , β et γ , le fibrinogène, etc), 91.5 % d'eau, 0.1 % de graisse, 1.7 % de sucres et sels.
 - Le cruor représentant 40 à 35 % du sang: Il est constitué de 25 à 29 % de protéines (l'hémoglobine), de 74 à 70 % d'eau, de 0.2 % de graisse, de 0.6 % de sucres et sels.
- Par contre la coagulation du sang produit un exsudat: le sérum défibriné, et un caillot constitué des hématies et de fibrine (figure 1).

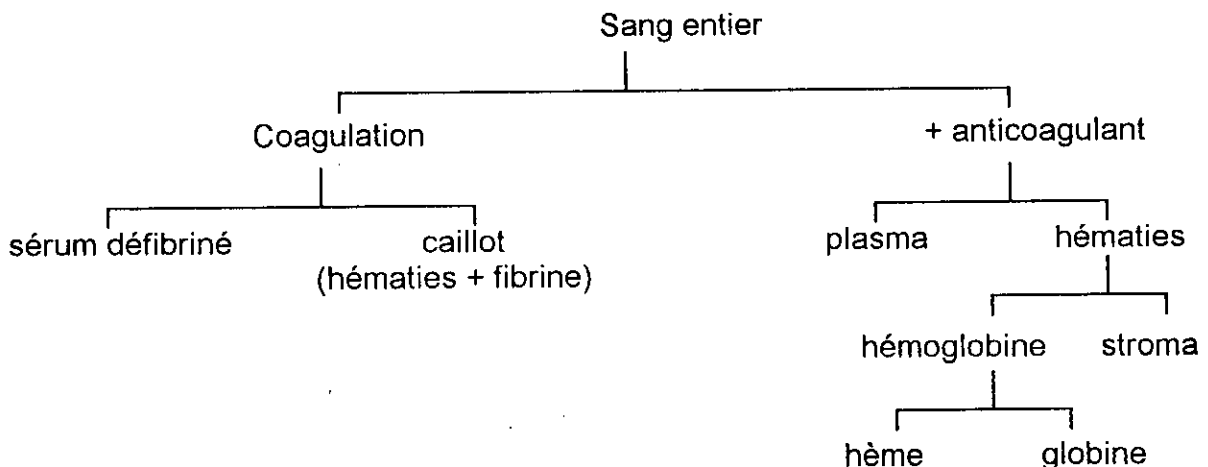


Figure 1: Composition du sang d'après QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985.

II-3- Valeur nutritionnelle des protéines du sang:

Les protéines du sang ont une valeur nutritionnelle élevée et leur composition en acides aminés est bien équilibrée.

Le tableau 2 représente les compositions en acides aminés de plusieurs protéines alimentaires:

Tableau 2: Composition en acides aminés de l'hémoglobine, des protéines du plasma, des protéines du lait et de l'oeuf en g/100 g, de protéines d'après TYBOR et al (1975) et BOURGEOIS et LEROUX (1982)

| Acides aminés essentiels | Hémoglobine | Protéines du plasma | Protéines du lait entier | Protéines de l'oeuf | Taux minimal d'acides aminés essentiels (FAO) |
|-------------------------------------|--------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|--|
| | - | - | - | - | |
| Lysine | 10.5 | 9.2 | 8.7 | 7.0 | 4.2 |
| Thréonine | 3.8 | 6.3 | 4.7 | 4.3 | 2.8 |
| Méthionine | 1.7 | 1.0 | 3.2 | 4.0 | 2.2 |
| Valine | 9.4 | 7.0 | 7.0 | 7.2 | 4.2 |
| Phénylalanine | 7.9 | 5.6 | 5.5 | 6.3 | 2.8 |
| Leucine | 13.8 | 10.1 | 11.0 | 9.2 | 4.8 |
| Isoleucine | 0.2 | 2.9 | 7.5 | 7.7 | 4.2 |
| Tryptophane | 2.0 | 1.9 | 1.5 | 1.5 | 1.4 |
| Histidine | 7.8 | 3.5 | 2.6 | 2.4 | - |
| Acides aminés non essentiels | | | | | |
| Arginine | 3.6 | 5.0 | 4.2 | 6.6 | - |
| Acide aspartique | 10.0 | 10.7 | 7.0 | 9.0 | - |
| Serine | 3.0 | 5.5 | 4.3 | 8.5 | - |
| Acide glutamique | 6.8 | 13.7 | 21.5 | 16.0 | - |
| Proline | 3.5 | 3.8 | 7.0 | 8.1 | - |
| Glycine | 3.7 | 3.6 | 2.3 | 2.7 | - |
| Alanine | 8.6 | 5.3 | 2.5 | 7.4 | - |
| Cysteine | 0.1 | 1.2 | 1.0 | 2.4 | - |
| Tyrosine | 2.5 | 3.6 | 6.0 | 4.5 | - |

Globalement la composition en acides aminés des protéines du sang, fait ressortir leur richesse en Leucine, en Lysine et en Tryptophane, ce qui en fait un complément intéressant des céréales, mais aussi leur pauvreté en Isoleucine et en acides aminés soufrés tels que la Méthionine et la Cysteine (TYBOR et al, 1975).

Les pourcentages de thréonine, de valine, de Phenylalanine et de Tryptophane sont supérieurs aux pourcentages minimaux proposés par la F.A.O (Food and Agricultural Organization) pour l'alimentation humaine.

De plus, la composition moyenne en acides aminés est voisine de celle des protéines considérées comme bien équilibrées: Les protéines du lait et de l'oeuf, particulièrement, pour les acides aminés essentiels qui sont présents en quantité convenable.

II-4- L'hémoglobine:

II-4-1- Définition:

L'hémoglobine est une hétéroprotéine du sang, constituée de plusieurs chaînes polypeptidiques associées à un noyau héminique.

Elle est obtenue par éclatement des hématies ou globules rouges

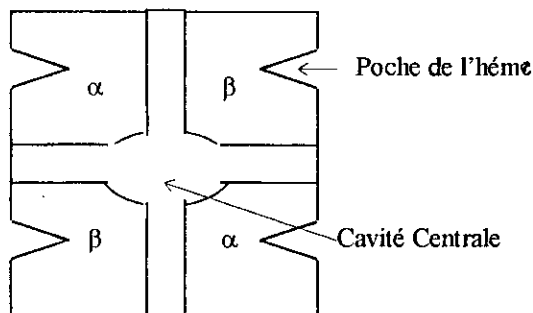
II-4-2- Structure de l'hémoglobine:

L'hémoglobine bovine est formée de quatre chaînes polypeptidiques α_1 , α_2 et β_1 , β_2 disposées comme l'indique la figure 2a, chaque chaîne possède une poche interne où se fixe l'hème (LEHNINGER, 1981).

Les chaînes α contiennent 141 acides aminés, et les chaînes β , 146 acides aminés, ces deux chaînes polypeptidiques ont des résidus d'acides aminés identiques en plusieurs positions (Figure 2b). Ceci indique que les deux chaînes possèdent une homologie de séquence (résidus encadrés)

Figure 2: Structure de l'hémoglobine

a- Structure schématique (HAROLD et HARPER, 1985)



b- Séquence des acides aminés dans les chaînes α et β (LEHNINGER, 1981)

Extrémité N-terminale

| | α | β | | α | β | | α | β | | α | β |
|----|----------|---------|----|----------|---------|-----|----------|---------|-----|----------|---------|
| | Val | Val | | Thr | Arg | | Met | Leu | | Phe | Phe |
| | | His | | Tyr | Phe | | Pro | Lys | | Thr | Thr |
| | Leu | Leu | | Phe | Phe | | Asn | Gly | | Pro | Pro |
| | Ser | Thr | | Pro | Glu | | Ala | Thr | 120 | Ala | Pro |
| | Pro | Pro | | his | Ser | 80 | Leu | Phe | | Val | Val |
| | Ala | Glu | | Phe | Phe | | Ser | Ala | | His | Gln |
| | Asp | Glu | | | Gly | | Ala | Thr | | Ala | Ala |
| | Lys | Lys | | Asp | Asp | | Leu | Leu | | Ser | Ala |
| | Thr | Ser | | Leu | Leu | | Ser | Ser | | Leu | Tyr |
| | Asn | Ala | | Ser | Ser | | Ala | Glu | | Asp | Gln |
| 10 | Val | Val | 50 | His | Thr | | Leu | Leu | | Lys | Lys |
| | Lys | Thr | | Gly | Pro | | His | His | | Phe | Val |
| | Ala | Ala | | Ser | Asp | | Ala | Cys | | Leu | Val |
| | Ala | Leu | | Ala | Ala | | His | Asp | 130 | Ala | Ala |
| | Trp | Trp | | | Val | 90 | Lys | Lys | | Ser | Gly |
| | Gly | Gly | | | Met | | Leu | Leu | | Val | Val |
| | Lys | Lys | | | Gly | | Arg | His | | Ser | Ala |
| | Val | Val | | | Asn | | Val | Val | | Thr | Asp |
| | Gly | Asn | | | Pro | | Asp | Asp | | Val | Ala |
| | Ala | | | Gln | Lys | | Pro | Pro | | Leu | Leu |
| 20 | His | | | Val | Val | | Val | Glu | | Thr | Ala |
| | Ala | Val | | Lys | Lys | | Asn | Asn | | Ser | His |
| | Gly | Asp | | Gly | Ala | | Phe | Phe | | Lys | Lys |
| | Glu | Glu | | His | His | | Lys | Arg | 140 | Tyr | Tyr |
| | Tyr | Val | | Gly | Gly | 100 | Leu | Leu | | Arg | His |
| | Gly | Gly | 60 | Lys | Lys | | Leu | Leu | | | |
| | Ala | Gly | | Lys | Lys | | Ser | Gly | | | |
| | Glu | Glu | | Val | Val | | His | Asn | | | |
| | Ala | Ala | | Ala | Leu | | Cys | Val | | | |
| | Leu | Leu | | Asp | Gly | | Leu | Leu | | | |
| 30 | Glu | Gly | | Ala | Ala | | Leu | Val | | | |
| | Arg | Arg | | Leu | Phe | | Val | Cys | | | |
| | Met | Leu | | Thr | Ser | | Thr | Val | | | |
| | Phe | Leu | | Asn | Asp | | Leu | Leu | | | |
| | Leu | Val | | Ala | Gly | 110 | Ala | Ala | | | |
| | Ser | Val | 70 | Val | Leu | | Ala | His | | | |
| | Phe | Tyr | | Ala | Ala | | His | His | | | |
| | Pro | Pro | | His | His | | Leu | Phe | | | |
| | Thr | Trp | | Val | Leu | | Pro | Gly | | | |
| | Thr | Thr | | Asp | Asp | | Ala | Lys | | | |
| 40 | Lys | Gln | 75 | Asp | Asn | 116 | Glu | Glu | | | |

Extrémité C-terminale

La molécule d'hème est formée de quatre noyaux hétérocycliques azotés: les noyaux pyrroliques.

Par ailleurs, un ion ferreux est lié aux quatre azotes des pyrroles, l'oxydation de l'ion ferreux en ion ferrique transforme l'hémoglobine en méthémoglobine qui ne peut plus fixer l'oxygène.

Les agents méthémoglobinisants sont donc des composés toxiques.

Le fer est également lié à un azote de l'histidine.

Il est aussi combiné à une molécule d'oxygène dans l'oxyhémoglobine (HAROLD et HARPER, 1985).

L'hème représenté en figure 3 est partiellement enfouie dans une cavité de la chaîne protéique tapissée d'acides aminés non polaires.

Les substituants portés par les pyrroles sont quatre méthyles - CH_3 , deux vinyles - $\text{CH} = \text{CH}_2$ et deux propionyles $\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$.

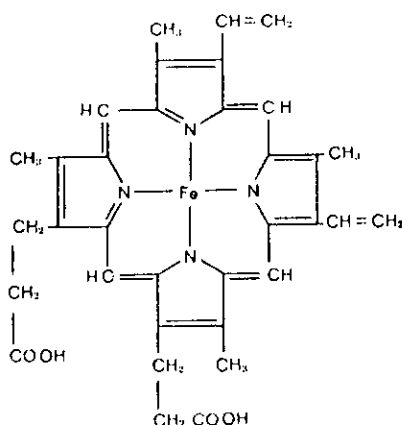


Figure 3: Structure de l'hème (GRAY et HAIGHT, 1985)

Les propionyles sont combinés par électrovalence à des acides aminés basiques comme la Lysine, les autres substituants échangent des liaisons hydrophobes avec des acides aminés comme la valine, la leucine.

La liaison hème - globine est assez forte, mais elle peut être rompue par action de solvants organiques comme l'acétone, l'éthanol ou d'adsorbants tels que le charbon actif, la magnésie, la silice. (WISMER- PEDERSEN, 1988).

L'extraction de l'hème provoque la décoloration de l'hémoglobine.

PERUTZ et KENDREW ont étudié l'hémoglobine par diffraction aux rayons X et ont montré la disposition relative des quatre chaînes polypeptidiques et des molécules d'hème (HAROLD et HARPER, 1985).

Chaque chaîne est formée de régions hélicoïdales avec des plies, les acides aminés à radicaux hydrophobes sont tournés vers l'intérieur de la molécule, tandis que les acides aminés possédant des groupement polaires vers la surface.

Malgré la complexité de la forme de ces chaînes, elles peuvent ajuster leur surface pour former une molécule globulaire.

II- 4-3- Caractéristiques de l'hémoglobine:

L'hémoglobine a un poids moléculaire de 68.000 Da et contient 574 acides aminés (YON, 1969).

Elle devient insoluble à pH inférieur à 5 (SLINDE, 1987).
La molécule d'hème présente une absorption maximale à 400 nm (JOPE et al, 1949), (SLINDE, 1987), (CEMPEL et al, 1994).

La mise en évidence de l'hémoglobine et de ses dérivés méthémoglobine, carboxyhémoglobine et oxyhémoglobine est très difficile, leurs spectres d'absorption sont très voisins (HAROLD et HARPER, 1985).

Plusieurs méthodes d'analyses ont été mises au point pour la détection de l'hémoglobine dont la méthode de DRABKIN, la chromatographie sur gel filtration, l'électrophorèse ect (HAN et al, 1994), (JOPE et al, 1949).

III- Les enzymes:

III-1- Définition:

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergiquement, qu'elles accélèrent par activation spécifique (SCRIBAN, 1988).

III-2- Classification des enzymes:

La spécificité des enzymes au niveau des espèces et des molécules transformées est telle que le nombre de molécules identifiées a connu une croissance rapide.

En 1958, seulement 700 enzymes étaient connues, en 1968, 1300 et en 1978, 2200 (MOURANCHE et COSTES, 1985).

Un effort de classification a été entrepris et une nomenclature systématique a été adoptée par la commission internationale des enzymes.

Chaque enzyme est caractérisée par un nom usuel simple, un nom systématique plus informatif de la réaction catalysée et un numéro de code de quatre chiffre précédé de E.C (Enzyme - Classification) (MOURANCHE et COSTES, 1985).

Le premier chiffre varie de 1 à 6 et indique le type de réaction catalysée: (BAILEY et OLLIS, 1986).

1. Les oxydoréductases catalysent les réactions d'oxydo - réduction
2. Les transférases catalysent le transfert des groupements fonctionnels
3. Les hydrolases catalysent les réactions d'hydrolyse
4. Les lyases ou synthases catalysent les réactions d'addition sur les doubles liaisons
5. Les isomérases catalysent les réactions d'isomérisation
6. Les ligases catalysent les réactions d'union de molécules avec utilisation d'ATP.

Le deuxième chiffre indique le type de groupement chimique ou de liaison concernée (sous- classe).

Le troisième chiffre détermine la nature précise des groupements chimiques mis en jeu (sous- sous- classe).

Le quatrième chiffre est le numéro d'ordre d'enregistrement de l'enzyme dans la sous- sous- classe concernée.

Les enzymes peuvent être d'origine végétale (ex: la papaïne) animale (ex: la pepsine) ou microbienne (ex: la neutrase).

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à une enzyme protéolytique d'origine végétale: la papaïne.

III-3- Utilisation industrielle des enzymes: (DURAND et MONSAN, 1982)

L'utilisation industrielle des enzymes n'est pas récente. C'est ainsi que dès 1894, un brevet fut déposé quant à l'emploi d'enzymes d'origine fongique, de nombreuses autres applications furent ensuite proposées, dont le nettoyage, et la clarification de jus de fruits par exemple.

Actuellement dans les industries alimentaires, la tendance est de plus en plus à utiliser des enzymes microbiennes en remplacement des extraits animaux ou végétaux.

La principale industrie alimentaire utilisatrice d'enzymes est la glucoiserie qui, à partir d'un substrat complexe, l'amidon, a su développer un nombre important de transformations faisant appel aux enzymes.

L'industrie laitière, l'industrie de boissons, la biscuiterie et la panification sont elles aussi consommatrices de quantités importantes d'enzymes.

Ces dernières décennies, des protéases tels que la papaïne, la pepsine, les enzymes pancréatiques ainsi que les protéases bactériennes trouvent leurs applications dans la fabrication d'hydrolysats de protéines animales ou végétales.

Les effets recherchés visent à améliorer la digestibilité, le pouvoir émulsifiant, le pouvoir gélifiant et la solubilité des protéines.

Dans les industries autres qu'alimentaires, les enzymes sont aussi utilisées dans le domaine textile, en tannerie, en papétrie et principalement en biosynthèse (acides organiques, acides aminés, antibiotiques).

III-4- La papaïne:

III-4-1- Définition et origine:

La papaïne est une protéase d'origine végétale extraite du latex du fruit vert carica papaya.

Le papayer est une plante largement cultivée dans les régions tropicales et équatoriales.

Toutes les parties de la plante (tige, feuille, fruit) produisent du latex contenant de la papaïne brute (SCRIBAN, 1988).

Celle ci est composée d'un mélange de trois enzymes protéolytiques: la papaïne 10 % (E.C. 3.4.22.2), la chymopapaïne à 45 % (E.C. 3.4.22.6) et le lysozyme à 20 % (DURAND et MONSAN, 1982).

Autrefois, la papaïne séchée de façon artisanale n'avait qu'une qualité très moyenne.

La papaïne pure cristallisée a été obtenue par BALLS en 1937 (SCRIBAN, 1988).

III-4-2- Structure et spécificité:

La papaïne pure est une protéine à groupement sulfhydrile comportant 211 acides aminés et a un poids moléculaire de 23000 Dalton (SCRIBAN, 1988).

Le site de cette enzyme contient un groupement sulfhydrile d'un résidu cysteine qui confère à l'enzyme son pouvoir catalytique (FRUTEAU DE LACLOS, 1986).

La papaïne appartient donc à la famille des cysteines proteinases (MOURANCHE et COSTES, 1985).

C'est une chaîne polypeptidique repliée en deux parties A et B séparées par une cavité, sur les bords de la cavité, la cysteine en position 25 sur la partie A de la molécule et en regard de l'histidine en position 148 sur la partie B à une distance de 4 Angström (Figure 4).

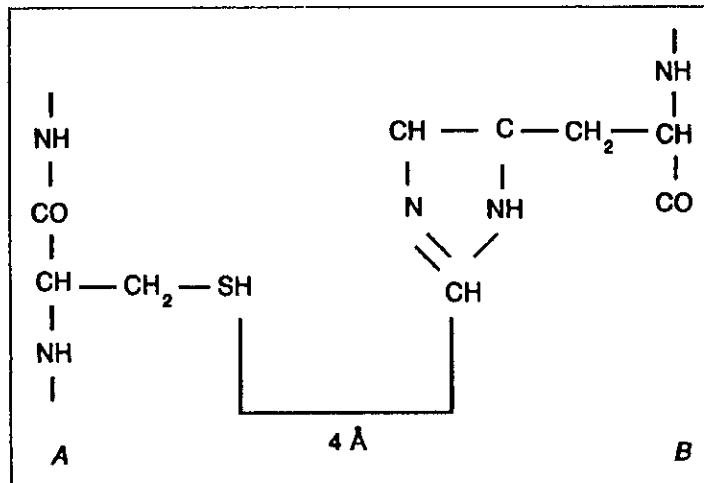


Figure 4: Structure de la papaïne (MOURANCHE et COSTES, 1985).

La papaïne hydrolyse les liaisons peptidiques donnant les résidus suivants: l'arginine et la lysine qui sont des acides aminés à groupements basiques.

De plus, la papaïne reconnaît son substrat peptidique sur une longueur de sept acides aminés et intervient de préférence au voisinage d'une chaîne de phénylalanine pour la coupure (PELMONT, 1989).

La papaïne exige la présence d'un groupement sulfhydryle pour protéger son groupement - SH.

Elle est facilement inhibée par les thiols, les oxydants, les métaux lourds, elle est cependant résistante aux solvants organiques (SCRIBAN, 1988).

Son pH et sa température optimaux se situent dans une gamme assez large respectivement de 5 à 9, et de 50 °C à 65 °C (SCRIBAN, 1988).

Toutes ces caractéristiques multiplient ses domaines d'utilisation.

III-4-3- Utilisation:

En industrie de la viande, la papaïne est utilisée pour l'attendrissement de la viande de boucherie, par injection de celle ci avant abattage ou par immersion de morceaux à attendrir dans un bain de papaïne (DURAND et MONSAN, 1982).

En industrie agro-alimentaire, la papaïne est surtout utilisée pour la fabrication d'hydrolysats de protéines animales ou végétales (DUARTE et al, 1988), (FRUTEAU DE LACLOS, 1986), (GOSH, 1992).

La papaïne est aussi utilisée en remplacement des anticoagulants pour l'obtention de protéolysats très purs (QUAGLIA et MASSACI, 1982).

La papaïne trouve aussi son application dans les domaines médicaux.

Le lait d'arachide hydrolysé par la papaïne immobilisée est utilisé dans la stabilisation physico-chimique du jus de raisin et de pomme (SCRIBAN, 1988).

III-5- Principe de cinétique enzymatique:

L'analyse cinétique des réactions enzymatiques consiste à déterminer les équations des vitesses globales et les constantes cinétiques les caractérisant, pour cela plusieurs modèles ont été mis en place, le plus célèbre est celui de Michaélis-Menten (DELAUDEY, 1986).

III-5-1- Modèle cinétique de Michaélis- Menten:

Toute la cinétique est basée sur les hypothèses suivantes:

- L'enzyme forme avec le substrat un complexe résultant d'une affinité entre son site actif et le substrat.
- Le complexe formé est réversible.
- La vitesse de la réaction enzymatique est la quantité de produit formé par unité de temps.

Cette vitesse est proportionnelle à la concentration en enzyme (SCRIBAN, 1988).



où:

E: Enzyme

S: Substrat

P: Produit

E S: Complexe

La vitesse de réaction enzymatique s'écrit:

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat} \cdot [E S] \quad (1)$$

où k_{cat} , k_{-1} et k_1 sont les constantes de vitesses pour chaque étape.

En 1909, Henri a utilisé ces hypothèses et a aboutit donc à cette équation de vitesse (BAILEY et OLLIS, 1986).

$$v = v_{max} \frac{S}{S + K_m} \quad (2)$$

où:

* v_{max} est la vitesse maximale d'hydrolyse enzymatique

$v_{max} = k_{cat} \cdot [E]_0$ avec $[E]_0$ la concentration initiale en enzyme.

k_{cat} exprime l'activité moléculaire de l'enzyme, en concentration saturante de substrat, soit le nombre de molécules de substrat converties par site actif et par unité de temps.

* K_m est la constante de Michaélis.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad (3)$$

Elle permet d'évaluer l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Dans la majorité des cas, le " K_m apparent" ne reflète plus l'affinité de l'enzyme libre pour son substrat libre, mais plutôt la proportion de substrat lié sans distinction entre les liaisons associatives faibles ou covalentes (MOURANCHE et COSTES, 1985), (MANNHEIM et CHERYAN, 1990), (BRESSOLIER et al, 1988).

Le K_m est exprimé en concentration de substrat, et correspond à la quantité de substrat qui, dans le milieu, permet à l'enzyme de procéder à la vitesse v_{max} / 2 (MOURANCHE et COSTES, 1985).

Le rapport v_{max} / K_m est souvent utilisé pour caractériser l'affinité spécifique d'une enzyme et d'un substrat.

Plus le rapport v_{max} / K_m est grand plus l'affinité est grande (MANNHEIM et CHERYAN, 1990), (BRESSOLIER et al, 1988), (MOURANCHE et COSTES, 1985).

La détermination de ces deux constantes cinétiques K_m et v_{max} se fait graphiquement grâce à une linéarisation de l'équation (2).

Plusieurs transformations ont été proposées, dont principalement, la représentation de Lineweaver - burk:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (4)$$

La représentation de 1/ v en fonction de 1 / S donne lieu à une droite de pente K_m / v_{max} et d'ordonnée à l'origine 1/ v_{max}, et qui coupe l'axe des abscisses en -1 /K_m (Figure 5).

III-5-2- Influence de la présence d'effecteurs:

L'activité enzymatique peut être modifiée par la présence de constituants dits effecteurs d'enzymes.

Il existe deux types d'effecteurs, les activateurs qui augmentent la vitesse de la réaction enzymatique et les inhibiteurs qui diminuent la vitesse de la réaction enzymatique.

Selon la nature de l'inhibiteur, nous distinguons différents types d'inhibitions (BAILEY et OLLIS, 1986), (BEREZIN et MARTINECK, 1977).

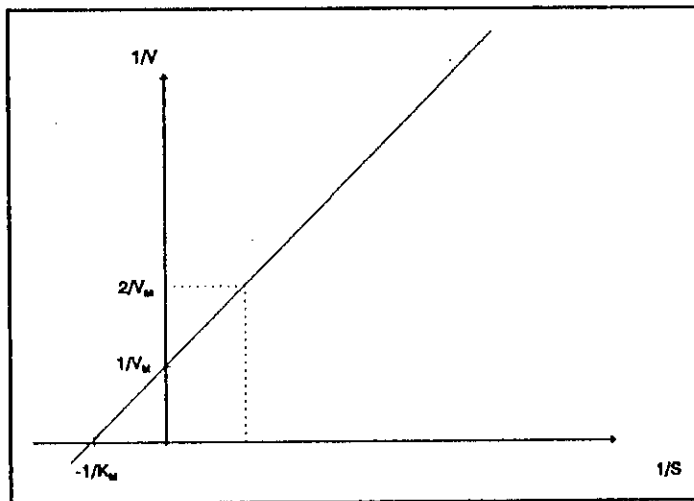


Figure 5: Représentation de Lineweaver et Burk

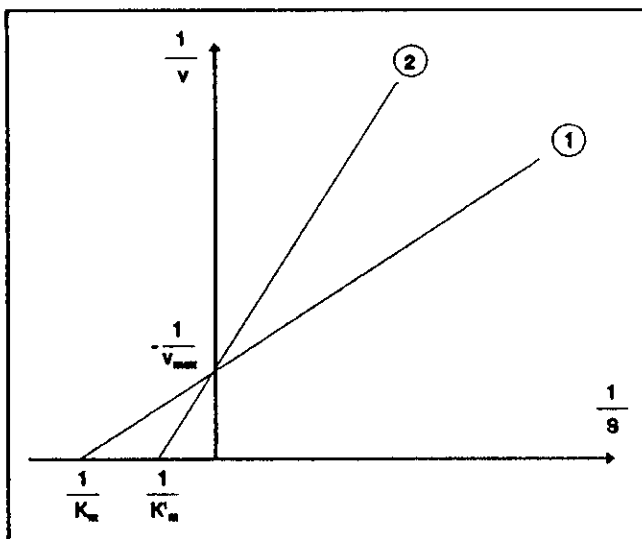


Figure 6: Représentation de Lineweaver et Burk d'une inhibition compétitive

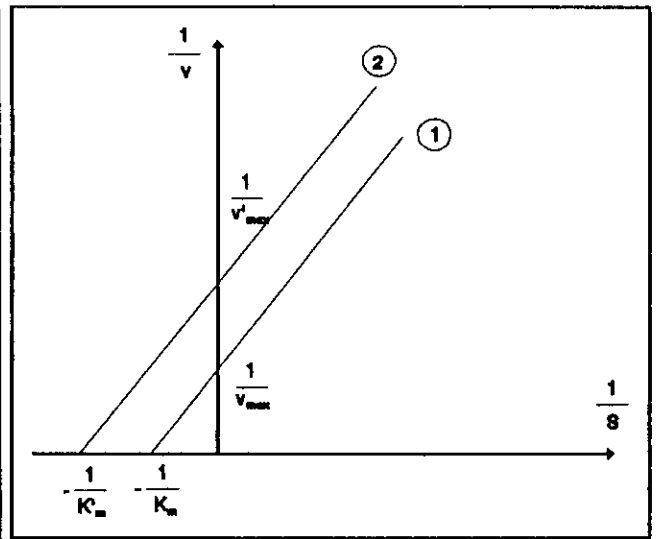


Figure 7: Représentation de Lineweaver et Burk d'une inhibition incompétitive

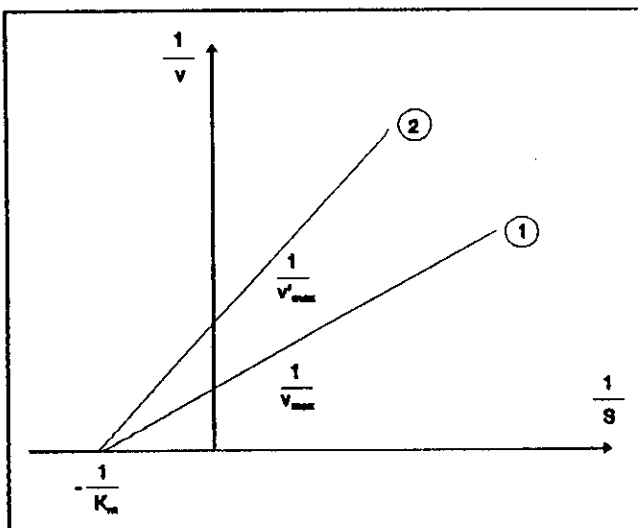


Figure 8: Représentation de Lineweaver et Burk d'une inhibition non compétitive

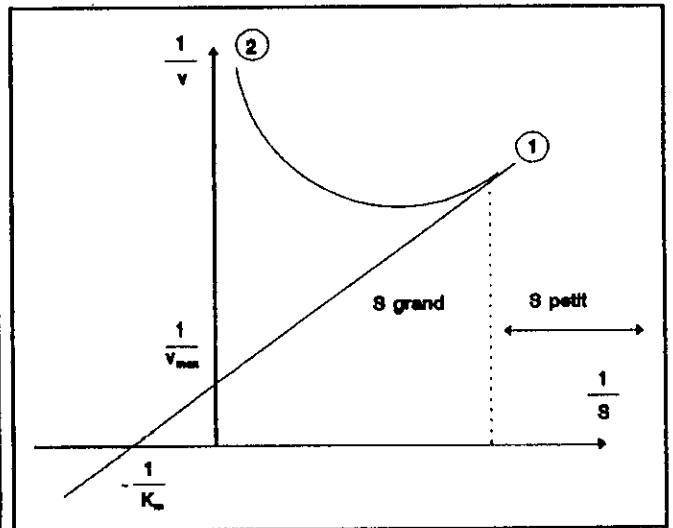
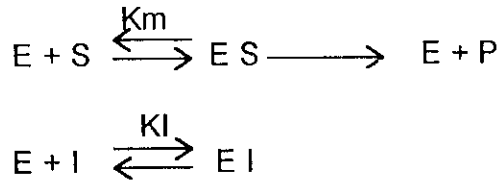


Figure 9: Représentation de Lineweaver et Burk d'une inhibition par le substrat.

- (1): Sans inhibiteur, $[I] = 0$
- (2): Avec inhibiteur à la concentration $[I]$

III-5-2-1- Inhibition compétitive: (Figure 6)

L'inhibiteur est un analyseur structural non métabolisable du substrat, l'enzyme ne le transforme pas en produit:



où: K_I est la constante d'inhibition
 I est l'inhibiteur
 EI est le complexe formé entre l'enzyme et l'inhibiteur

La loi de vitesse transformée selon lineweaver- Burk est:

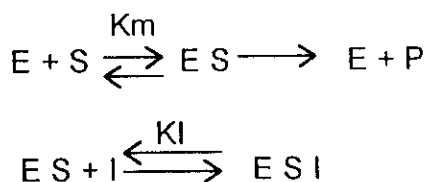
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) \cdot \frac{1}{S} \quad (5)$$

v_{\max} reste constant, le K_m augmente

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)$$

III-5-2-2- Inhibition incompétitive: (Figure 7)

C'est une inhibition par blocage du complexe $E S$



où:

ESI : est le complexe formé entre le complexe ES et l'inhibiteur.

La loi de vitesse transformée selon Lineweaver- Burk est:

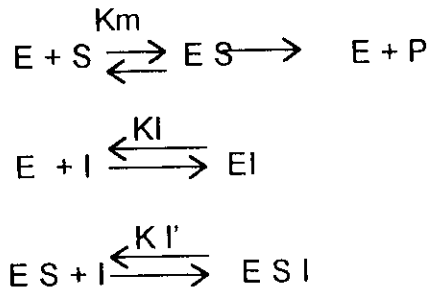
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (6)$$

La pente est la même, K_m augmente et v_{\max} diminue:

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \text{ et } v'_{\max} = \frac{v_{\max}}{(1 + I/K_I)}$$

III-5-2-3- Inhibition non compétitive: (Figure 8)

L'inhibiteur se lie différemment à l'enzyme et au complexe enzyme - substrat:



où: K_I et K_I' sont les constantes d'inhibition. Dans le cas idéal $K_I = K_I'$

La loi de vitesse transformée selon Lineweaver - Burk est:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) + \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I} \right) \cdot \frac{1}{S} \quad (7)$$

v_{\max} diminue et K_m reste constante.

$$v'_{\max} = \frac{v_{\max}}{(1 + I/K_I)}$$

III-5-2-4- Inhibition par le substrat: (Figure 9)

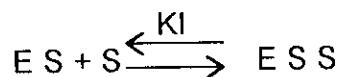
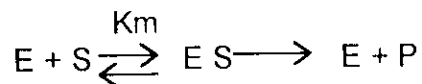
Contrairement aux trois cas précédemment cités, cette forme d'inhibition n'est pas michaelienne.

Lorsque, le substrat est présent en fortes concentrations, la vitesse de la réaction peut diminuer par suite de l'interaction entre le substrat et le complexe E S.

Pour cela, deux mécanismes d'inhibition ont été proposées. (BEREZIN et MARTINECK, 1977).

Les molécules de substrat se fixent sur le complexe E S et le rendent soit actif, soit inactif, dans les deux cas, la fixation de ces molécules se fait sur un site différent du site catalytique, ce site est dit inhibiteur.

a- Cas du complexe E S S inactif:



L'équation de vitesse régissant ce mécanisme est la suivante:

$$v = v_{\max} \frac{S}{K_m + S + S^2 / K_S} \quad (8)$$

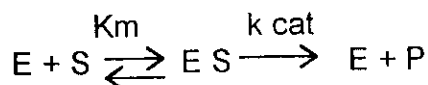
où K_S est la constante d'inhibition par le substrat.

La loi de vitesse transformée selon Lineweaver - burk est:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max} \cdot K_S} \cdot S \quad (9)$$

La représentation de l'inverse de la vitesse $1/v$ en fonction de la concentration en substrat S , donne lieu à une droite de pente $1 / K_S \cdot v_{\max}$ et d'ordonnée à l'origine $1 / v_{\max}$ pour les concentrations élevées ($S \gg$).

b- Cas du complexe E S S actif:



où β est un facteur à déterminer graphiquement

- si $0 < \beta < 1$ une seule molécule de substrat se fixe sur le complexe E S.
- si $\beta > 1$ plusieurs molécules de substrats se fixent sur le complexe E S.
- $\beta = 0$ le complexe E S S est inactif (premier cas).

L'équation de vitesse régissant ce mécanisme est:

$$v = v_{\max} \frac{S \cdot (1 + \beta \cdot S / K_S)}{K_m + S + S^2 / K_S} \quad (10)$$

Pour les concentrations élevées ($S \gg K_s$); l'équation (10) devient:

$$v = v_{\max} \frac{(1 + \beta S / K_s)}{(1 + S / K_s)} \quad (11)$$

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{1 + \beta S / K_s}{1 + S / K_s} \quad (12)$$

et donc:

$$\frac{1}{1 - v/v_{\max}} = \frac{1}{1 - \beta} + \frac{K_s}{1 - \beta} \cdot \frac{1}{S} \quad (13)$$

La représentation de $1 / (1 - v/v_{\max})$ en fonction de $1/S$ donne lieu à une droite de pente $K_s / (1 - \beta)$ et d'ordonnée à l'origine $1 / (1 - \beta)$.

la valeur de β indique que le complexe $E S S$ est actif ($\beta \neq 0$) ou inactif ($\beta=0$).

III-6- Influence des divers paramètres sur la réaction enzymatique:

Les enzymes par leur nature protéique sont très sensibles aux variations des conditions du milieu réactionnel: pH, température, rayonnement ...

En effet, celles ci possèdent des gammes optimales de fonctionnement pour les réactions qu'elles catalysent. (YON, 1969).

III-6-1- Action du pH:

Une variation élevée de pH entraîne une altération de la conformation de la protéine et une ionisation des sites actifs (SCRIBAN, 1988).

La concentration de protons dans le milieu réactionnel conditionne la stabilité des interactions de type électrostatique et la vitesse des échanges de protons (MOURANCHE et COSTES, 1985).

III-6-2- Action de la température:

Comme pour le pH, la température agit sur l'activité enzymatique. Les hautes températures peuvent avoir trois types d'effets sur les enzymes: (YON, 1969):

- a- D'une part, l'augmentation de la température provoque l'accroissement de l'agitation des molécules (S et E) et favorise le contact enzyme-substrat. Le rendement de la réaction enzymatique est ainsi amélioré.

b- D'autre part, la poursuite du traitement thermique conduit à la perte progressive de la structure tertiaire de la protéine. Les liaisons intramoléculaires ainsi rompues, facilitent au substrat l'accès à un plus grand nombre de sites actifs. L'activité enzymatique est augmentée.

c- Cependant, une élévation trop importante de la température provoque une dénaturation excessive de la protéine avec perte de son activité biocatalytique.

Les faibles températures agissent de même sur l'activité de l'enzyme, la congélation- décongélation provoque des pertes notables en activité enzymatique. (YON, 1969).

III- 6-3- Rayonnement et ondes sonores:

Ces deux paramètres agissent aussi sur l'activité enzymatique, ils provoquent en effet chacun de son côté des ruptures de liaisons peptidiques dans l'enzyme.

III- 6-4- Action des effecteurs:

Tous les inhibiteurs et activateurs agissent sur l'activité enzymatique.

Les métaux lourds inhibent, l'activité de la papaine. Les solutions alcalines activent l'hydrolyse de la caseïne par la papaine. (ALAIS, 1975).

III-7- Contrôle de la réaction d'hydrolyse enzymatique par suivi du degré d'hydrolyse:

ADLER- NISSEN, 1982 a été le premier à suivre les réactions d'hydrolyse par détermination du degré d'hydrolyse (D-H).

Ce paramètre mesure le pourcentage de liaisons peptidiques rompues (PIOT, 1989), (ADLER- NISSEN, 1979).

Il a donc émis deux hypothèses:

- Toute réaction d'hydrolyse fait intervenir principalement cinq variables indépendantes: le pH , la température, la concentration en substrat, le rapport E/ S et le temps.

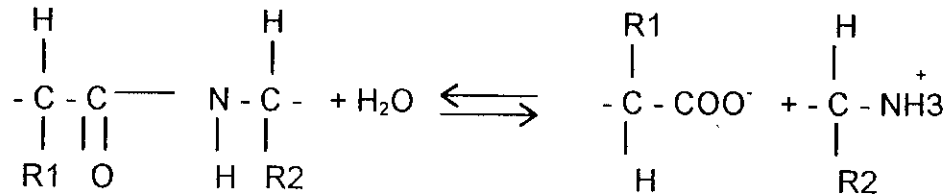
L'optimisation de ces cinq variables conduit à un nombre d'expériences élevé. De plus, au stade industriel, le contrôle de toutes ces variables est très coûteux.

- Le suivi du degré d'hydrolyse remplace le contrôle des quatre variables: température, concentration en substrat, rapport E/ S, et temps, il n' y a alors qu'une variable à contrôler: le pH. (PIOT, 1989).

La technique du pH stat est la plus largement utilisée pour le calcul du degré d'hydrolyse.

Elle a été établie par le Carlsberg Laboratory en 1957, le principe est le suivant:

Selon le pH du milieu réactionnel, la rupture des liaisons peptidiques libère des groupements carboxyles - COOH et amines - NH₃ différemment ionisés:



Le calcul du degré d'hydrolyse diffère donc, selon le pH de travail de l'enzyme (LECONTE, 1989).

- à pH acide:

$$\text{DH} = V_A \cdot N_A \cdot \frac{1}{1 - \alpha} \cdot \frac{1}{M_p} \cdot \frac{1}{h_{\text{tot}}} \cdot 100 \% \quad (14)$$

où: V_A est le volume d'acide consommé

N_A est la normalité de l'acide

α est le degré de dissociation moyen des fonctions carboxyles

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH} - \text{pKa}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}}} \quad \text{avec pKa est la constante d'acidité des fonctions acides.}$$

M_p est la masse de protéines en g.

h_{tot} est le nombre de liaisons peptidiques dans le substrat protéique (meq/g).

- à pH basique:

$$\text{D. H} = V_B \cdot N_B \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{P} \cdot \frac{1}{h_{\text{tot}}} \cdot 100 \% \quad (15)$$

où V_B est le volume de base consommée.

N_B est la normalité de la base.

α est le degré de dissociation moyen des fonctions aminés

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH} - \text{pKb}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKb}}}$$

M_p est la masse de protéines en g.

h_{tot} est le nombre de liaisons peptidiques dans le substrat protéique (meq/g).

Pour l'hémoglobine, h totale est de 8.3 m eq/ g (FRUTEAU DE LACLOS, 1986).

Il existe aussi d'autres méthodes de calcul du D.H:

- L'osmométrie: c'est une méthode de mesure de l'augmentation de l'osmolarité du milieu réactionnel (PIOT, 1989).

- Le dosage spectrophotométrique des fonctions amines libérées. C'est la méthode du trinitrobenzène sulfonique citée par ADLER - NISSEN en 1979.

IV- Les réacteurs enzymatiques:

IV-1- Définition:

Le réacteur biologique constitue le coeur de tout procédé de transformation de la matière sous l'effet de biocatalyseur.

Le bioréacteur est dit fermenteur si ce biocatalyseur est un micro-organisme, il est dit réacteur enzymatique si c'est une enzyme (SCRIBAN, 1988).

Deux principaux types de procédés enzymatique ont été mis au point à l'échelle laboratoire et souvent extrapolés au stade industriel.

- Les procédés de type Batch ou discontinus.

- Les procédés continus.

IV-2- Les procédés de type batch:

Le substrat et le biocatalyseur sont initialement introduits dans le réacteur. Au cours de la réaction il n'y a ni ajout d'autres substrats, ni soutirage de produits (Figure 10) (SCRIBAN, 1988), (BAILEY et OLLIS, 1986).

La plupart des procédés d'hydrolyse enzymatique des protéines, développés au stade pilote ou industriel sont des procédés en batch (PIOT, 1989).

C'est le cas des hydrolysats de caseïne en industrie laitière (MOURANCHE et COSTES, 1985) et des hydrolysats d'amidon (SCRIBAN, 1988).

A l'échelle laboratoire, les études sont nombreuses et portent sur une grande diversité de substrats dont les hydrolysats enzymatique du sang (DUARTE et al, 1988), (NOVO, INDUSTRIES, 1981), les hydrolysats de tête de poulets et plumes (SUROWKA et FIK, 1992).

Les hydrolysats de poissons (HALE, 1969) et les hydrolysats de paille (KOULIAS et al, 1992).

L'utilisation de cette technique ponctuelle présente à la fois des avantages et des inconvénients.

Avantages:

- sa période relativement courte (quelques heures au maximum) limite le développement bactérien.
- Les procédés de type batch permettent aisément les études cinétiques.

Inconvénients:

- Ils nécessitent un traitement ultérieur du milieu réactionnel pour extraire les produits intéressants.
- Ils imposent l'inactivation de l'enzyme par chauffage ou changement de pH pour arrêter la réaction.
- L'analyse du mélange réactionnel est très difficile.

IV-3- Les procédés continus:

Dans ce mode de fonctionnement, il y a une alimentation continue du substrat et un soutirage continu des produits.

Le volume réactionnel est maintenu constant avec un réglage approprié de débit ou de masse (BAILEY et OLLIS, 1986).

IV-3-1- Les réacteurs continus sans recyclage:

Il existe deux types de réacteurs continus suivant le type d'écoulement: (SCRIBAN, 1988)

- Le réacteur continu parfaitement agité: c'est un récipient où le mélange réactionnel est maintenu uniforme grâce à une agitation appropriée (Figure 11).
- Le réacteur continu à écoulement piston: c'est un récipient tubulaire, le mélange du fluide réactionnel se fait dans la direction axiale (Figure 12).

IV-3-2- Les réacteurs continus à membranes:

Dans les réactions enzymatiques, le réacteur continuellement agité est souvent couplé à un dispositif de récupération de l'enzyme: l'Ultrafiltration. (Figure 13).

L'enzyme est donc maintenue en permanence à l'intérieur du réacteur à Ultrafiltre grâce à un choix judicieux de membranes semi - perméables.

La productivité par unité d'enzyme utilisée est nettement supérieure à celle des procédés en batch (TSANGARIS et BATAZIS, 1996).

En enzymologie, ce type de réacteur est particulièrement adapté aux réactions d'hydrolyse de macro- molécules (SCRIBAN, 1988), (HUYARD et al, 1992).

Les études des performances des réacteurs enzymatiques à membranes ont été réalisées par exemple pour des protéines de soja (DEESLIE et CHERYAN, 1991), des protéines de plasma (BRESSOLIER et al, 1988), des protéines du lait (MANNHEIM et CHERYAN, 1990), (NAU et al, 1995), du collagène et des protéines du muscle (DRIOLI, 1992).

De même, TODISCO et al, 1992 ont utilisé ce type de réacteur pour hydrolyser la pectine.

Cependant cette technique présente des inconvénients et des avantages:

Avantages:

- Le bioréacteur enzymatique couplé à un Ultrafiltre est caractérisé par sa grande productivité en hydrolysats péptidiques par unité de masse d'enzyme.
- De plus, le produit est continuellement récupéré.
- Il y a aussi possibilité d'utilisation de plusieurs modules d'Ultrafiltration en série.

Inconvénients:

- Les risques de contamination bactérienne sont multipliés en réacteur continu.
- L'activité enzymatique de l'enzyme est diminuée à cause des problèmes d'adsorption de celle-ci sur la membrane.
- Le substrat non converti risque de s'accumuler dans le réacteur.
- En outre, le colmatage de la membrane limite le temps d'utilisation.

IV-4- Bilan de matière dans les réacteurs enzymatiques:

Le but du bilan de matière dans tout réacteur est d'écrire mathématiquement la loi de conservation de matière, celle ci est définie par (SCRIBAN, 1988).

- Un flux d'alimentation
- Un flux de sortie
- Un flux de disparition
- Un flux de création
- Un flux d'accumulation

Le bilan de matière s'écrit donc (INGHAM et al, 1994):

flux d'alimentation + flux de création = flux de sortie + flux de disparition + flux d'accumulation

En régime permanent, le flux d'accumulation est nulle.

IV-4-1- Cas des bioréacteurs discontinus:

Soit un réacteur enzymatique discontinu de volume V (Figure 10a):

Le flux d'alimentation est nulle.

Le flux de disparition est exprimé par $v \cdot V \cdot dt$

Le flux d'accumulation est exprimé par $V \cdot dS$

Le flux de création est nulle.

où:

v est la vitesse de disparition du substrat

V est le volume du réacteur

S est la concentration en substrat

t est le temps

dS et dt sont les variations en substrat et en temps.

L'équation du bilan devient donc:

$$v \cdot V \cdot dt = - V \cdot dS$$

$$v = - \frac{dS}{dt} \quad (16)$$

Suivant l'expression de la vitesse, l'équation du bilan de matière est exprimée en fonction des constantes cinétiques, caractérisant ce modèle et du taux de conversion x (BAILEY et OLLIS, 1986).

Le taux de conversion x est défini comme étant la fraction de substrat transformée par rapport à la concentration initiale en substrat:

$$x = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (17)$$

dans le cas d'une cinétique michaélienne:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_m}$$

L'équation 16 devient:

$$v_{\max} \cdot dt = - \left(\frac{S + K_m}{S} \right) dS \quad (18)$$

Après intégration:

$$\frac{v_{\max} \cdot t}{K_m} = \frac{S_0 - S}{K_m} + \ln \frac{S_0}{S} \quad (19)$$

En exprimant S en fonction de x , le bilan prend cette forme:

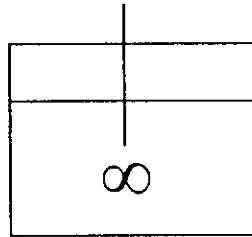
$$\frac{v_{\max} \cdot t}{K_m} = \frac{x S_0}{K_m} + \ln \left(\frac{1}{1 - x} \right) \quad (20)$$

La représentation du taux de conversion x en fonction du nombre adimensionnel.

$t^* = v_{\max} \cdot t / K_m$ pour différentes valeurs de S_0 / K_m , permet le choix de la valeur de S_0 / K_m qui assurent un bon rendement $x \approx 1$ en un minimum de temps t^* (Figure 10b).

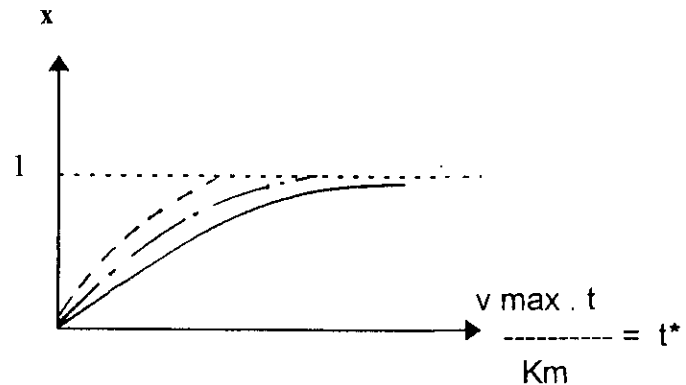
Figure 10: Réacteur discontinu

a- Principe



b- Bilan de matière

_____ $S_0 / K_m = 20$
 - - - - - $S_0 / K_m = 2$
 - - - - - $S_0 / K_m = 0.1$



IV-4-2- Cas des bioréacteurs continus: (INGHAM et al, 1994)

IV-4-2-1- Réacteur continu parfaitement agité: (RPA)

Dans ce type de réacteur, les débits d'entrée et de sortie sont égaux à F , le volume réactionnel est donc maintenu constant (Figure 11).

Le flux de sortie est exprimé par $F \cdot S \cdot dt$

Le flux d'entrée est exprimé par $F \cdot S_0 \cdot dt$

Le flux de disparition du substrat est exprimé par $v \cdot V \cdot dt$

Le flux d'accumulation est exprimé par $V \cdot dS$.

Le flux de création est nulle.

Le bilan s'écrit donc:

$$F \cdot S_0 \cdot dt = F \cdot S \cdot dt + v \cdot V \cdot dt + V \cdot dS \quad (21)$$

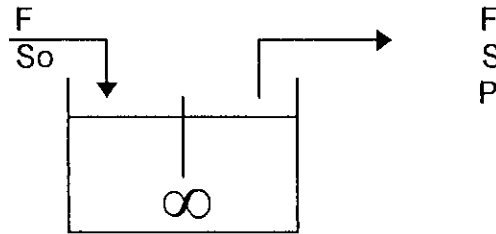
En régime permanent le flux d'accumulation est nulle: l'équation 21 devient après simplification:

$$\frac{S_0 - S}{\theta} = v \quad (22)$$

où θ est temps de séjour moyen, c'est le temps que fait une particule de substrat de l'entrée à la sortie.

$$\theta = \frac{V}{F} \quad (\text{BAILEY, 1986}).$$

Figure 11: Réacteur continu parfaitement agité



IV-4-2-2- Réacteur continu à écoulement piston: (R.P)

C'est un réacteur en forme de tube, le bilan de matière est effectué dans une tranche de volume dV (Figure 12).

- Le flux d'entrée et de sortie sont égaux.
- Le flux d'entrée est exprimé par $F \cdot S \cdot dt$.
- Le flux de sortie est exprimé par $F \cdot (S + dS) \cdot dt$.
- Le flux de disparition du substrat est exprimé par $v \cdot dV \cdot dt$
- Le flux d'accumulation est exprimé par $dV \cdot dS$.

En régime permanent celui ci est nul
 Le flux de création est nulle.
 Le bilan de matière s'écrit donc:
 $F \cdot S \cdot dt = F (S + dS) dt + v \cdot dV \cdot dt$.

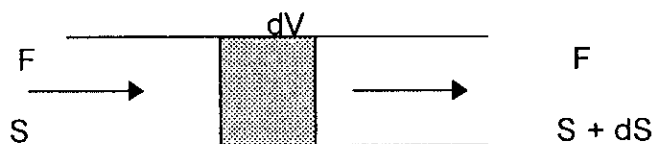
Après simplification:

$$F \cdot dS + v \cdot dV = 0 \quad (23)$$

Sachant que le temps de séjour $\theta = \frac{V}{F}$, on peut exprimer le bilan d'une façon simple:

$$dS = - v \cdot d (V / F) = - v \cdot d\theta$$

Figure 12: Réacteur piston



Dans le cas d'une cinétique michaelienne et en régime permanent:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_m}$$

Le bilan devient après intégration

$$\frac{v_{\max} \cdot \theta}{K_m} = \frac{S_0 - S}{K_m} + \ln \frac{S_0}{S} \quad (24)$$

IV-4-2-3- Réacteur continu couplé à un Ultrafiltre:

Le principe de ce type de réacteur est le même que le réacteur continu parfaitement agité (RPA) simple, mais la fraction soutirée est acheminée vers un dispositif de séparation (l'Ultrafiltration) (Figure 13a).

Une partie est alors recyclée vers le réacteur et une partie recueillie à la sortie du séparateur (le perméat), (INGHAM et al, 1994), (BAILEY et OLLIS, 1986), (MOODY et BAKER, 1987).

Les différents débits sont:

F débit d'entrée dans le réacteur et débit de sortie du module d'Ultrafiltration.

r. F débit recyclé où r est la fraction soutirée
(1 + r) F débit de sortie de réacteur.

Le volume réactionnel est maintenu constant V.

Le flux d'alimentation ou d'entrée est exprimé par :

$$F \cdot S_0 \cdot dt + r \cdot F \cdot S \cdot dt$$

Le flux de sortie du réacteur est exprimé par:

$$(1 + r) F \cdot S \cdot dt.$$

Le flux de disparition du substrat est exprimé par:

$$v \cdot V \cdot dt.$$

Le flux d'accumulation est exprimé par V. dS, en régime permanent celui-ci est nul.

Le flux de création est nul.

Le bilan est donc simplifié (BAILEY et OLLIS, 1986):

$$F \cdot S_0 \, dt + r \cdot F \cdot S \cdot dt = (1 + r) F \cdot S \cdot dt + v \cdot V \cdot dt \quad (25)$$

Après simplification l'équation 25 devient:

$$\frac{F}{V} (S_0 - S) = v \quad (26)$$

Sachant que le temps de séjour $\theta = V/F$

$$\frac{S_0 - S}{\theta} = v \quad (27)$$

L'équation du bilan de matière en réacteur continu parfaitement agité simple est la même en réacteur continu couplé à un Ultrafiltre.

Dans le cas d'une cinétique michaélienne et en régime permanent:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_m}$$

Le bilan devient:

$$\frac{S_0 - S}{\theta} = v_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_m}$$

$$v_{\max} \cdot \theta = (S_0 - S) \left(\frac{S + K_m}{S} \right) = \left(\frac{S_0 - S}{S} \right) (S + K_m)$$

$$v_{\max} \cdot \theta = (S_0 - S) + K_m \left(\frac{S_0 - S}{S} \right) \quad (28)$$

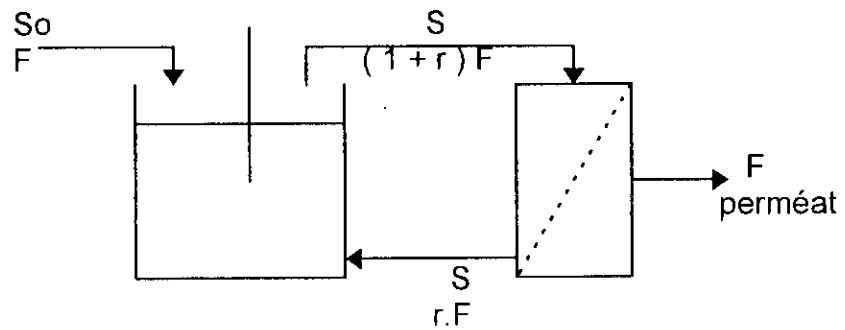
En introduisant le taux de conversion $x = \frac{S_0 - S}{S_0}$ l'équation 28 s'écrit:

$$\frac{v \text{ max. } \theta}{K_m} = \frac{x S_0}{K_m} + \frac{x}{1-x} \quad (29)$$

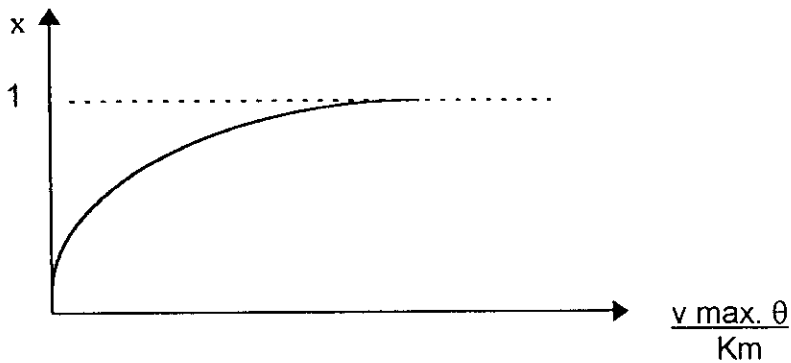
La représentation du taux de conversion x en fonction du nombre adimensionnel $v \text{ max. } \theta / K_m$, permet la détermination du temps de séjour minimal qui assure un rendement maximal $x = 1$. (Figure 13b)

Figure 13: Réacteur continu couplé à un Ultrafiltre

a- Principe



b- Bilan de matière



V- L'ultrafiltration :

Les procédés à membranes sont des techniques avantageuses du point de vue énergie, rapidité et économie.

Elles apportent un moyen de purification efficace, sans générer de pollutions supplémentaires.

Les techniques à membranes les plus utilisées sont :

La Microfiltration, l'Ultrafiltration, l'Osmose Inverse, l'Electrodialyse, la Dialyse.

V-1- Principe de l'ultrafiltration :

L'ultrafiltration est un procédé membranaire permettant la séparation de macromolécules en phase liquide par perméation à travers une membrane semi perméable, sous l'action d'un gradient de pression (GOLDBERG et CHEVRIER, 1979), (RAO et Al, 1994).

L'ultrafiltration se présente comme une technique membranaire moyennement fine, elle concerne des solutions de composés ioniques ou moléculaires de masse molaire élevée.

Le tableau 3 situe l'ultrafiltration par rapport aux autres procédés mécanomembranaires.

L'ultrafiltration d'une solution génère deux effluents (figure 14) :

- Le retentat contient toutes les grosses molécules qui ne peuvent pas traverser les pores de la membrane.
- Le perméat est composé du soluté et des particules à faibles poids moléculaires inférieur au seuil de coupure de la membrane.

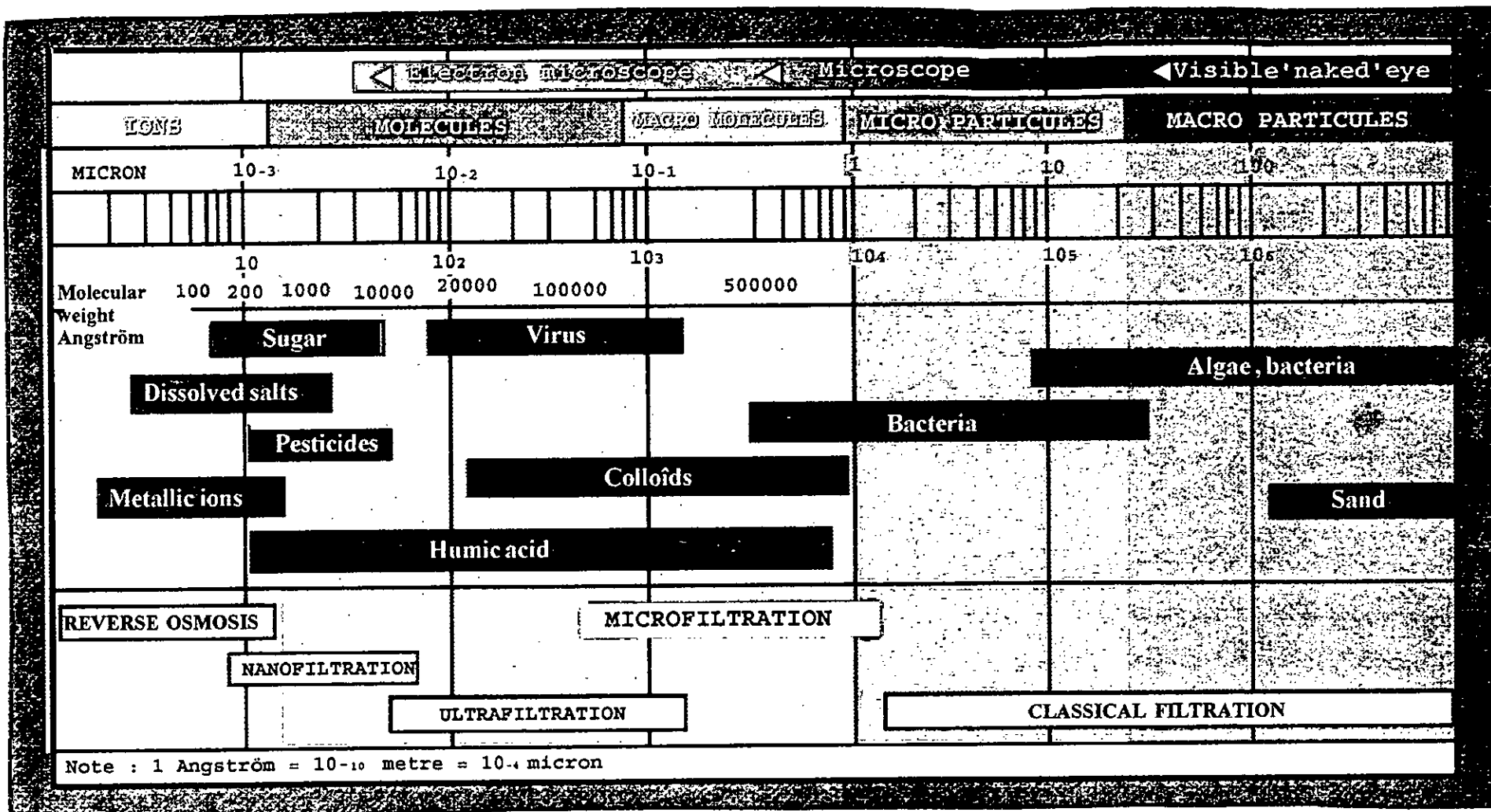
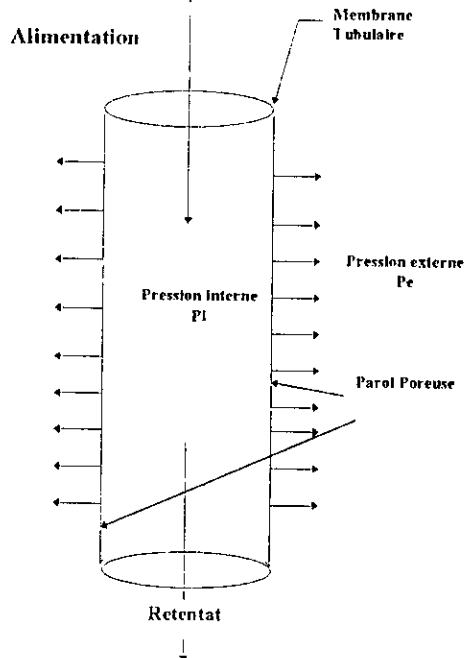


TABLEAU 3 : SITUATION DE L'ULTRAFILTRATION

Figure 14 : Principe de l'ultrafiltration



V- 2- Les membranes d'ultrafiltration :

La membrane constitue l'élément essentiel des techniques de séparation membranaires en général et de l'ultrafiltration en particulier (BRUN, 1989).

Les membranes permselectives sont actuellement classées en deux catégories correspondant à leur structure : - Les membranes minérales et organiques.

Parmi les membranes organiques utilisées, les polycondensats aromatiques présentent beaucoup d'intérêt, elles résistent aux fortes températures et aux pH extrêmes.

Les membranes minérales connaissent un développement plus important et présentent l'avantage d'être résistantes aux agents chimiques.

De plus, elles ont une grande stabilité thermique ($400C^\circ$) et une bonne résistance aux grandes pressions (20 à 30 bars) (BRUN,1989). Les plus connues sont les membranes carbosep formées d'oxyde de Zirconium supporté sur du carbone graphite.

Elles peuvent ultrafiltrer des solutions très visqueuses, et sont insensibles aux oxydants, et aux attaques bactériennes, d'où leurs applications intensives dans les bioréacteurs à membranes pour les réactions enzymatiques (RAO et al, 1994).

Toute membrane est caractérisée par sa perméabilité et sa sélectivité. Cette dernière est quantifiée par son seuil de coupure et son taux de rejet.

Le seuil de coupure de la membrane est la masse molaire correspondant à une rétention supérieure à 90%. Pour ce type d'opération, on utilise en général

des solutions proteiques considérées comme solutions de références et cela dans des conditions bien définies.

Le taux de rejet apparent évalue la fraction de soluté retenue par la membrane.

$$R \% = \left(1 - \frac{C_p}{C_o} \right) \cdot 100 \quad (30)$$

Où: C_p est la concentration du soluté dans le perméat

C_o est la concentration du soluté avant la traversée de la membrane.

V-3- Les différents procédés d'ultrafiltration :

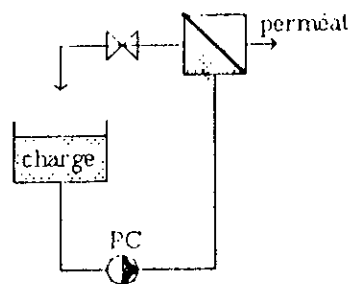
L'ultrafiltration s'effectue de trois manières différentes :

V-3-1 - Ultrafiltration en mode discontinue :

Le mode discontinue est souvent utilisé, le retentat est recirculé vers un réservoir et le concentrat est retenue par la membrane (figure 15) (BRUN , 1989).

Ce procédé est utilisé pour les petites unités (CARBOSEP , 1994)

Figure 15 : Ultrafiltration en mode discontinue

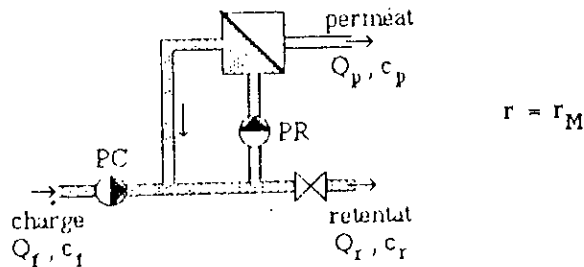


V-3-2- Ultrafiltration en mode continu :

Le retentat n'est pas recyclé, il est extrait de manière continue, une deuxième pompe recircule une partie du retentat et de la solution à ultrafiltrer, vers la membrane (BRUN, 1989).

Le perméat est recueilli de manière continue, le débit d'alimentation doit être égale à la somme des débits de perméat et du retentat (figure 16).

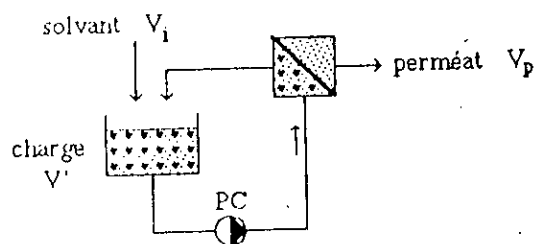
Figure 16 : Ultrafiltration en mode continu



V-3-3- Diafiltration :

Le mode diafiltration est similaire au mode discontinue mais le volume de perméat est remplacé à taux constant par un même volume de solvant dans le retentat (figure 17).

Figure 17 : Diafiltration



Les molécules et les cellules sont ainsi purifiées.

V-4- Modèles d'ultrafiltration :

Pour comprendre et modéliser le mécanisme de l'ultrafiltration, plusieurs chercheurs ont émis des modèles.

V-4-1- Modèle du tamis moléculaire :

La membrane est assimilée à un ensemble de pores symétriques identiques, le flux du solvant J_v est proportionnel à la pression ΔP et obéit à la loi de POISEUILLE.

$$J_v = \frac{N \cdot \pi \cdot (r_p)^4}{8 \cdot \eta \cdot e} \cdot \Delta P \quad (31)$$

Où J_v est le flux de perméat (l/h.m²)

r_p est le rayon moyen des pores (m)

e est l'épaisseur de la membrane (m)

N est le nombre des pores

ΔP est la pression trans-membranaire moyenne $\Delta P = \frac{P_e + P_s}{2}$ en bar

P_e est la pression d'entrée.

P_s est la pression de sortie

ΔP_f est la perte de charge souvent négligeable $\Delta P_f = P_e - P_s$

Cette loi a été simplifiée par DARCY :

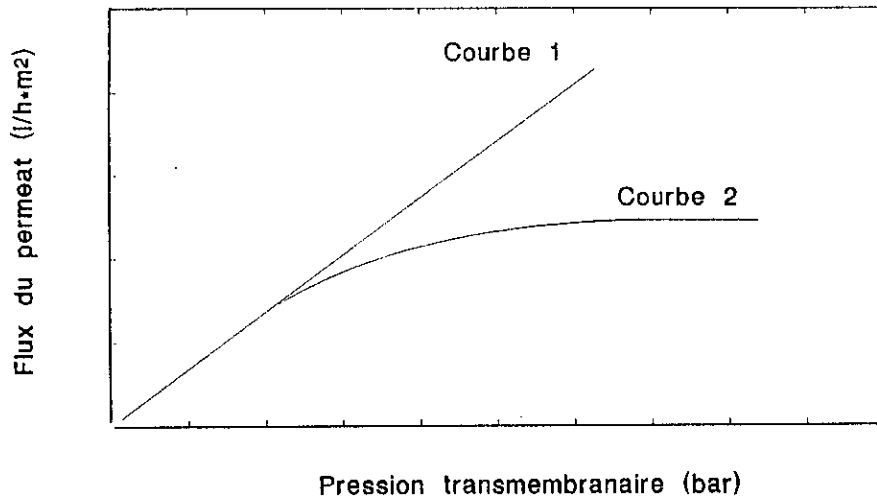
$$J_v = L_p \cdot \Delta P \quad (32)$$

Où L_p est la perméabilité à l'eau. Ce dernier paramètre est une caractéristique de la membrane.

La figure 18 représente les flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire pour un solvant pur (courbe 1) et pour une solution de macromolécules (courbe 2).

La courbe 1 obéit à la loi de DARCY, ce n'est pas le cas pour la courbe 2, une couche de polarisation se forme au fur et à mesure entraînant une accumulation des molécules du soluté au voisinage de la membrane.

Figure 18 : Evolution du flux de perméat en fonction de la pression trans membranaire



V-4-2- Modèle du film :

Le modèle suppose que le transfert se fait dans une couche limite d'épaisseur δ représenté en figure 19.

Le bilan en flux s'écrit en régime stationnaire

Le flux de transfert de matière = flux de diffusion exprimé par la loi de

FICK

$$J_v \cdot C - J_v \cdot C_p = D \cdot \frac{dC}{dx}$$

après intégration :

$$J_v = \frac{D}{\delta} \cdot \ln \frac{(C_o - C_p)}{(C_m - C_p)} \quad (33)$$

Où C est la concentration de la solution à ultrafiltrer (g/l).

C_p est la concentration du perméat (g/l).

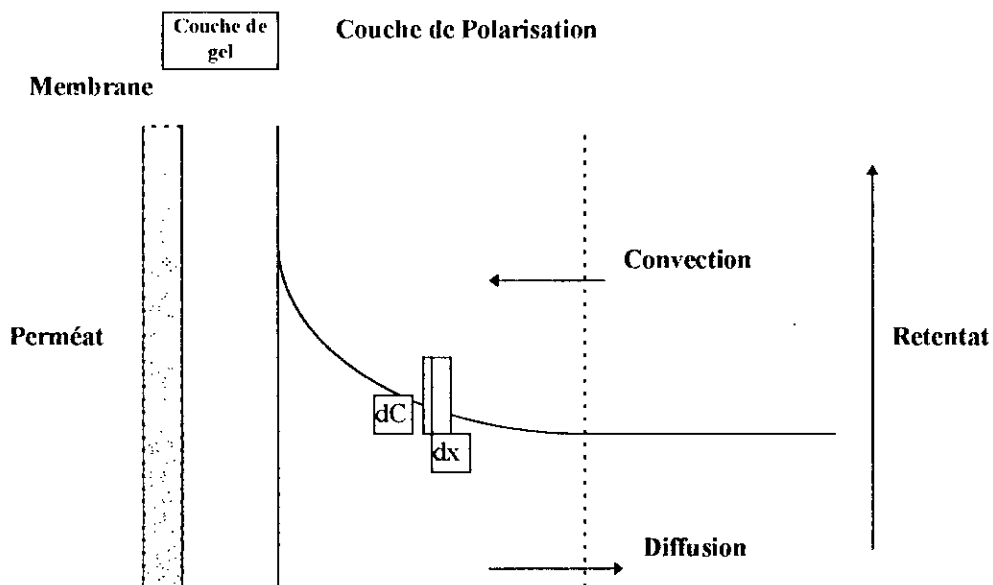
C_o est la concentration initiale de la solution (g/l).

C_m est la concentration au voisinage de la membrane (g/l).

D est le coefficient de diffusion (m^2/s)

δ est l'épaisseur de la couche de polarisation (m).

Figure 19 : Modèle du film



V-4-3- Modèle Osmotique :

La différence de concentrations de part et d'autre de la membrane donne lieu à une pression osmotique $\Delta\Pi$ non négligeable devant la pression transmembranaire ΔP (figure 20), le flux de transfert s'écrit alors :

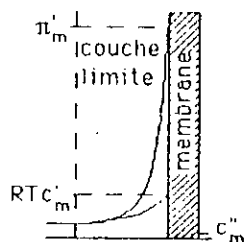
$$J_v = \frac{\Delta P - \sigma \cdot \Delta\Pi}{R_m \cdot \mu} \quad (34)$$

Où μ est la viscosité dynamique (Pa .s).

σ est la coefficient de KEDEM

R_m est la résistance de la membrane propre.

Figure 20 : Modèle osmotique



V-5- Mécanisme de colmatage :

Le facteur limitant de l'utilisation de l'ultrafiltration en industrie alimentaire est la chute au cours du temps du flux de perméat due principalement à la polarisation de concentration puis au colmatage (RAO et al, 1994), (VAN DER HORST, 1995).

Les macromolécules retenues par la membrane tendent à s'accumuler pour former une couche limite au voisinage de l'interface, le flux de perméat diminue au début, pour atteindre une valeur stable en régime stationnaire, ce phénomène est dit polarisation de concentration.

Au cours du colmatage, le flux de perméat n'est pas limitée d'une manière constante en régime stationnaire, celui ci décroît régulièrement (BRUN, 1989).

Le colmatage a lieu en trois étapes :

- L'établissement de la polarisation de concentration
- L'adsorption des macromolécules.
- La polymérisation de la couche adsorbée.

Le problème fondamental est la réduction de cette couche limite et la maîtrise de son évolution.

Plusieurs solutions sont donc proposées par BRUN, (1989) et PUNIDADAS et al (1990).

- La réduction de la pression pour diminuer le flux transmembranaire.
- L'utilisation de vitesses élevées, ou de turbulences au niveau des pores membranaires et diminuer ainsi l'épaisseur de la couche limite.

HERMIA (1982) cité par BOWEN et al (1995) décrit deux mécanismes de colmatage des membranes par des protéines :

- Le SBM (Standard Blocking Model) ou colmatage interne (Irréversible).

Les pores membranaires sont bloqués, leur volume interne diminue au cours du temps, un modèle mathématique caractérise ce mécanisme.

$$t/V_p = K_{SBM} \cdot t/2 + 1/Q_0 \quad (35)$$

Où t est le temps (h)
 V_p est le volume du perméat (l)
 K_{SBM} est une constante
 Q_0 est le débit de perméat initial.

La représentation de t/V_p en fonction de t est linéaire.

- Le CFM (Cake Filtration Model) ou colmatage externe (Réversible).

Une couche de protéines se déposent sur la surface de la membrane. La caractérisation mathématique de ce modèle est :

$$t/V_p = K_{CFM} \cdot V_p / 2 + 1/Q_0 \quad (36)$$

où K_{CFM} est une constante

L'évolution de t/V_p en fonction de V_p est alors linéaire.

Ces deux modèles ont été utilisés pour plusieurs substrats protéiques, dont la bovine sérum albumine, et une enzyme (YADH) yeast alcool déshydrogénase par l'équipe de BOWEN en 1993 et 1995.

V-6- Domaines d'application de l'ultrafiltration :

L'avènement de l'ultrafiltration et son expansion au domaine industriel a diversifié ses champs d'applications.

Dans les industries automobiles, l'ultrafiltration des solutions de lavage permet de récupérer l'eau déminéralisée et de la réutiliser.

Elle permet aussi la régénération des huiles moteurs.

Dans les industries agro-alimentaires, l'ultrafiltration est utilisée pour la récupération et la valorisation du lactosérum (RAO et al, 1994), la récupération des protéines du plasma (GOLDBERG et CHEVRIER, 1979), la concentration des protéines des sous produits solides d'abattoirs (DALEV, 1994).

En industrie pharmaceutique, cette technique trouve son application dans l'extraction, la concentration et la purification des antibiotiques, des acides aminés et des protéines (BRUN, 1989).

Dans les industries de boissons, la concentration et la clarification des jus de fruit et de légumes frais (ou fermentés) sont souvent effectuées grâce à l'ultrafiltration (BRUN, 1989).

En traitement des eaux, les effluents de papeteries de tanneries et d'industries textiles sont aussi traités par l'ultrafiltration (BRUN, 1989).

VI- Etudes antérieures :

L'abattoir permet de transformer des animaux vivants en carcasses de viande qui sont destinées à la consommation alimentaire humaine (LANG, 1990).

Les opérations d'abattage et de découpes successives produisent divers sous produits et déchets récupérables regroupés sous le nom de 5ème quartier (JOBLING, 1986).

- Les peaux et cuirs sont utilisés en industries de chaussures, en maroquinerie etc...

- Les suifs et graisses de récupérations sont traitées et utilisées en alimentation du bétail (BOURGEOIS et LEROUX, 1982).

- Les os sont souvent transformés en farine pour l'alimentation animale, ils sont aussi utilisés pour la fabrication de gélatine utilisée en industrie de confiserie (LANG, 1990), (ZARKADAS et al , 1995).

D'autre part, la fraction soluble des protéines d'os est souvent hydrolysée et utilisée en diététiques, ou en alimentation humaine (JOBLING, 1986).

- Les glandes et organes opothérapiques sont utilisées pour l'extraction des hormones et des enzymes telles que la pepsine, diastase, héparine....).
- Les cornes, les sabots, les ongles, les soies et les poils sont récupérés pour la confection de peignes et de divers objets.
- Les boyaux sont utilisés pour fabriquer les fils chirurgicaux.

D'après NILSSEN et GOLDEN, (1920), la valeur du sang a depuis longtemps été appréciée dans les milieux ruraux, il était collecté proprement et conservé sous forme de pain et souvent utilisé en alimentation (WISMER - PEDERSEN, 1988).

En 1985, un physicien Danois P.L. PANUM a publié un livre de recette de cuisine pour inciter les gens à utiliser le sang en alimentation humaine (WISMER - PEDERSEN ,1988).

Actuellement les modes de valorisation du sang entier ou de ces constituants sont nombreux et variés, mais rares sont les procédés qui ont aboutis à l'échelle industrielle (LANG, 1990).

La récupération du sang entier ou du plasma a déjà connu un essort considérable contrairement au cruor.

Son utilisation est souvent limitée par la couleur intense et persistante qui se retrouve dans tous les produits dérivés.

VI-1- Récupération du sang entier :

Le sang entier fut pendant de longues décennies utilisé comme compost. (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985).

Mais actuellement, le sang est surtout transformé en farine et utilisé en alimentation animale (pisciculture, animaux de compagnie, bétails etc....) (LANG, 1990), (LIU et al, 1989).

Le sang est aussi utilisé dans les industries du bois pour le collage, il est employé dans la fabrication de mortier, bétons et charbon actifs (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985).

L'incorporation de la fraction protéique du sang dans les saucisses et les pattés de viande a enrichie la valeur nutritionnelle de ce type de produits. (OELLINGRATH et SLINDE, 1988), (CALDIRONI et OCKERMAN, 1982). QUAGLIA et MASSACI(1982) ont utilisé plusieurs enzymes protéolytiques pour hydrolyser le sang.

VI-2- Récupération du plasma :

Les modes de valorisation du plasma sont nombreux :

Il est utilisé pour la salaison et l'industrie pharmaceutique comme émulsifiant (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985).

De plus, l'incorporation de poudres de plasma dans les produits de charcuteries enrichie leur potentiel protéique (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985).

Les techniques à membranes telles que l'ultrafiltration, l'osmose inverse et la microfiltration offrent à l'industrie de grandes possibilités, elles permettent de concentrer les protéines du plasma (GOLDBERG et CHEVRIER, 1979) , (DOCARMO GONCALVES et CALEMBECK, 1989), (DELANEY et al, 1977, 1975), (JOBLING, 1986) , (VAN DER HORST, 1995).

L'ultrafiltration des protéines du plasma est améliorée par ajouts de promoteurs de turbulences tels que le courant électrique (RIOS, 1988), et des pulsations du liquide à ultrafiltrer (NAJARIAN et BELHOUSE, 1996).

L'extraction des différentes protéines du plasma tel que la prothrombine, la thrombine, le fibrinogène etc..., permet leur utilisation en pharmacie (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985).

L'hydrolyse enzymatique du plasma dans un bioréacteur à membrane permet d'obtenir un produit péptidique de bonne qualité, utilisable dans les milieux de culture (BRESSOLIER et al, 1988) , (BEDNARSKI et LEMAN, 1979).

VI-3- Récupération du cruor :

L'utilisation du cruor directement est limitée par sa couleur. Différents traitements ont donc été mis au point pour éliminer, masquer ou stabiliser celle-ci.

VI -3-1- Utilisation directe :

Le cruor est souvent séché par atomisation, la poudre de cruor obtenue contient 92% de matière sèche et 89% de protéines (l'hémoglobine) avec une très bonne solubilité.

L'utilisation de faibles quantités de cette poudre en alimentation animale a donné de bons résultats (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985).

VI-3-2- Le masquage de la couleur :

Pour masquer la couleur indésirable de l'hème, SMIRNISTSKAYA et al (1973) procèdent au mélange du cruor avec du lait écrémé à 95°C pendant 5 minutes avec du chlorure de calcium $Ca Cl_2$, le produit obtenu est ajouté aux saucisses à 15% (WISMER - PEDERSEN, 1988).

ZAYAS et al (1975), produisent un mélange d'émulsions de cruor et de graisses de caséinate de sodium et eau grâce aux ultrasons.

Ce dernier procédé a été amélioré par les travaux de WISMER - PEDERSEN (1979), l'émulsification est obtenue dans un homogénéisateur sous pression (WISMER - PEDERSEN, 1988).

VI-3-3- La stabilisation de la couleur :

La technique vise à stabiliser la couleur rouge de l'oxyhémoglobine, par l'ajout de réducteurs appropriés. GUITEREZ et al (1982), ont utilisé un solvant organique polaire l'éthanol et ont obtenu un produit à coloration stable et riche en protéines (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985).

CULIOLI et al (1981), ont confilé des fibres de protéines végétales avec l'hémoglobine stabilisée par nitrosylation (ajout de nitrites).

Le produit ainsi obtenu, présente l'aspect d'un produit carné, il subsiste néanmoins un inconvénient majeur dans cette technique, c'est la formation de substances cancérigènes telles que les nitroamines (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985), (WISMER - PEDERSEN, 1988).

En 1985, LEVNEDS MIDDELSTYRELSEN et al cité par WISMER - PEDERSEN ont ajouté seulement 60 mg de nitrites par kilogramme d'hémoglobine, ils ont ainsi obtenu un produit à coloration stable, et à grande sécurité du point de vue bactériologique.

La réglementation et les services de contrôles alimentaires Danois ont donc fixé la dose de nitrites à 60 mg/kg dans les industries de saussage.

QUEBRIAC et BOURGEOIS, (1985), citent l'utilisation de l'oxyde de carbone comme autre stabilisateur de la couleur, la carboxyhémoglobine ainsi formée est additionnée au produit alimentaire mais à petites doses à cause de sa toxicité.

ITO et al (1990), ont mis au point une technique électrolytique pour préparer un colorant naturel et stable, grâce à une simple électrolyse de la solution protéique d'hémoglobine dans une solution d'ascorbate de sodium et de nitrites de sodium.

Dans l'hémoglobine, le fer est sous deux formes :

- Ferreux Fe^{2+} dans l'oxyhémoglobine de couleur rouge.
- Ferrique Fe^{3+} dans la méthémoglobine de couleur brune.

Par une réduction électrolytique de la méthémoglobine (Fe^{3+}) au niveau de la cathode, on obtient une solution d'oxyhémoglobine (Fe^{2+}).

VI-3-4- Décoloration du cruor :

Le masquage ou la stabilisation de la couleur de l'hémoglobine ont permis d'utiliser le cruor dans les produits alimentaires, mais en très faibles doses.

Plusieurs chercheurs ont donc pensé à éliminer le pigment héminique, responsable de cette couleur, suivant deux procédés.

VI-3-4-1- Décoloration sans hydrolyse :

La séparation hème-globine permet d'obtenir un concentré protéique à haute valeur (la globine).

les méthodes sont nombreuses et variées.

a - Utilisation de solvants organiques :

ANSON et MIRSKY en 1930 ont été les premiers à utiliser l'acétone acidifiée par l'acide chlorhydrique à 0°C, le chlorhydrate de protéine ainsi obtenu et neutralisé par de la soude et le résidu insoluble évacué.

DRABKIN en 1945, JOPE et al en 1949 et ROSSI FANELLI en 1959 ont poursuivi dans cette voie, ils ont utilisé l'acétone acidifiée refroidie à - 15°C (WISMER - PEDERSEN, 1988) (JOPE et al, 1949).

TYBOR et al (1973, 1975) reprennent ces travaux et transforment l'hémoglobine en choléméthémoglobine sous l'action de l'acide ascorbique, avant d'extraire l'hème, grâce à l'acétone acidifiée.

Cette équipe de chercheur a pu mettre au point un procédé de décoloration en continu avec récupération de l'acétone par distillation.

Toutes la technique a pu être extrapolée au niveau pilote, les poudres de cruor obtenues en fin de procédé présentent un pouvoir émulsifiant et une stabilité remarquable.

L'utilisation de ce solvant est actuellement limitée à cause des quantités d'acétone élevées 50 litres par kilogramme de globine et des résidus d'acétone difficile à éliminer de la globine.

PALMIN et PETROVA (1972), ont fait précipiter l'hémoglobine par addition de l'acide hypochlorhydrique HClO et de chlorure de sodium NaCl, avant d'extraire l'hème par une plus faible quantité d'acétone que précédemment (WISMER - PEDERSEN, 1988)

TEALE en 1957 et YONETANI en 1967 cités par WISMER - PEDERSEN (1988), ont extrait l'hème avec du méthyléthylcétone butanone.

LINDROOS et al (1977) cités par QUEBRIAC ainsi que CALDIRONI et OCKERMAN (1982) ont utilisé l'éthanol avec succès.

b - Utilisation de l'eau oxygénée et influence du pH :

L'hémoglobine peut être décolorée par l'eau oxygénée à 70°C, ce nouveau procédé a été découvert par DROSTE et repris par OORD et WESTDROP en 1979, la globine est cependant dénaturée ; elle perd ses propriétés fonctionnelles (QUEBRIAC et BOURGEOIS , 1985).

SLINDE, (1987), arrive à séparer l'hème de la globine par une simple diminution du pH, le pH optimal se situe au environ de 4,7.

Le produit obtenu est utilisé pour la coloration des saucissons italiens (Salami).

c - Utilisation d'adsorbant :

La décoloration par solvants organiques provoque la coagulation des protéines et les résidues d'hème sont très difficiles à éliminer.

L'adsorption du pigment tétrapyrrolytique s'avère être une alternative sans équivoque.

En 1978, MARC et VANCINOVA ont comparé les performances de plusieurs adsorbants (Charbon actif, Carboxy méthyle cellulose (C.M.C), la silice, le dioxyde de manganèse). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le charbon actif, la concentration en hème dans le produit final est très faible (WISMER - PEDERSEN, 1988).

SATO et al (1981) utilisent la carboxyméthylcellulose sur colonne et obtiennent une très bonne décoloration, mais le coût élevé de la C.M.C oblige cette même équipe à trouver un prétraitement adéquat de l'hémoglobine avant son passage sur la C.M.C.

HAYAKAWA et al (1986) ont donc optimisé l'effet du chauffage de l'hémoglobine avant adsorption sur C.M.C, sur la qualité et le coût de la globine obtenue.

AUTIO et al (1983), ont montré que la C.M.C solubilisée décolore efficacement l'hémoglobine acidifiée. La séparation hème-globine se fait par centrifugation, le procédé a abouti à l'échelle industrielle.

La C.M.C est plus économique qu'en colonne, mais la globine contient bien plus de résidus d'hème.

LEE et al (1990), ont utilisé l'alginate de sodium en solution, en se basant sur les conclusions de COZZI en 1969 « L'alginate de sodium est quatre fois plus efficace en échange d'ions que la carboxyméthyl cellulose ». Après décoloration le pourcentage peptidique est de 65% et le rendement d'élimination de l'hème est de 97,6%.

VI-3-4-2- Décoloration avec hydrolyse :

Une autre approche pour la séparation du pigment hémique de l'hémoglobine est l'action des enzymes protéolytiques.

L'hydrolyse enzymatique partielle de l'hémoglobine libère en effet l'hème.

Les travaux de STACKOWICZ et al (1977), ont montré que l'utilisation de l'alcalase permet la préparation d'un hydrolysât d'hémoglobine peu coloré.

L'hémoglobine subit un prétraitement alcalin avec de la soude 5N. L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans un réacteur couplé à une cellule d'ultrafiltration, trois membranes de seuil de coupure différent sont utilisées.

L'étude de leurs influence sur le déroulement de la réaction, et sur les propriétés fonctionnelles du produit a orienté le choix du meilleur seuil de coupure.

En 1978, HALD CHRISTENSEN et al ont aussi utilisé l'alcalase pour hydrolyser l'hémoglobine.

Dans le cadre des recherches effectuées par l'industrie Danoise NOVO, un hémolysât contenant 8% d'hémoglobine est aussi hydrolysé par l'alcalase à pH 8,5 et à 55°C, jusqu'à un degré d'hydrolyse de 20%. L'enzyme est ensuite inactivée par du HCl. Le milieu réactionnel de couleur brun foncé est ensuite centrifugé ou ultrafiltré pour récupérer le mélange péptidique.

Le charbon actif est alors utilisé pour décolorer complètement l'hydrolysât, le produit obtenu est concentré, évaporé puis séché (QUEBRIAC et BOUEGEOIS, 1985).

DREPPER et al (1979) ont expérimenté une protéinase AP114, OLSEN et al (1983) ont suggéré l'utilisation de l'alcalase avec un degré d'hydrolyse maximal de 20% et un rendement péptidique de 78 - 85% pour éviter le goût amer de l'hydrolysât (WISMER - PEDERSEN, 1988).

HALACZ et al (1982), ont comparé les performances de plusieurs enzymes immobilisées et libres. Ils ont constaté que l'hydrolysât subit une décoloration appréciable, de plus la clarification est plus élevée après 12 heures d'incubation.

En 1984, HALACZ poursuit ses travaux et conclut que l'alkalase est une des enzymes les plus performantes pour décolorer le cruor.

QUAGLIA et MASSACI (1982), ont combiné l'action d'une enzyme anticoagulante : la papaïne et d'un solvant organique : l'acétone, pour produire un concentré péptidique décoloré.

FRUTEAU DE LACLOS (1986), a amélioré le procédé d'obtention d'une poudre de cruor décolorée en vue de son utilisation en alimentation animale et humaine.

Une étude comparative de l'hydrolyse du cruor par la papaïne et l'alkalase a été effectuée en premier, dans une seconde étape, des essais de décoloration complémentaires ont été effectués grâce à l'action d'une résine hydrophobe la DUOLITE S 861.

Cette résine présente l'avantage de fixer les peptides amers en plus de l'hème, de plus sa régénération semble être facile.

PIOT et al (1989), ont réalisés une hydrolyse enzymatique du cruor par la pepsine au stade pilote de façon continue. Cette opération est menée dans un réacteur enzymatique à membrane et est suivie par des étapes de décoloration, de dessalage et d'atomisation.

La décoloration est assurée par la magnésie lourde à 40°C pendant 3 à 24 heures après avoir comparé l'efficacité de plusieurs adsorbants dont : le charbon actif, fluorisil, CuO, SiO₂ etc...

La séparation adsorbant et hydrolysât se fait par centrifugation à 5000 r. pm.

CEMPEL et al (1994), ont décoloré l'hydrolysât enzymatique avec l'acide oxalique.

Enfin, WISMER - PEDERSEN (1988), cite les travaux de FRETHEIM et al (1979), ils ont effectué une hydrolyse acide de l'hémoglobine et ont constaté que la valeur nutritive de cette protéine est sensiblement diminuée.

VI-4- Application des hydrolysats d'hémoglobine :

DIVE et al (1989), ont étudié la valeur nutritive d'un hydrolysât enzymatique d'hémoglobine, pour la culture de trois espèces de *Tetra hymena*.

Les résultats obtenus montrent qu'une supplémentation de l'hydrolysât d'hémoglobine avec de l'isoleucine est suffisante pour avoir une bonne croissance de cette espèce.

NUMATA et al (1992) utilisent aussi un hydrolysât d'hémoglobine comme source de peptone pour la culture de bactéries.

La reproductibilité des hydrolysats d'hémoglobine multiplient leurs domaines d'application, la structure de l'hémoglobine est en effet définie génétiquement et ne change pas pour une même espèce.

L'enrichissement du lait maternel en apport protéique issu des hydrolysats d'hémoglobine, s'avère être très efficace pour les enfants nouveaux nés (PIOT, 1989).

En 1990, LEKE et al cité par CEMPEL et al (1994), ont étudié la digestibilité des hydrolysats d'hémoglobine utilisés en nutrition clinique. Ils comparent l'absorption des hydrolysats d'hémoglobine et de caséine dans les intestins de porcs.

Les hydrolysats d'hémoglobine sont aussi utilisés comme concentré protéique dans l'industrie du saussage (QUEBRIAC et BOURGEOIS, 1985).

CEMPEL et al (1994), ont pu extraire par des méthodes chromatographiques fines des peptides à activité photodynamique. L'association de pigment et de protéines a souvent été source d'activité photochimique.

Les peptides héminiques plus connus sous le nom de peptides porphyriques, sont chargés en molécule d'oxygène O₂, leur irradiation par un rayon Laser, leur confère une activité biologique : bactéricide, insecticide ou antitumorale. (PIOT et al , 1988, 1989, 1990).

D'autres peptides à activité biologique ont pu être extraits à partir des hydrolysats d'hémoglobine et utilisés avec succès (CEMPEL et al, 1994).

VI-5- Situation en Algérie :

Parmi les 350 abattoirs en activité, aucun établissement n'est doté de normes d'hygiène, de laboratoires d'analyse ou de procédé de traitement.

Le sang entre autre sous produits est encore rejeté dans la nature sans valorisation.

Une enquête effectuée au niveau de l'abattoir de Hussein-Dey, a révélé qu'une filiale de la SONATRACH , L'ORIVIC récupère une petite quantité des os et carcasses de saisies et les transforme en farine pour l'alimentation du bétail.

Il est indispensable de noter que l'Algérie importe la farine de sang pour enrichir en protéines l'alimentation destinée au bétail.

Les chercheurs devraient se concerter pour essayer de trouver des modes de récupération et de valorisation des sous produits d'abattoirs.

Cette source de protéines à bon marché ne devrait pas être rejetée dans la nature, elle pourrait être la cause de grands dangers de pollutions.

PARTIE EXPERIMENTALE

PARTIE EXPERIMENTALE

I-Matériels et méthodes:

I-1- Récolte et prétraitement du sang:

Toutes les récoltes du sang bovin ont été faites au niveau de l'abattoir de Hussein-Dey.

Au cours de la saignée, le sang est recueilli de manière hygiénique directement sous la tête de l'animal, dans un récipient stérile.

La saignée est l'opération qui par section ou ponction des vaisseaux à gros calibre, permet l'élimination du sang du corps de l'animal. L'évacuation du sang se fait grâce aux contractions cardiaques, fortes au début, et de plus en plus faibles après un laps de temps variable suivant l'espèce (HOULIER, 1988).

La position de l'animal et la rapidité de l'égorgeur, nous ont permis de recueillir seulement 2 à 3 litres de sang par carcasse.

Les bovins peuvent fournir 4 litres de sang hygiénique. A chaque litre de sang, on ajoute 2g d'anticoagulant l'E.D.T.A (Ethyle diamine tétra acétique) et une pincée d'antibactérien (L'azoture de sodium), le mélange est agité pour éviter la formation de coagulats (HOULIER, 1988).

L'hémoglobine bovine est obtenue par centrifugation du sang à 10.000 tr/mn et à 4°C pour éviter sa putréfaction.

Après centrifugation, le cruor est conservé dans des récipients en plastique à - 18 °C.

La centrifugeuse utilisée est de type BECKMAN modèle J2. 21 d'une contenance de 320 ml.

I-2- Détermination des caractéristiques du cruor :

I-2-1- Dosage des protéines : (RODIER, 1984)

Le dosage de la quantité d'azote total a été faite par la méthode de Kjeldahl citée en Annexe 1.

Le pourcentage de protéines est déduit de la formule suivante :

$$\% \text{ Protéines} = \% \text{ d'azote total} \times 6,25 \quad (37)$$

I-2-2- Détermination de la densité :

La densité d du cruor est déterminée grâce à un picnomètre de 25 ml.

$$d = \frac{\left(\frac{\text{masse du picnomètre rempli (g)} - \text{masse du picnomètre vide (g)}}{\text{volume du picnomètre (cm}^3\text{)}} \right)}{\text{Masse volumique de l'eau en g/ cm}^3} \quad (38)$$

I-2-3- Détermination de la viscosité :

La mesure de la viscosité cinématique consiste à mesurer le temps mis par le liquide à s'écouler dans un tube capillaire calibré dit : viscosimètre UBBELOHDE.

La viscosité cinématique se calcule par la formule suivante :

$$\text{viscosité cinématique} = C.t \quad (39)$$

Où C est la constante du viscosimètre qui dépend de la taille du capillaire (centistocke /s²)

t est le temps d'écoulement (s).

I-2-4- Détermination de la demande biologique en oxygène :

Le degré de pollution organique du cruor a été quantifié par la mesure de la demande biologique en O₂ en cinq jours (DBO₅)

La DB05 est la quantité d'oxygène nécessaire à la dégradation d'un volume de cruor. Les échantillons de cruor sont incubés dans des flacons agités, munis de réservoirs de soude, pendant cinq jours.

Le gaz carbonique dégagé est absorbé par la soude, une dépression est donc enregistrée par le manomètre.

I-3- Détermination de l'activité enzymatique de la papaïne :

1-3-1 - Caractéristiques commerciales de la papaïne :

L'enzyme utilisée est la papaïne commerciale des laboratoires Merck EC 3.4.22.2. C'est une protéase d'origine végétale, son activité spécifique est de 30.000 USP/mg à des pH allant de 5 à 9 et à des températures variant de 50 à 65°C.

1-3-2- Méthode de détermination de l'activité enzymatique de la papaïne:

Le substrat standard à hydrolyser est la caséine isoélectrique protéine du lait de masse moléculaire 23.600 Da (GOSH,1992), (GHAYAL, 1983).

C'est le complexe protéique qui est précipité du lait à pH = 4,6, on le désigne également par le terme : caséine isoélectrique ou caséine de Hammarstein (LUQUET, 1985).

C'est en effet ce chercheur suédois qui en a le premier publié une étude détaillé en 1870 mais sa préparation avait été décrite longtemps auparavant par le français BRACONNOT en 1830 et par la suite par QUEVENNE en 1841 (ALAIS , 1975).

L'activité enzymatique de la papaïne est la quantité de caseine hydrolysée dans des conditions standards.

La méthode de détermination de l'activité enzymatique de la papaïne est celle étudiée par KONDO et al (1994), dont le protocole est le suivant :

Dans une série de tube, nous introduisons :

- 2,5 ml de caséine 1% dans une solution tampon phosphate à pH7.

- 0,5 ml de solution de L-cysteine 0,005 M et d'éthyle diamine tétraacétique (EDTA) 0,001 M.

Les tubes bien fermés sont incubés dans un bain marie, jusqu'à atteindre une température de 40°C.

- 0,5 ml de papaïne à 10% sont alors ajoutés.

L'hydrolyse est poursuivie pendant 10 à 60 minutes à 40°C et à pH7 maintenu constant par la solution tampon.

En fin de réaction, 0,5 ml du mélange réactionnel sont prélevés et ajoutés à 5 ml de TCA 10%.

Après 15 minutes de contact, le mélange est centrifugé à 12.000g. L'absorbance à 280 nm du surnageant est lue dans un spectrophotomètre modèle MILTON ROY.

Les activités enzymatiques sont calculées de la manière suivante :

$$A = \frac{\text{Nombres de moles de peptides formées}}{\text{Masse de papaïne} \cdot \text{unité de temps}} \quad \begin{matrix} \text{mole} \\ \text{(-----)} \\ \text{g.mn} \end{matrix} \quad (40)$$

I-4- Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine dans un réacteur discontinu :

L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans un bioréacteur de type SET 002 M d'une capacité totale de deux litres (figure 21).

Le réacteur est composé :

- D'un récipient en verre de deux litres
- D'une platine supérieure.
- D'une module électronique qui contrôle toutes les fonctions du réacteur.

L'alimentation du bioréacteur se fait avec un interrupteur à clé.

Le chauffage est assuré par une baffle chauffante TP/02 M/B/220V d'une puissance de 1000 Watts, La température est réglée grâce à un régulateur balayant une gamme de 0 à 150 °C.

Le pH du milieu est contrôlé par un système de régulation automatique, grâce à une pompe péristaltique modèle 30/PPV 7 F/220 V.

La détermination du pH se fait grâce à une électrode de pH combinée.

Le volume de base ajoutée est relevé à des intervalles de temps réguliers pour permettre le calcul des degrés d'hydrolyse.

Une masse connue de cruor est décongelée à température ambiante, puis diluée dans de l'eau distillé pour avoir le taux de protéines désiré.

Le volume réactionnel est ajusté à 1,8 L dans le réacteur. L'agitation est mise en route.

Le pH et la température sont alors ajustés aux valeurs désirées.

On rajoute l'enzyme à un taux connu, pour le démarrage de la réaction enzymatique. Pour l'étude cinétique de l'hydrolyse enzymatique, des échantillons de 1,5 ml sont prélevés du milieu réactionnel à des intervalles de temps très rapprochés au début puis de plus en plus éloignés.

Pour arrêter la réaction d'hydrolyse, les prises d'essai sont directement transvasées dans 4,5ml d'acide trichloroacétique à 10% (T.C.A).

Cet acide a la propriété de coaguler les protéines non encore hydrolysées.

Après un temps de contact de 10 minutes, le surnageant est filtré sur du papier WHATMAN n°5.

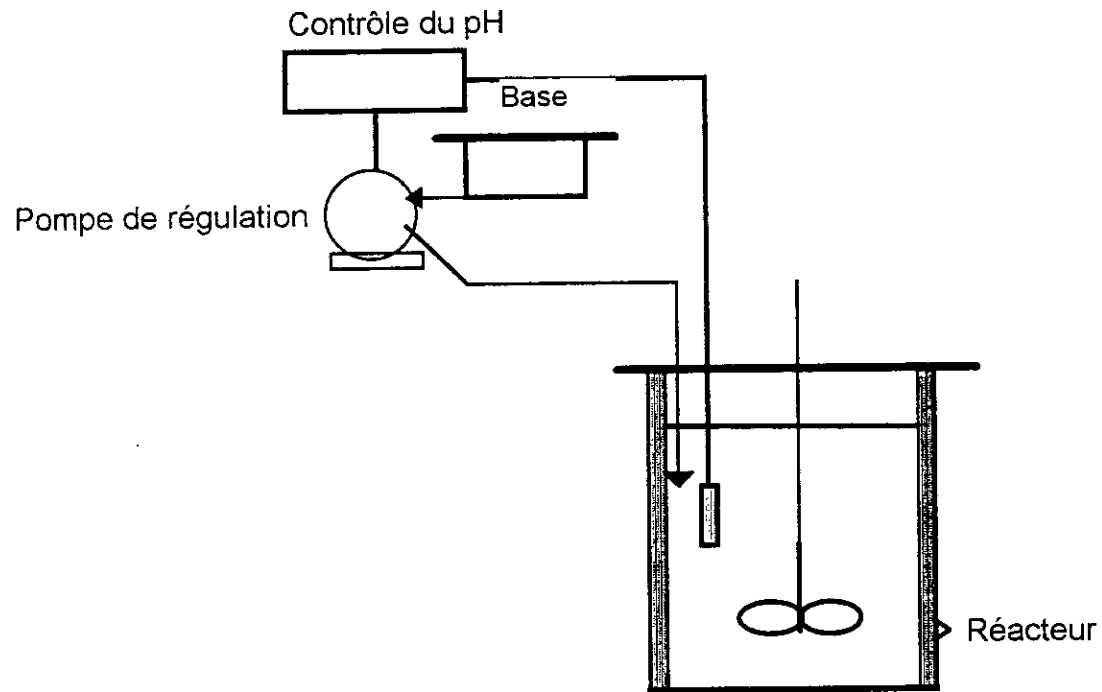


Figure 21 : Dispositif expérimental du réacteur discontinu

Le filtrat ainsi obtenu ne contient que des peptides et des acides aminés.

L'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine par de la papaïne provoque une diminution du pH, de la soude 1,25N est ajoutée au milieu réactionnel par régulation automatique, les volumes ajoutés sont relevés à des intervalles de temps réguliers pour le calcul des degrés d'hydrolyse (equation 15)

Au cours de nos essais, nous avons choisi une gamme assez large de conditions opératoires (pH, température, concentration en enzyme) en se basant sur les propriétés commerciales de la papaïne (activité spécifique).

Un choix préliminaire a donc été fait pour l'étude de chaque paramètre indépendamment, à savoir un pH de 8, une température de 55°C et une concentration en enzyme de 3 g/l.

Par ailleurs pour éviter les problèmes de viscosité qui peuvent intervenir à concentrations élevés, la majorité de nos essais ont été effectués à 12,53 g/l en hémoglobine.

L'agitation est maintenue constante et de 250 tours/mn.

I-5- Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine dans un réacteur continue couplé à un ultrafiltre :

Le bioréacteur à membrane utilisé comporte deux dispositifs (figure 22)

- Un bioréacteur de deux litres de type SET 002M où s'effectue l'hydrolyse enzymatique.

- Un module d'ultrafiltration équipé d'une membrane minérale de type tubulaire d'une surface d'échange de 120 cm². Deux membranes ont été testées M 14 (0,14 µm) et M 5 (10000 Da).

Une pompe péristaltique modèle 30/PPV7F/220V alimente le réacteur en hémolysat, le débit d'alimentation est réglé pour maintenir le volume réactionnel constant.

Une deuxième pompe modèle WATSON MARLOW 603S//2 recircule l'hydrolysât dans le module d'ultrafiltration. Le retentat composé de l'enzyme, de l'hémoglobine non encore hydrolysée et des peptides de masse moléculaire élevée, est donc recyclé dans le bioréacteur et le perméat composé des petits peptides et des acides aminés est recueilli à la sortie supérieure du module membranaire.

Avant d'effectuer le couplage de l'ultrafiltration, l'hydrolyse enzymatiques démarre en mode discontinu suivant le même protocole expérimentale cité au chapitre I-4 .

Le mode continu est actionné quand le module d'ultrafiltration est mis en service ainsi que les pompes d'alimentation en substrat et de soutirage du produit.

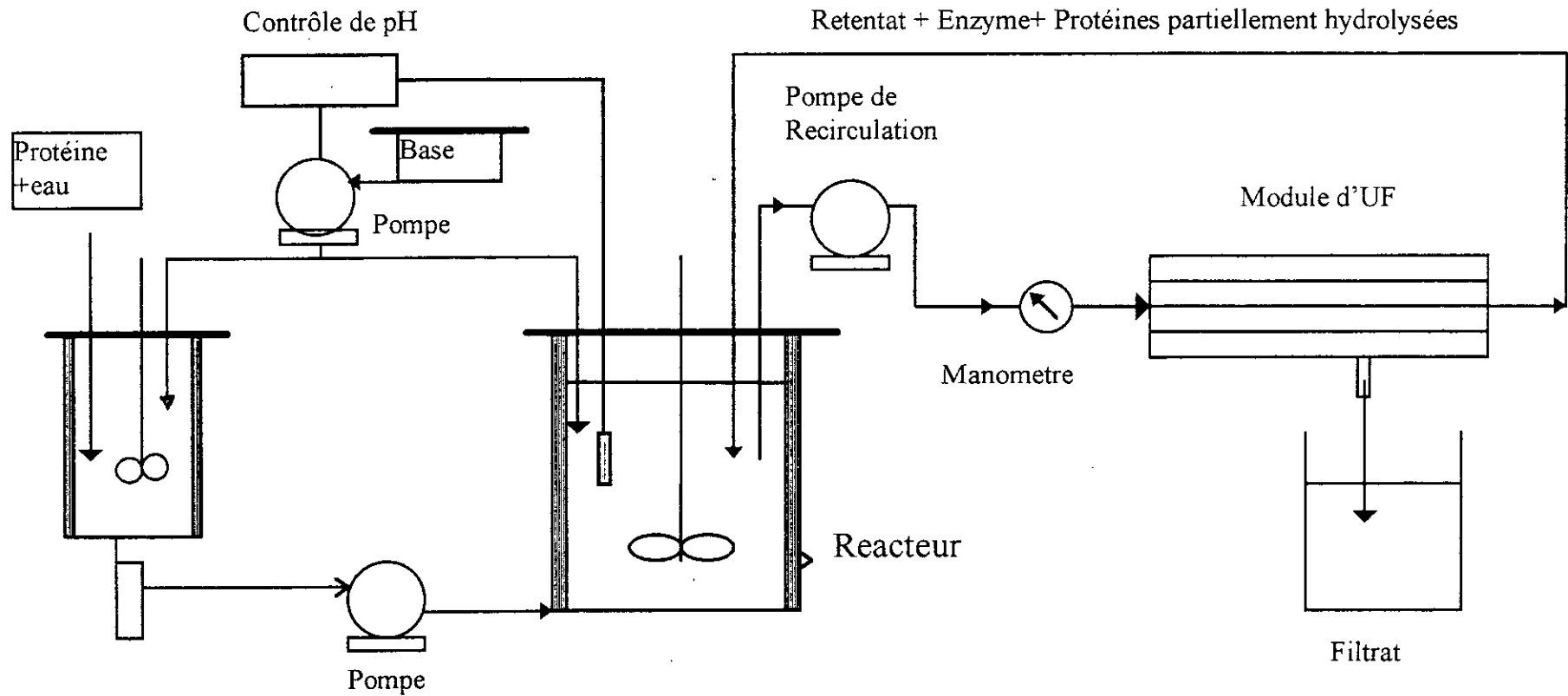


Figure 22 : Dispositif expérimental du réacteur continu couplé à un ultrafiltre.

I-5-1- Mise en service du module d'ultrafiltration :

Chaque essai débute par la mesure du débit à l'eau déminéralisée.
Les deux sorties perméat sont fermées, une seule sortie sera ensuite utilisée.

La sortie retentat doit être complètement ouverte.

Le débit de recirculation est réglé grâce à l'ajustement de la fermeture de la vanne d'entrée du module ou de la vitesse de la pompe.

Le module est ainsi mis en service avec la solution à traiter pendant 5 minutes pour la membrane M5 et 60 minutes pour la membrane M14 ; pour stabiliser la couche de polarisation sur les deux membranes.

La vanne supérieure de sortie perméat est alors ouverte lentement et la vanne sortie retentat est progressivement fermée pour obtenir la pression transmembranaire désirée.

La membrane CARBOSEP est fragile aux chocs violents, par contre elle résiste aux pressions élevées et à l'action des solvants.

Le système est autoclavable et peut travailler sur les fluides les plus variés, avec une veine liquide d'épaisseur 6 mm ou 0,5 mm (sans ou avec âme inox).

L'âme inox permet de travailler à de très grandes vitesses de recirculation.

Sans âme inox : 100 l/h correspond à 1 m/s.

Avec âme inox : 100 l/h correspond à 3,2 m/s.

I-5-2- Régénération des membranes :

Pour assurer à la membrane une durée de vie aussi longue que possible, le système devra être soigneusement nettoyé immédiatement après chaque utilisation.

En fin d'expérience, l'installation est arrêtée et vidangée puis rincée à l'eau déminéralisée.

Un deuxième rinçage est effectué avec de la soude décimolaire pendant 30 minutes, l'opération est répétée jusqu'à clarification de la solution de lavage.

Le rinçage à l'eau déminéralisée et la mesure du débit à l'eau sont effectués en fin de procédé.

Le débit à l'eau doit être au moins égal à 95% celui du départ.

Une solution détergente ou d'acide 1N peut remplacer la soude, le cycle de nettoyage peut cependant durer plus longtemps.

I-6- Analyses effectuées sur l'hydrolysât :

Dans le but de caractériser l'hydrolysât obtenu plusieurs analyses sont effectuées.

a - Mesure spectrophotométrique :

La détermination du spectre d'absorption de l'hémoglobine sur une gamme de longueur d'ondes assez large 200 à 500 nm, révèle la présence de deux pics l'un à 280 nm et l'autre à 400 nm (figure 23).

- La lecture de l'absorbance à 280 nm correspond à la concentration en peptides et acides aminés dans le filtrat (BERGMEYER, 1983).

La plupart des protéines ont une absorption maximale dans la gamme 275 à 280 nm, essentiellement due aux acides aminés aromatiques qu'elles contiennent. (annexe 2)

- La lecture de l'absorbance à 400 nm correspond à la teneur en peptides héminiques dans le filtrat (JOPE, 1949).

Le spectrophotomètre utilisé est de type MILTON ROY.

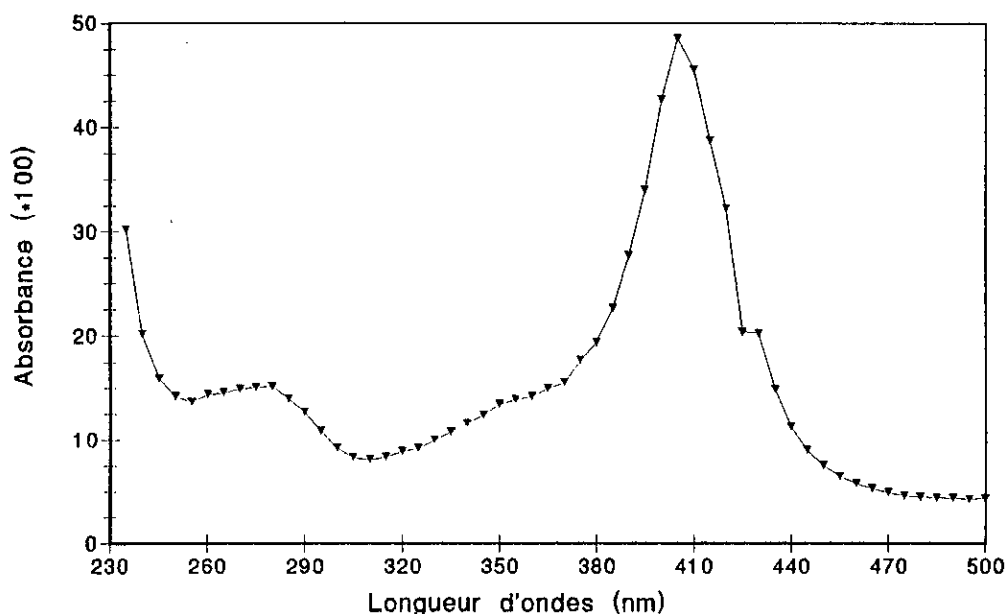


Figure 23 : Spectre d'absorption de l'hémoglobine

b - L'Electrophorèse:

L'électrophorèse de l'hydrolysât est réalisée grâce à un gel de polyacrylamide à concentration variable de 10 à 15%. (annexe 3).

Cette analyse sert à déterminer la distribution en masses molaires des péptides contenus dans notre hydrolysât.

Les échantillons sont dilués volume à volume avec du tampon de Laemmli, puis portés à ébullition et déposés par la suite sur le gel.

Une gamme appropriée de marqueurs de faibles et hauts poids moléculaires, est utilisée pour la détermination des poids moléculaires des peptides contenus dans l'hydrolysât.

c - La chromatographie liquide à haute pression : (HPLC)

La détection et la caractérisation des acides aminés contenu dans l'hydrolysât se fait grâce à une HPLC (Waters Acc. Q. Tag, 1993).

Les conditions opératoires sont les suivantes :

Après dilution des échantillons, 10 μ l de la solution étalon sont introduits dans chaque tube d'analyse auquel il faudra ajouter 10 μ l de chaque échantillon. 25 μ l de produit de dérivation et 50 μ l de tampon phosphaté.

De même, trois tubes d'analyse à concentrations connues 0,25 ; 0,5 et 1 mmoles/l sont préparés.

Les tubes sont chauffés à 55°C pendant 10 minutes puis analysés.

I-7- Décoloration de l'hydrolysât :

Cette étape consiste à séparer les peptides héminiques des non héminiques à l'aide d'un adsorbant afin d'obtenir une solution peptidique exempte d'hème.

La première sélection d'adsorbants a été réalisée au laboratoire. L'efficacité de la décoloration a été évaluée par l'absorbance à 400 nm avant et après adsorption des peptides héminiques.

Parmi tous les adsorbants testés, l'alumine acide a été retenue car elle répond aux critères de sélectivité et d'efficacité voulues à savoir une séparation facile par centrifugation et un pH d'action favorable à l'inactivation de la papaine.

I-7-1- Caractéristiques de l'alumine utilisée :

L'alumine acide utilisée est fabriquée par les laboratoires Merck ($Al_2 O_3$) d'une masse moléculaire de 101,96 g/mole.

L'alumine activée est un matériau léger, poreux, avec une surface condensée en grande partie de sites actifs.

Elle est obtenue par calcination à une température inférieure à 500°C de l'alumine hydratée $Al_2 O_3 \cdot 3H_2O$, elle même obtenue par attaque alcaline de la beauxite.

Les impuretés ne sont présentes qu'à l'état de traces, sous forme d'oxyde de fer, de titanium, de sodium et de silice.

La densité réelle est de 3,0 et la densité apparente de 0,77, les diamètres des pores sont compris entre 20 et 60 Å.

L'alumine utilisée au cours de nos expériences se présente sous forme de poudre blanche de granulométrie variant de 0,063 et 0,200 mm.

I-7-2- Dispositif expérimental :

L'adsorption est effectuée en mode batch, une série d'erenmeyers est donc utilisée pour chaque essai.

Après réaction enzymatique et ultrafiltration, le perméat est directement décoloré sans dilution préalable.

Environ 100 ml de perméat sont agités dans chaque erlenmeyer pendant 20 minutes, pour permettre l'homogénéisation de la solution à décolorer, une quantité connue d'alumine est alors ajoutée au mélange réactionnel.

La décoloration est poursuivie pendant 4 à 24 heures.

Des prélèvements à des intervalles de temps réguliers sont effectués sur le mélange réactionnel et directement centrifugés à 4000 tr/mn dans une centrifugeuse de laboratoire Modèle ITETTICK EBAlll, pendant 5 minutes.

Le surnageant décoloré est dosé à 400 mn et à 280 nm pour le suivi respectivement des fractions héminiques et péptidiques de l'hydrolysât.

II- Résultats et Interprétations :

II-1- Caractéristiques du Cruor :

- Le pourcentage de protéines contenues dans le cruor s'élève à 25,0625% (en pourcentage massique).
- La densité du cruor mesurée grâce à un picnomètre est de 1,19.
- La viscosité cinématique à 25C° est de 60 centistokes . Le cruor est très visqueux.
- La demande biologique en oxygène en cinq jours est de 56000 mg d'O₂/l, le cruor représente une charge polluante très élevée.

II-2- Etude de l'activité enzymatique de la papaïne :

Avant d'entamer une étude approfondie de l'hydrolyse enzymatique du cruor par la papaïne, il est essentiel de tester les performances de cette enzyme sur un substrat standard : la caséine,

Pour cela nous avons commencé par déterminer le temps minimal de contact enzyme - substrat donnant le plus grand taux d'hydrolyse de la caséine.

Ensuite nous avons étudié la thermostabilité de la papaïne après différentes périodes de chauffage.

II-2-1- Détermination du temps de contact enzyme - substrat pour l'essai d'activité de la papaïne :

1% de caséine est hydrolysé à 40°C et à pH7 par de la papaïne à 10% (les pourcentages sont exprimés en g par 100 ml de solution).

Le temps de réaction est fixé pour chaque essai, respectivement à 10, 20, 40 et 60 minutes.

La détermination des absorbances maximales obtenues à 280 nm du surnageant TCA, en fonction du temps de contact, montre que l'hydrolyse papaïque de la caséine, dans ces conditions est très rapide. tableau 4

Tableau 4 : Evolution des absorbances à 280 nm après différents temps de contact. Enzyme - substrat :

| Temps de contact (mn) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 40 | 60 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Absorbances à 280 nm | 0,132 | 0,488 | 0,498 | 0,498 | 0,502 | 0,503 | 0,501 |

Un temps d'incubation de l'ordre de dix minutes suffit à l'enzyme pour atteindre le taux maximal d'hydrolyse de la caseïne.

La mesure de l'activité enzymatique de la papaine sera donc effectuée après 10 minutes de contact.

II-2-2- Etude de la thermostabilité de la papaine :

L'élévation de la température agit sur le rendement d'hydrolyse par la papaine, nous nous sommes intéressé à l'effet du préchauffage de l'enzyme sur son activité catalytique.

Pour cela, la solution de papaine est chauffée à différentes températures.

Les temps de chauffage choisis sont de 1 heure et 4 heures.

Les activités enzymatiques sont alors mesurées et comparées à l'activité originelle.

II-2-2-1- Détermination de l'activité enzymatique originelle de la papaine :

Une solution de papaine à 10% est directement utilisée pour hydrolyser 1% de caséine à pH7 et à 40°C pendant dix minutes.

L'activité initiale A_0 est déterminée par la formule suivante.

$$A_0 = \frac{\text{Nombre de moles de peptides formés}}{\text{Masse de papaine} \cdot \text{temps de contact}} \quad \left(\frac{\text{mole}}{\text{g} \cdot \text{mn}} \right) \quad (41)$$

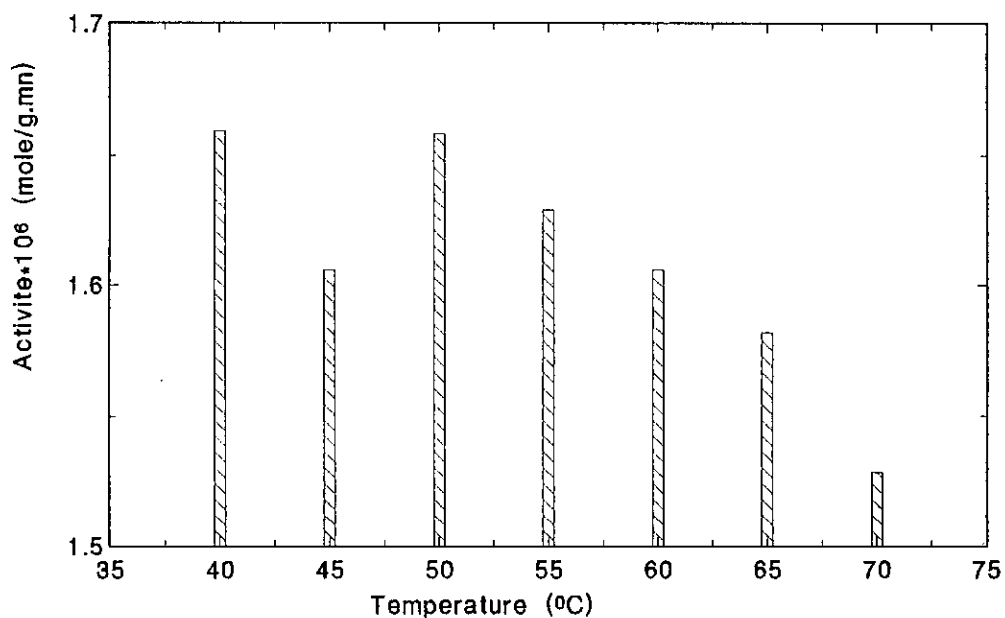


Figure 24 : Influence de la temperature de prechauffage sur l'activite enzymatique de la papaine (1 heure)

$S_0=1\%$, $pH=7$, $T=40^\circ C$, $E=10\%$.

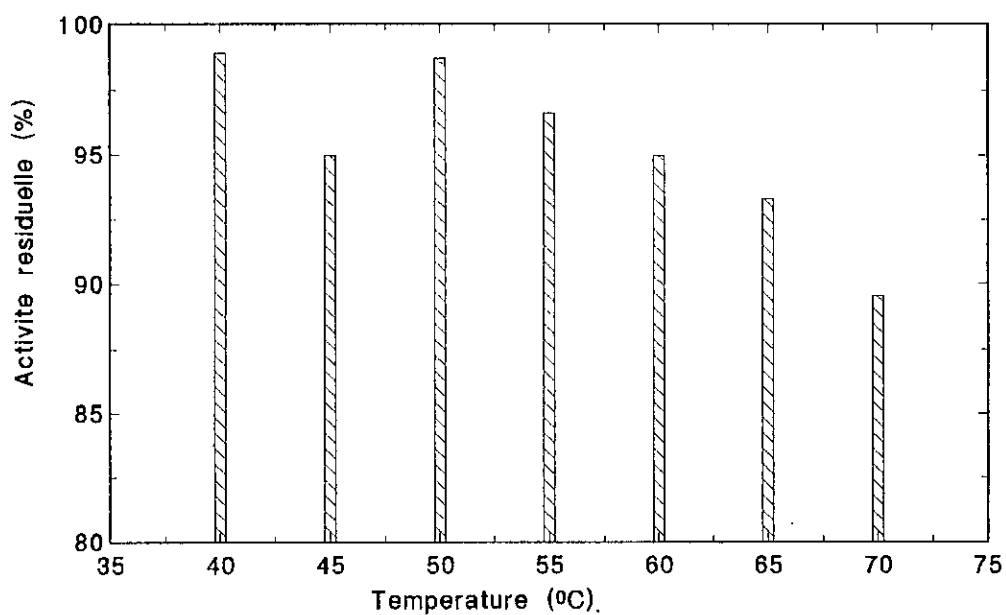


Figure 25 : Influence de la temperature de prechauffage sur l'activite residuelle de la papaine (1 heure)

$S_0=1\%$, $pH=7$, $T=40^\circ C$, $E=10\%$.

II-2-2-3- Cas d'un préchauffage de la papaine pendant 4 heures :

Les mêmes essais sont effectués, mais avec quatre heures de préchauffage de la solution de papaine avant hydrolyse pour voir si un déroulement plus important de l'enzyme augmenterait l'activité enzymatique.

Seules les températures de 40°C, 50°C et 55°C ont été étudiées.

Les activités enzymatiques obtenues confirment les conclusions avancées dans l'essai précédent.

La papaine perd une partie de son activité pour les hautes températures. De plus un chauffage plus long accentue cette perte d'activité.

Le tableau 5 donne une comparaison des activités de la papaine préchauffé pendant 1 heure et 4 heures.

Tableau 5 : Comparaison des activités enzymatiques de la papaine après différents temps de chauffage

| T (°C) | Activité après 1h de préchauffage (<u>mole</u>) (g.mn) | Activité après 4h de préchauffage. (<u>mole</u>) (g.mn) |
|--------|---|--|
| 55 | $1,655.10^{-6}$ | $0,9.10^{-6}$ |
| 50 | $1,691.10^{-6}$ | $0,948.10^{-6}$ |
| 40 | $1,695.10^{-6}$ | $0,954.10^{-6}$ |

La représentation de l'activité Ar en fonction de la température et du temps de préchauffage en figure 26 permet de différencier entre les activités enzymatiques après 4 heures de chauffage et celles après 1 heure seulement.

La perte d'activité est d'environ 50% pour les trois températures étudiées après 4 heures de préchauffage, elle est cependant insignifiante après 1 heure de préchauffage.

Un préchauffage de la papaine n'est donc pas nécessaire pour les hydrolyses enzymatiques ultérieures.

Au contraire, les températures de travail ne doivent pas dépasser 55°C pour que l'enzyme ait son activité maximale, surtout en phase continue caractérisée par des temps de manipulation longs.

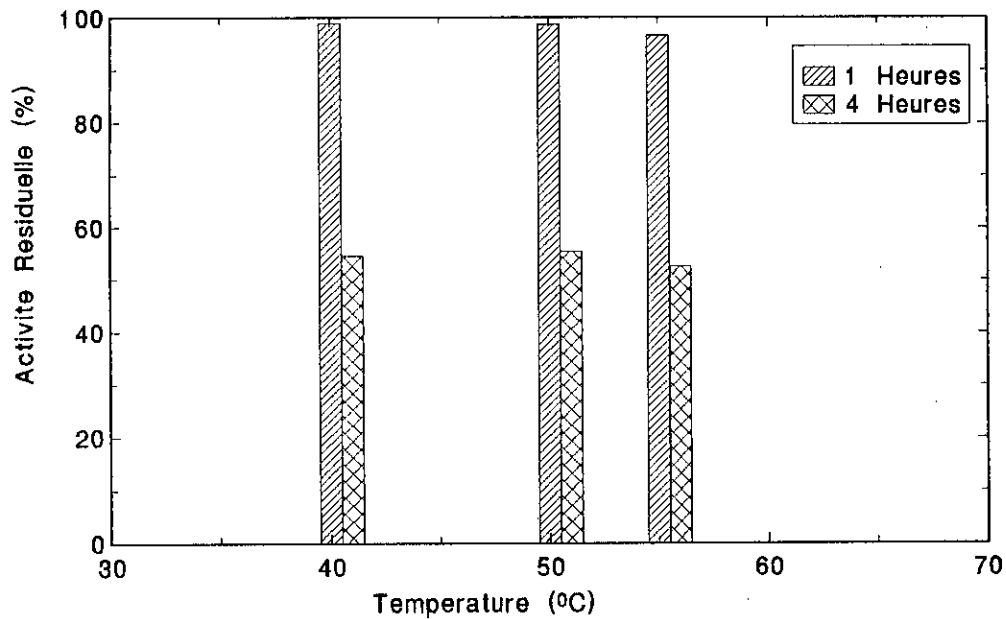


Figure 26 : Comparaison des activites residuelles de la papaïne apres differents temps de chauffage
 $S_0=1\%$, $pH=7$, $T=40^{\circ}C$, $E=10\%$.

En conclusion, l'étude des essais d'activité de la papaïne sur un substrat standard : la caséine isoélectrique, nous a permis de choisir le temps minimal d'hydrolyse.

De même, la stabilité thermique de la papaïne est affectée par les hautes températures et les traitements thermiques prolongés.

II-3- Etude de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine dans un réacteur discontinu :

Deux séries d'expériences ont régis notre étude de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine en réacteur discontinu.

Au début, nous avons étudié l'influence du pH, de la température et de la concentration en enzyme sur les performances de la réaction enzymatique, cette étude a fait l'objet d'une communication orale au premier Congrès Algérien du Génie des Procédés,

Nous avons ensuite étudié la cinétique de la réaction enzymatique pour une gamme de concentration en substrat assez large.

II-3-1- Hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine sans régulation de pH:

12,53 g/l d'hémoglobine sont introduits dans le réacteur de deux litres avec 3g/l de papaïne, à 55°C et à un pH initial de 8.

Le pH n'étant pas régulé, il chute rapidement à une valeur de 6,94, pendant les premières 30 minutes de l'hydrolyse, il évolue ensuite lentement, au bout de 4 heures, le pH atteint 6,56 (figure 27)

De même la fraction peptidique formée par hydrolyse, augmente rapidement en début de réaction, jusqu'à atteindre une valeur de 6,04 g/l après 4 heures.

Le rendement peptidique s'élève à 35,83%, celui ci est très faible par rapport au rendement obtenu avec régulation de pH.

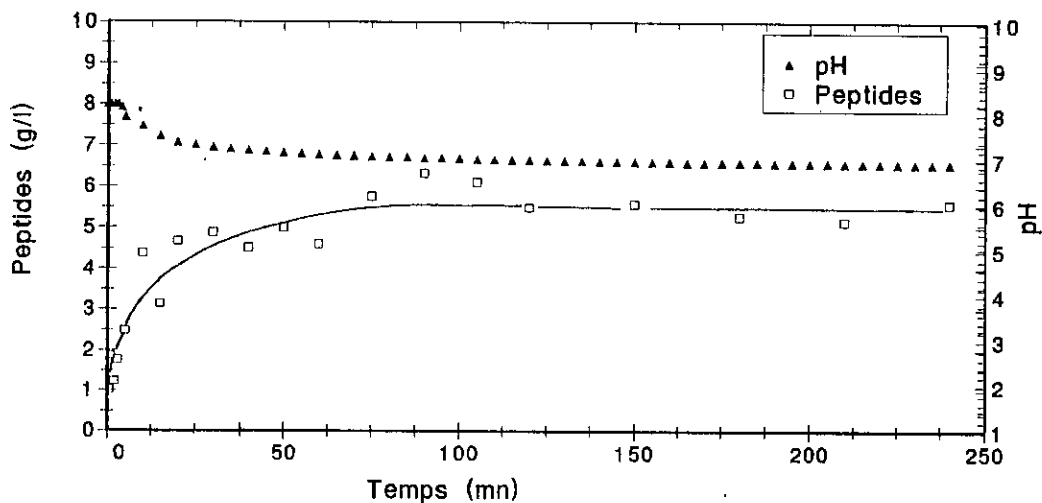


Figure 27 : Evolution du pH au cours de l'hydrolyse papaique de l'hémoglobine
 $S_0 = 12,53\text{g/l}$, $T = 55^\circ\text{C}$, $E = 3\text{g/l}$

II-3-2 - Influence du pH sur l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine :

Le pH est donc maintenu constant grâce à l'ajout de soude à 5%, une gamme de pH allant d'un pH = 7 à un pH = 10 a été choisie.

La régulation du pH est assurée automatiquement grâce à une pompe péristaltique.

Les conditions opératoires sont les mêmes que ceux précédemment citées (12,53 g/l en hémoglobine, 3 g/l en papaïne, une température de 55°C).

La figure 28 représente l'évolution des degrés d'hydrolyse en fonction du temps, pour chaque pH étudié.

Les plus hauts degrés d'hydrolyse sont obtenues à pH9, au pH 7,8 et 8,5 ceux-ci sont de même ordre.

Pour toute la gamme de pH, les degrés d'hydrolyse augmentent très rapidement au début puis de plus en plus lentement.

D'autre part, ADLER-NISSEN, n'ayant pas définis de degré d'hydrolyse à pH neutre, les résultats obtenus à pH 7 ne pourront donc pas être exploités (PIOT,1989).

La figure 29 montre que les plus fortes concentrations peptidiques sont obtenues à pH8 , 8,5 et 9, la zone optimale de pH semble donc se trouver dans cet intervalle de pH.

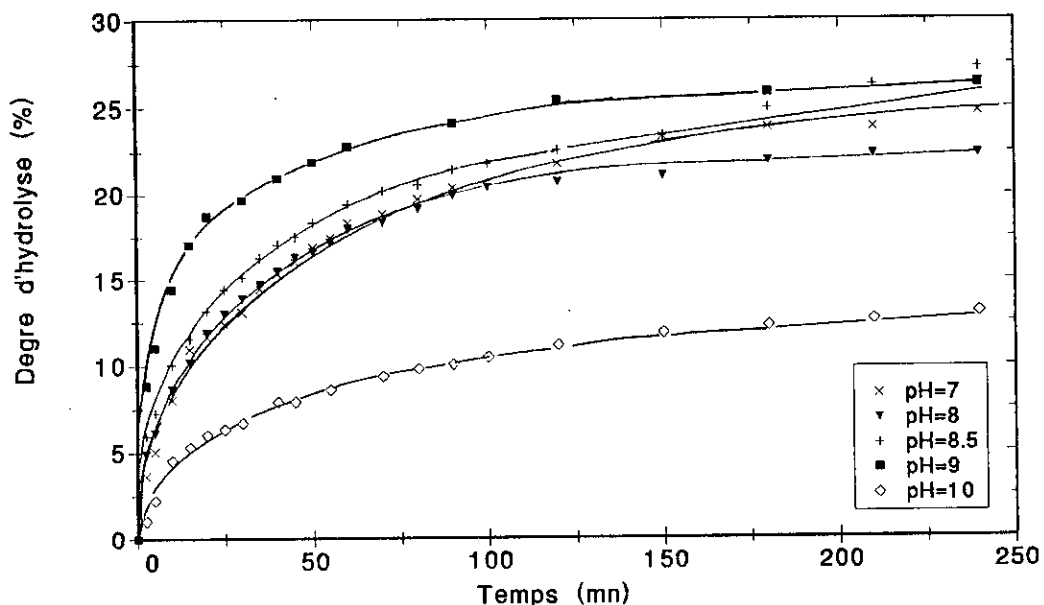


Figure 28 : Influence du pH sur le degré d'hydrolyse
 $S_0 = 12.53\text{g/l}$, $T = 55^\circ\text{C}$, $E=3\text{g/l}$

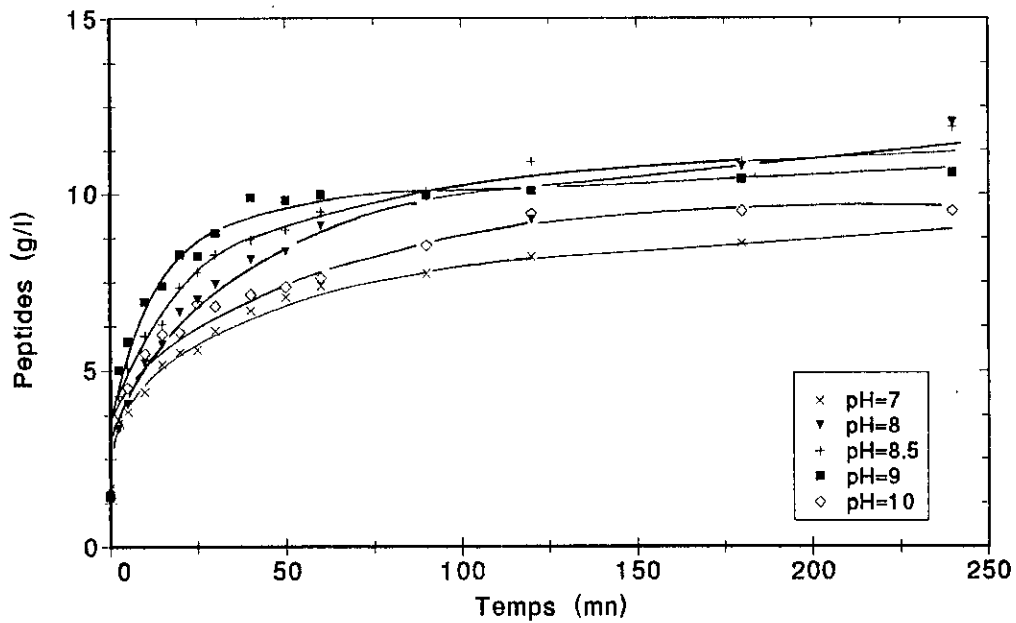


Figure 29 : Influence du pH sur la concentration en peptides.
 $S_0 = 12.53\text{g/l}$, $T = 55^\circ\text{C}$, $E = 3\text{g/l}$

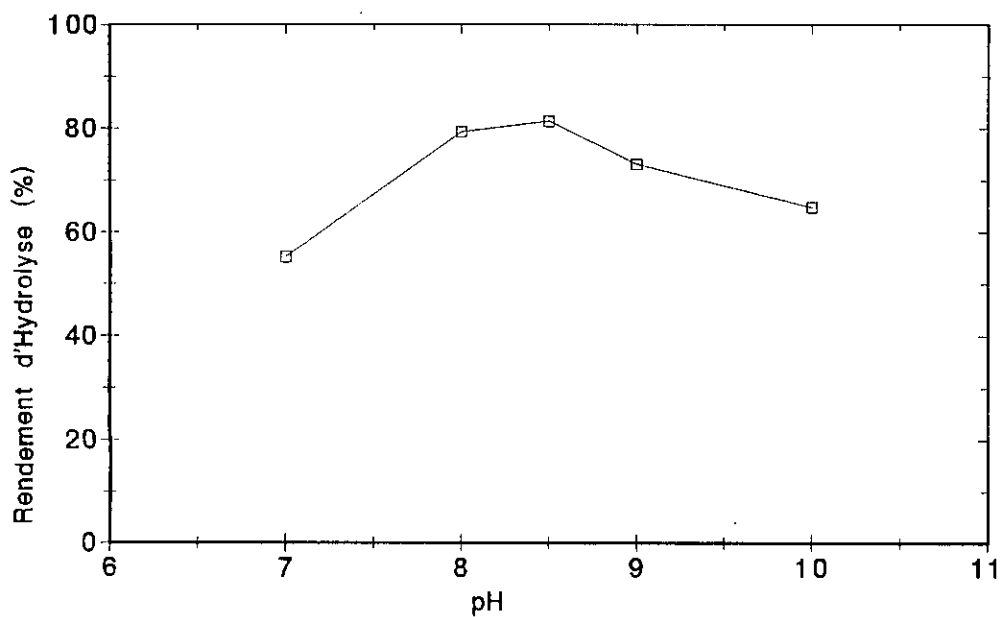


Figure 30 : Influence du pH sur le Rendement d'hydrolyse.
 $S_0 = 12.53\text{ g/l}$, $T = 55^\circ\text{C}$, $E = 3\text{g/l}$

Le rendement peptidique est défini par la formule suivante :

$$R_p = \frac{[\text{Peptides hydrolysés}]_{at} - [\text{Peptides hydrolysés}]_{at=0}}{[\text{Protéines initialement introduites}]} \times 100 \quad (43)$$

De plus, la représentation des rendements peptidiques en fonction du pH, confirme la zone de pH optimale, ainsi à pH8 le rendement péptidique atteint 79,37% avec un degré d'hydrolyse appréciable de 22,3%

Au pH 8,5 et 9, les rendements peptidiques s'élèvent respectivement à 81,41% et 73,18% (figure 30).

Par ailleurs, la détermination graphique des vitesses initiales d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine par détermination de la pente à l'origine pour tous les pH étudiés montre que les réactions d'hydrolyse à pH8, 8,5 et 9 évoluent très rapidement en début de réaction et leurs vitesses sont proches (figure 31).

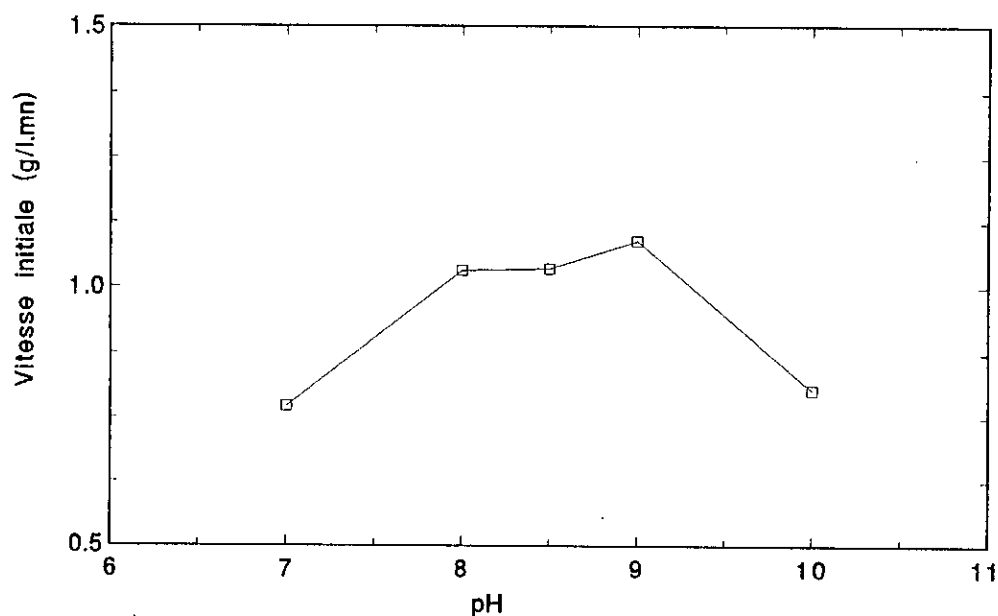


Figure 31 : Influence du pH sur la vitesse initiale d'hydrolyse enzymatique.
 $S_0=12.53 \text{ g/l}$, $E=3 \text{ g/l}$, $T=55^\circ\text{C}$

La figure 32 illustre l'évolution des peptides héminiques au cours du temps pour chaque pH, le pH 8,5 donne le plus de peptides héminiques indésirables en fin de procédé.

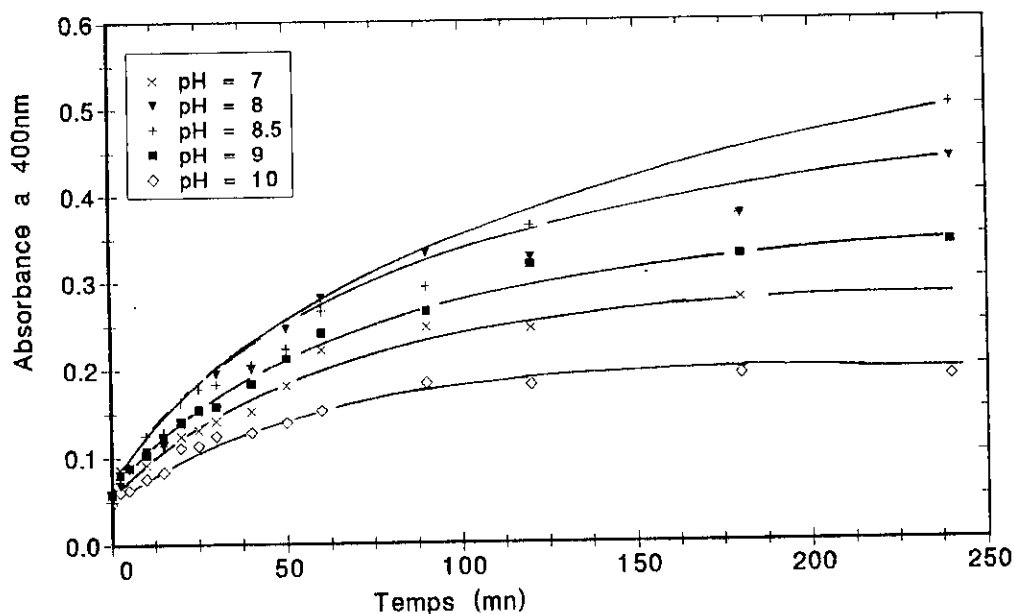


Figure 32 : Influence du pH sur la libération des peptides héminiques. $S_0=12.53$ g/l, $E=3$ g/l, $T=55^\circ\text{C}$.

Dans la gamme de pH étudiée, le pH8 semble être le plus approprié, les rendements péptidiques et les degrés d'hydrolyse sont appréciables pour une consommation modérée en base.

Ce résultat est en accord avec celui obtenu par, DUARTE et al (1988), pour les essais d'hydrolyse du sang entier avec de la papaïne.

II-3-3- Influence de la température sur l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine :

Pour mener à bien cette expérimentation, une gamme assez large de température a été choisie allant de 40°C à 65°C.

Les conditions opératoires sont 12,53 g/l en protéines, 3 g/l en papaine et un pH8.

La représentation des degrés d'hydrolyse, des concentrations péptidiques et de la fraction hémique au cours du temps montre que ces trois paramètres augmentent sensiblement avec la température dans l'intervalle étudié jusqu'à atteindre un palier correspondant au taux maximal d'hydrolyse. (figure 33, 34 et 35).

De plus les résultats obtenus à 55°C, 60°C et 65°C sont très proches surtout après 4 heures d'hydrolyse.

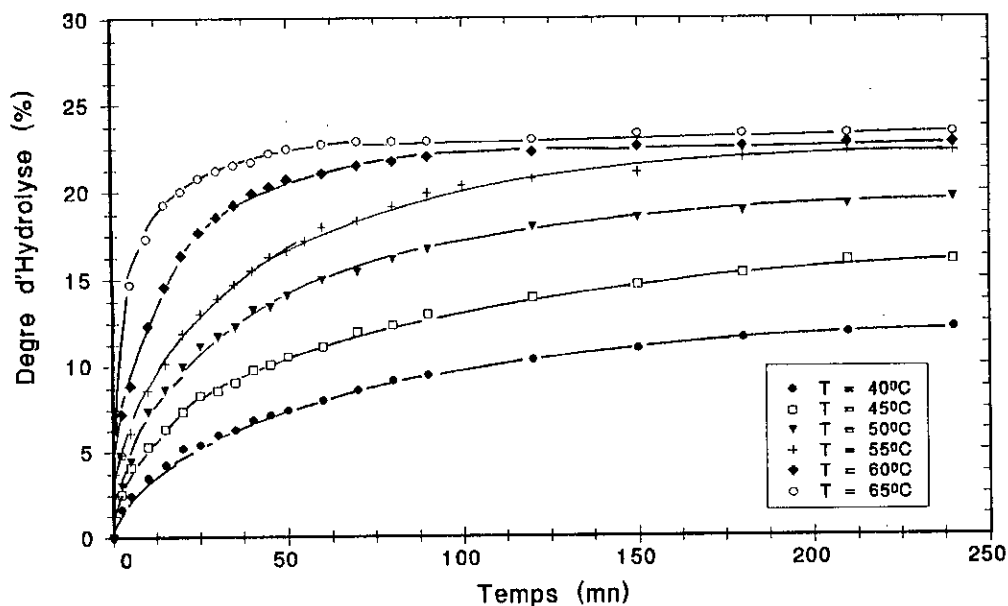


Figure 33 : Influence de la température sur le degré d'hydrolyse.
 $S_0=12.53$ g/l , $E=3$ g/l ,pH =8

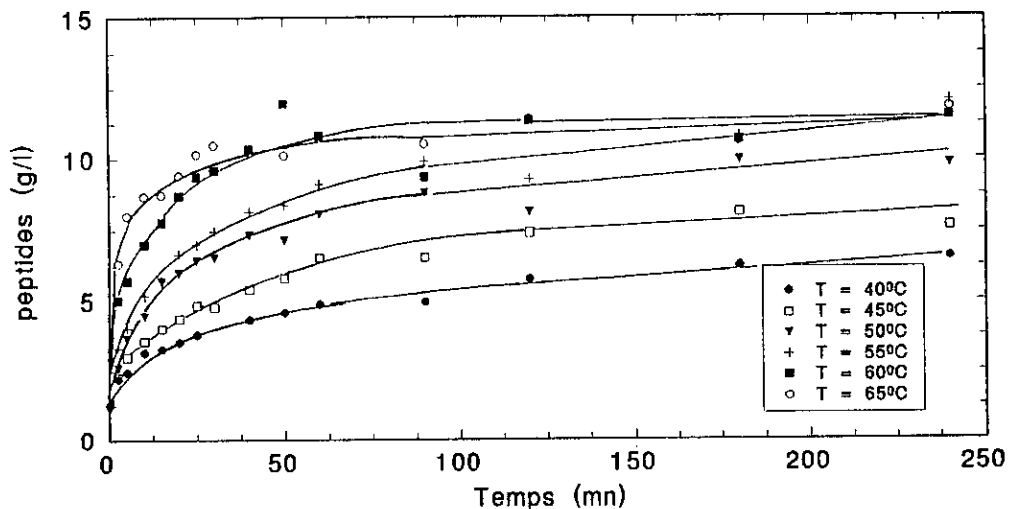


Figure 34 : Influence de la temperature sur la concentration en peptides .
 $S_0=12.53$ g/l , $E=3$ g/l , $pH=8$

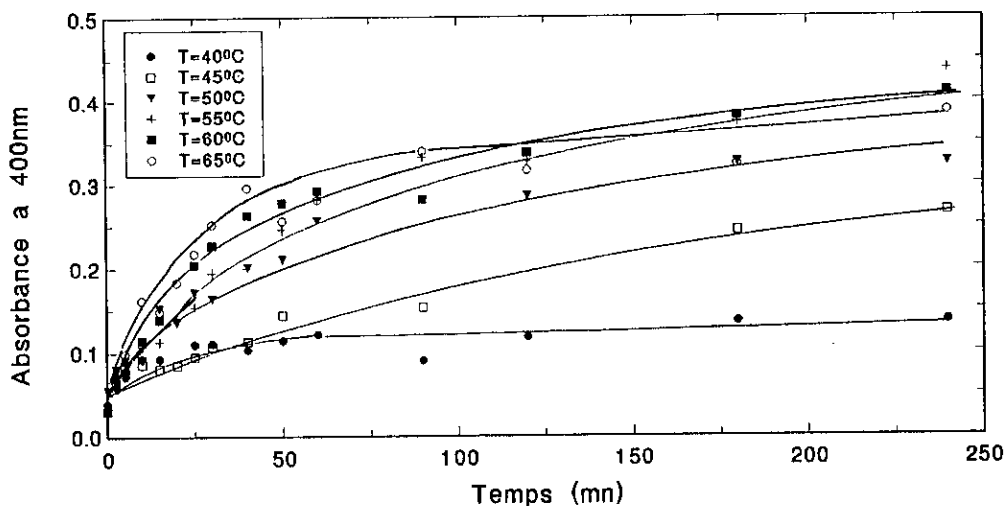


Figure 35 :Influence de la temperature sur la liberation des peptides heminiques. $S_0=12.53$ g/l , $E=3$ g/l , $pH=8$

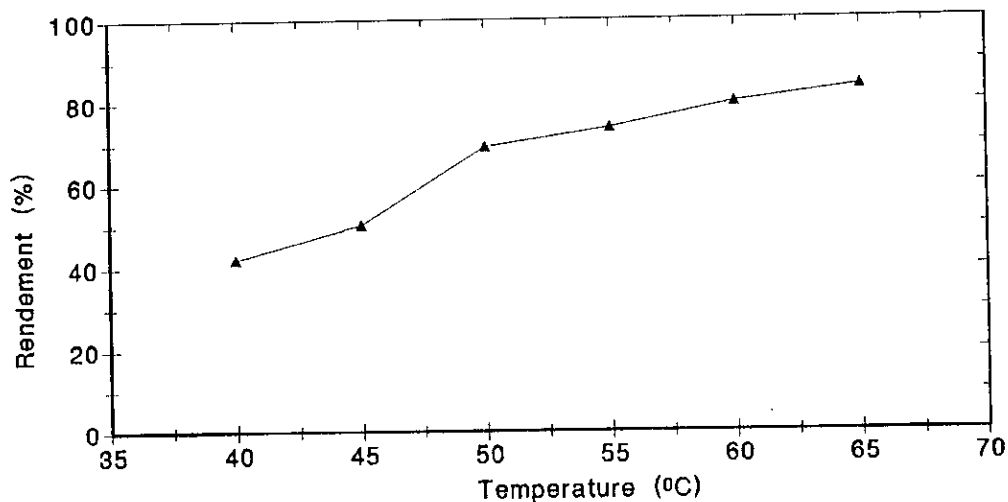


Figure 36 : Influence de la temperature sur le rendement d'hydrolyse.
 $S_0=12.53$ g/l , $E=3$ g/l , $pH=8$

La figure 36 illustre les rendements peptiques, la zone de température qui semble la plus appropriée est de 55°C à 65°C.

En outre, la représentation de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de la température en figure 37, montre que la papaïne est plus active à 65°C.

La vitesse initiale à 65°C est en effet très élevée.

Les valeurs élevées de vitesses semblent être dues à l'influence dénaturante de la température sur les protéines et particulièrement sur l'hémoglobine.

Par sa structure globulaire et complexe, l'hémoglobine est difficile à hydrolyser à température modérée, le traitement thermique favorise cette hydrolyse grâce au déroulement de la protéine, les sites peptidiques accessibles à l'enzyme sont beaucoup plus nombreux.

D'autre part, l'étude de la stabilité thermique de la papaïne au sous chapitre précédent a révélé que celle-ci est très sensible aux températures élevées, en 4 heures de chauffage, la papaïne perd une grande part de son activité, pour 55°C celle-ci s'abaisse à 52,54% de sa valeur initiale.

65°C donne les meilleurs performances, mais nous optons pour 55°C pour pouvoir garder à l'enzyme sa plus grande activité.

Ainsi, notre choix de la température optimale sera limité par la thermostabilité de la papaïne, 55°C semble être la plus appropriée.

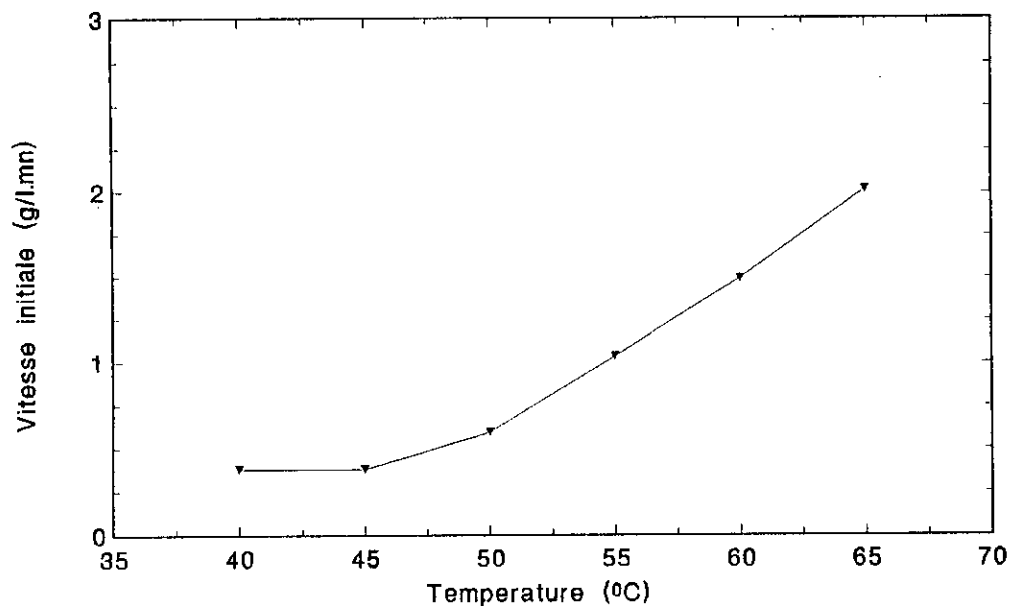


figure 37 :Influence de la température sur la vitesse initiale d'hydrolyse

$S_0=12.53$ g/l , $E=3$ g/l , $pH=8$

II-3-4- Influence de la concentration en enzyme sur l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine :

La quantité d'enzyme à utiliser est le facteur décisif pour l'étude des performances de l'hydrolyse enzymatique.

Une série d'essai a été réalisée pour évaluer la contribution de la concentration de papaine à l'hydrolyse de l'hémoglobine.

1 à 6 g/l de papaine sont donc introduits dans le réacteur enzymatique avec 12,53 g/l d'hémoglobine à pH8 et à 55°C dans un rapport E/S de 0,08 à 0,48.

La figure 38 montre l'influence de la concentration en papaine sur le degré d'hydrolyse. Les plus hautes valeurs sont atteintes pour les quantités en papaine de 4 g/l, 5g/l et 6g/l.

Ces mêmes concentrations en enzyme conduisent à un même rendement maximal d'hydrolyse de l'ordre de 71,5% et à des vitesses presque identiques. En effet, au delà de 3 g/l, les concentrations en peptides n'évoluent que très faiblement.

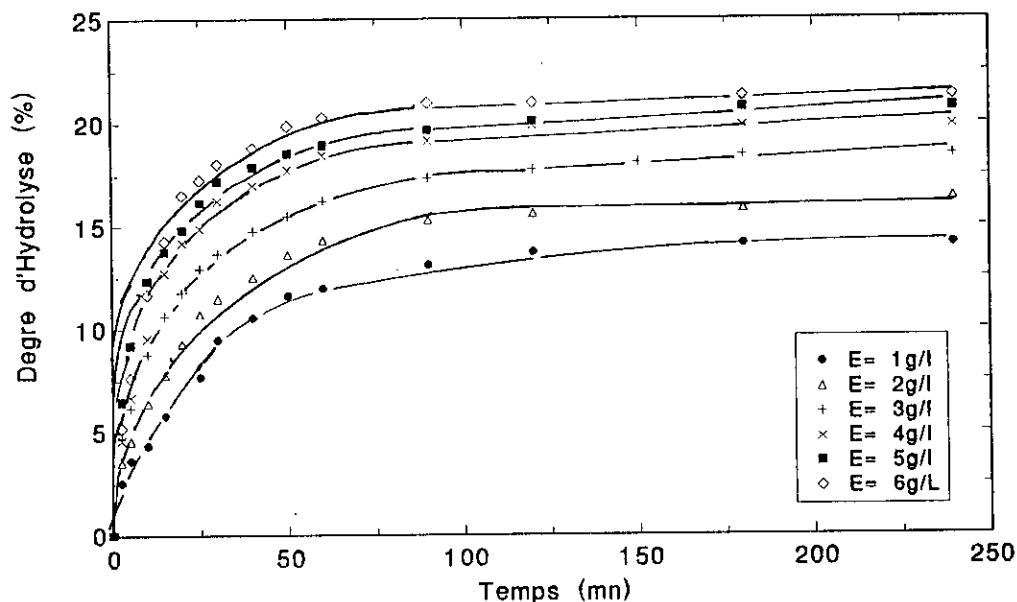


Figure 38 : Influence de la concentration en enzyme sur le degré d'Hydrolyse .

$S_0=12.53 \text{ g/l}$,pH=8 ,T=55°C

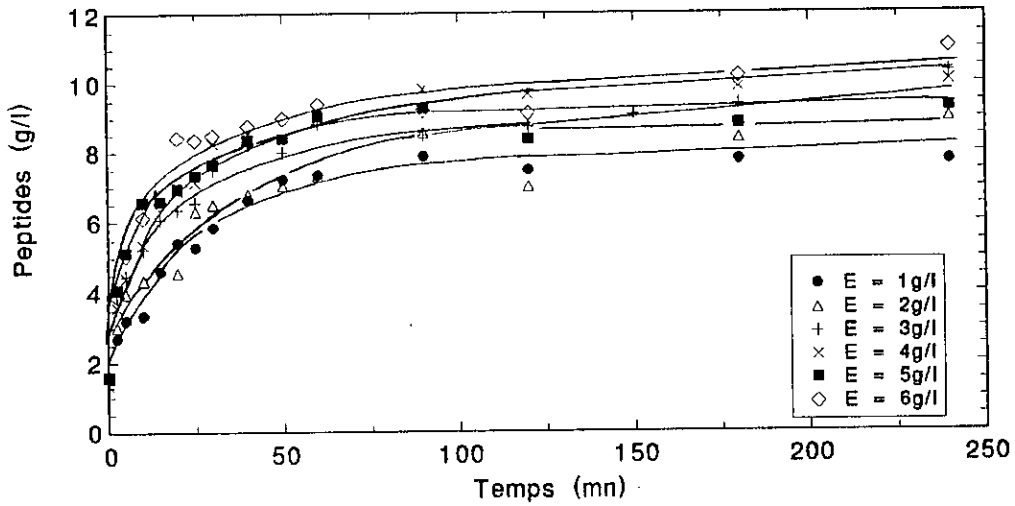


Figure 39 : Influence de la concentration en enzyme sur la concentration en peptides $S_0=12.53$ g/l ,pH=8 ,T=55°C

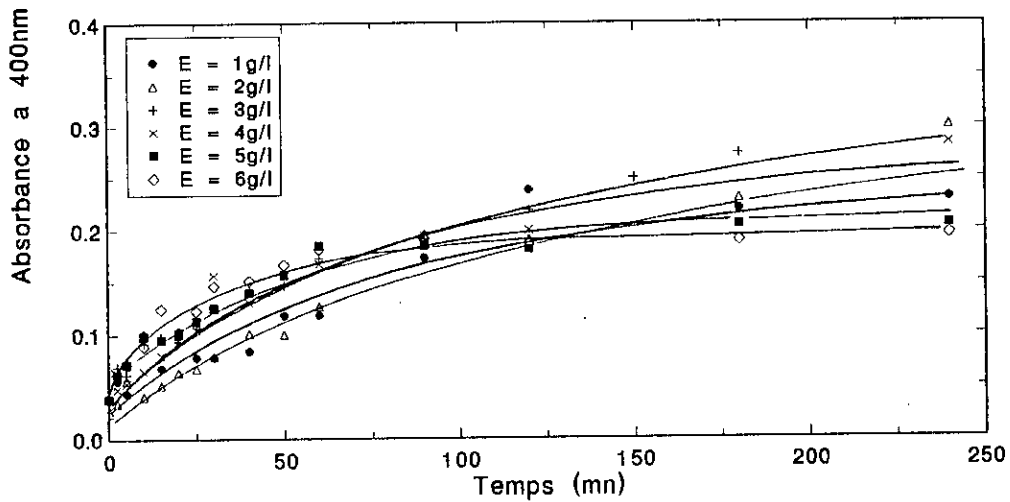


Figure 40 : Influence de la concentration en enzyme sur la liberation de peptides heminiques $S_0=12.53$ g/l ,pH = 8 ,T = 55°C

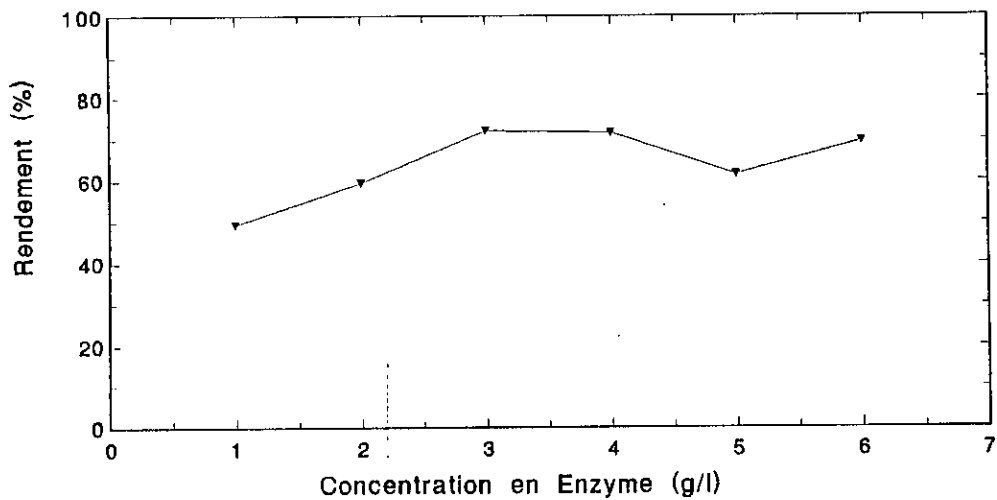


Figure 41 : Influence de la concentration en enzyme sur le Rendement d'Hydrolyse. $S_0=12.53$ g/l ,pH = 8 ,T = 55°C

En outre, l'évaluation de la fraction peptidique (totale et héminique) libérée au cours du temps pour chaque concentration en enzyme (figure 39 et 40 respectivement) illustre la grande part de rapprochement existant pour les trois quantités d'enzyme précédemment citées. Ainsi les courbes obtenues tendent à se confondre après 4 heures d'hydrolyse.

Les rendements peptidiques représentés en figure 41 sont donc très proches pour les quantités de papaïne de 3 à 6 g/l avec un léger ascendant pour 3 et 4 g/l.

D'autre part la détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse semble confirmer cela, en effet, l'accroissement de celle-ci est très rapide pour les quantités de 1,2 et 3 g/l au delà, l'augmentation de la vitesse est très lente (figure 42).

D'après les résultats obtenus 3 g/l est la concentration optimale pour l'hydrolyse de l'hémoglobine, mais nous avons opté pour 4 g/l pour deux raisons :

- Un léger excès d'enzyme est très utile en réacteur continu à membrane d'une part pour récupérer les éventuelles pertes d'enzyme dues à la rétention de celle-ci au voisinage de la membrane et d'autre part pour permettre une utilisation prolongée du réacteur.

- Les conditions optimales d'hydrolyse sont assurées.

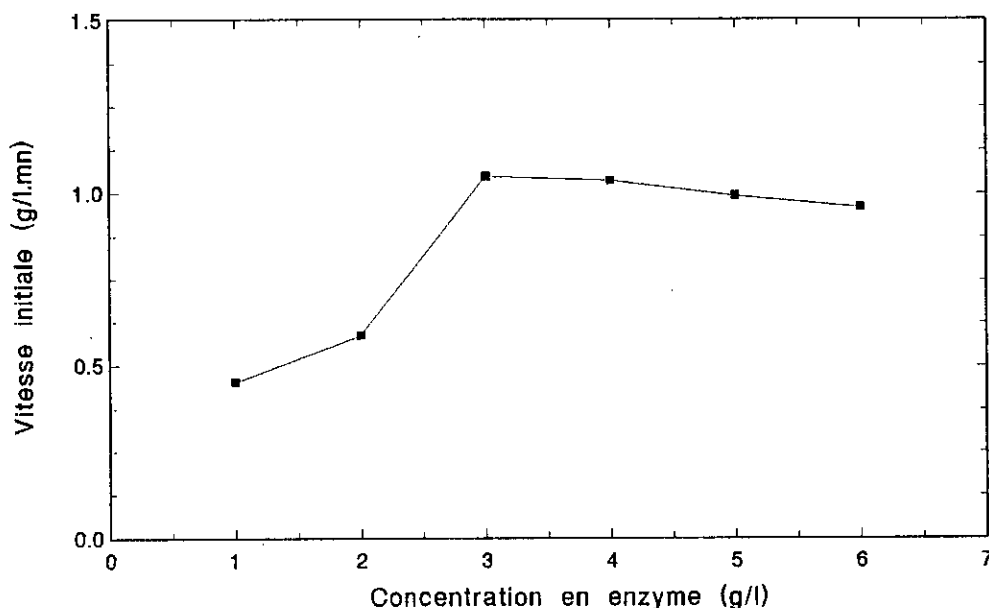


Figure 42 : Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale $S_0=12.53$ g/l, pH = 8, T = 55°C

II-3-5- Etude de la cinétique d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine :

La détermination de l'équation de vitesse d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine est nécessaire pour prévoir les performances du réacteur enzymatique.

Pour effectuer cette étude, nous avons fixé les conditions opératoires optimales obtenues auparavant à savoir un pH = 8, une température de 55°C et une concentration en enzyme de 4 g/l.

La concentration d'hémoglobine varie de 3,13 , 4,15 ; 6,26 ; 10,02 ; 12,53 ; 18,79 ; 25,06 à 31,33 g/l.

La représentation en figure 43 de la concentration en peptides formés en fonction du temps pour chaque essai permet la détermination graphique des vitesses initiales. Le taux de peptides formés augmente en fonction du temps jusqu'à atteindre un taux maximal d'hydrolyse pour toutes les concentrations étudiées.

La figure 44 illustre l'évolution des vitesses initiales en fonction de la concentration d'hémoglobine introduite S_0 .

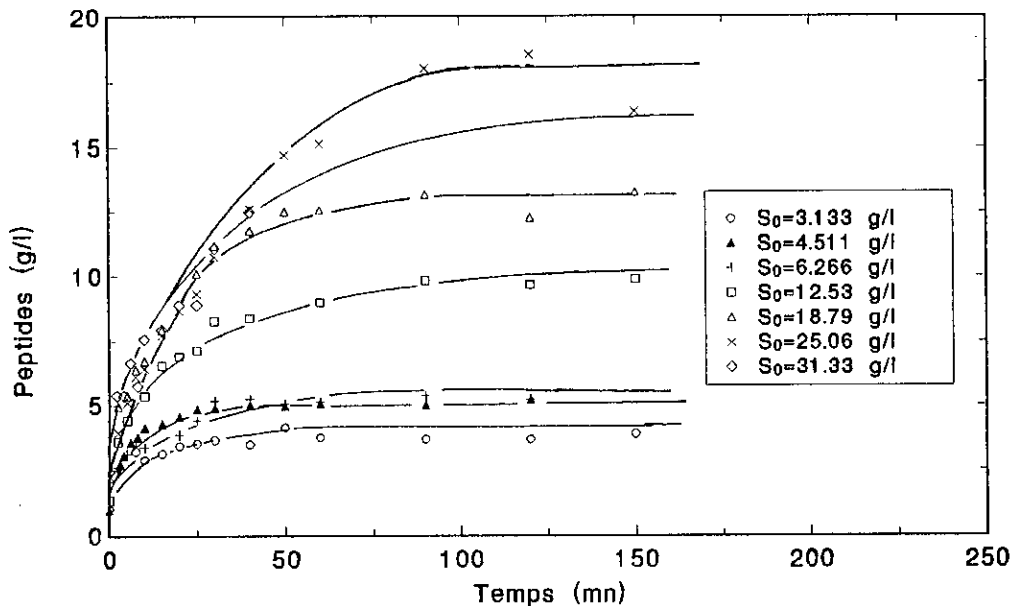


Figure 43 : Evolution de la concentration en peptides au cours du temps
pH = 8, T = 55°C, E = 4 g/l

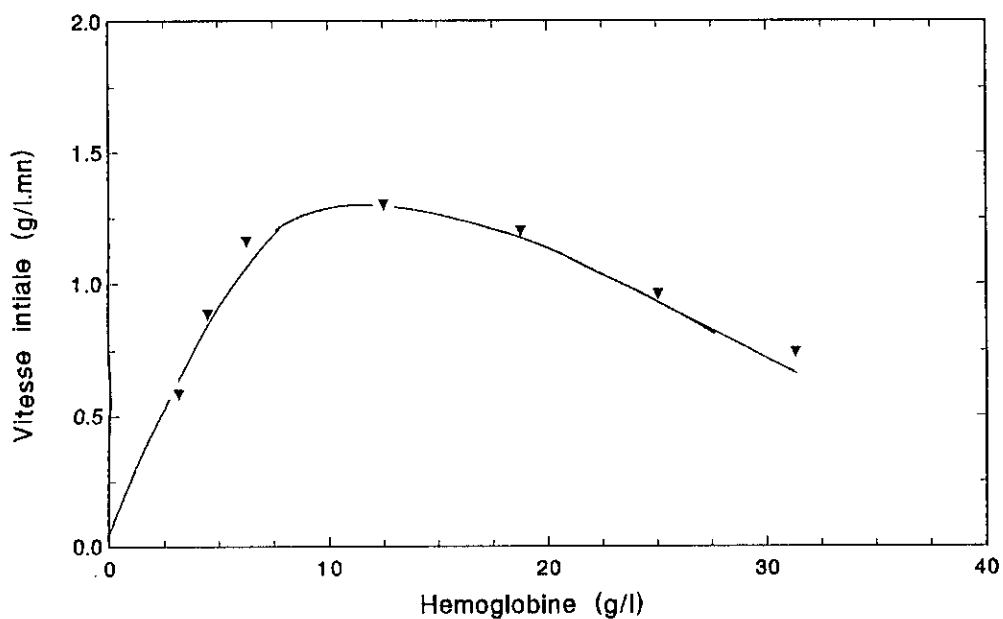


Figure 44: Evolution de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en Hemoglobine $\text{pH} = 8, T = 55^{\circ}\text{C}, E = 4 \text{ g/l}$

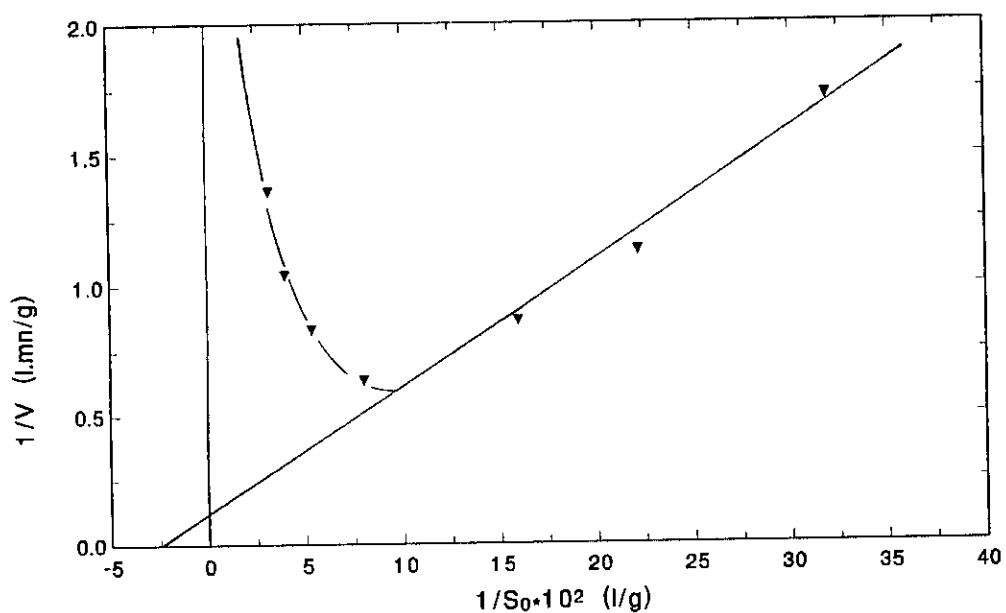


Figure 45 :Representation de Lineweaver-Burk pour l'hydrolyse papaique de l'Hemoglobine en mode discontinu
 $\text{pH} = 8, T = 55^{\circ}\text{C}, E = 4 \text{ g/l}$

Pour les faibles valeurs de S_0 inférieures à 12,53 g/l, la vitesse initiale croît progressivement et atteint une valeur maximale.

Inversement, les concentrations élevées en hémoglobine (supérieures à 12,53 g/l) provoquent une diminution de la vitesse initiale.

D'autre part la représentation en double inverse de Lineweaver Burk $1/v = f(1/S_0)$ en figure 45 donne lieu à une hyperbole, la cinétique d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine n'est donc pas michaelienne, il semble qu'il y ait inhibition par un excès de substrat.

L'asymptote oblique à cette hyperbole est de pente K_m/v_{max} et coupe l'axe des abscisses en $-1/K_m$.

Les valeurs de K_m et v_{max} sont donc calculées à partir de la figure 45.

$$K_m = 40 \text{ g/l} \quad \text{et} \quad v_{max} = 8,33 \text{ g/l.mn}$$

A défaut d'études cinétiques de l'hydrolyse de l'hémoglobine par la papaine, ces valeurs de K_m et v_{max} n'ont pas pu être comparées.

Cependant nous effectuerons une étude comparative entre les résultats obtenus en discontinu et en continu pour l'hydrolyse enzymatique de plusieurs protéines.

Nous étudierons la possibilité d'application d'un des deux modèles d'inhibition par le substrat (le complexe ESS est soit inactif - équation 8 - soit actif - équation 10 -) grâce à la détermination graphique des constantes β et K_s .

Pour cela deux méthodes sont suivies :

En premier, la représentation de $\frac{1}{1 - v/v_{max}}$ en fonction de $1/S_0$ en figure 46 permet la détermination graphique de K_s et β .

$$K_s = 3 \text{ g/l} \quad \text{et} \quad \beta = 0$$

Ces valeurs indiquent que le complexe ESS est inactif et que l'équation régissant ce mécanisme est l'équation 8 :

$$v = v_{max} \frac{S}{K_m + S + S^2/K_s}$$

La représentation de l'inverse de la vitesse initiale $1/v$ en fonction de la concentration initial S_0 en hémoglobine nous permet donc de confirmer les valeurs de K_s et v_{max} obtenues précédemment (figure 47)

$$K_s = 3 \text{ g/l} \quad \text{et} \quad v_{max} = 8,33 \text{ g/l mn.}$$

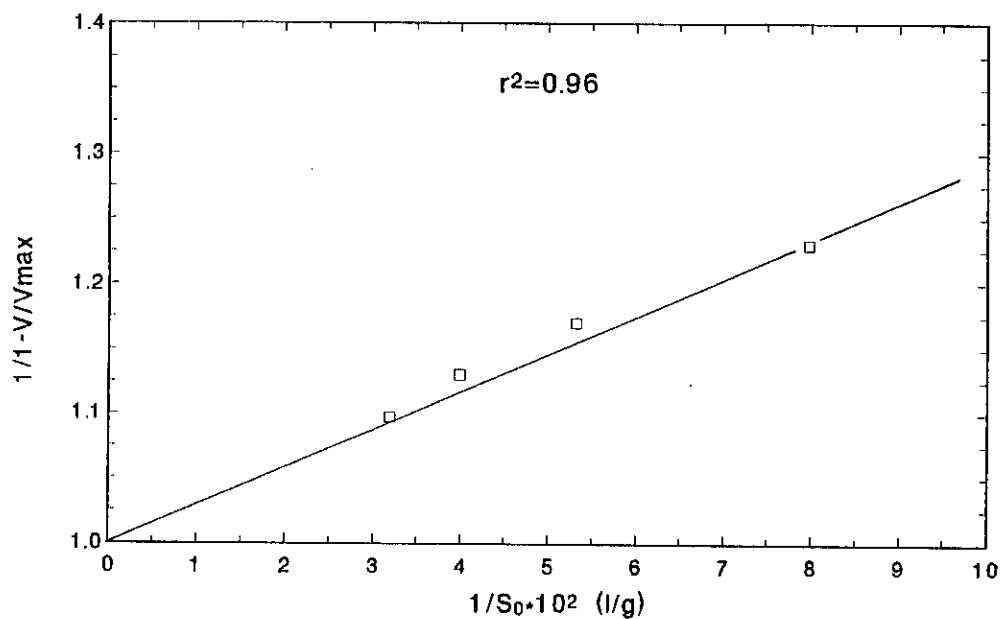


Figure 46 : Determination du type d'inhibition par le substrat
 pH = 8, T = 55°C, E = 4 g/l

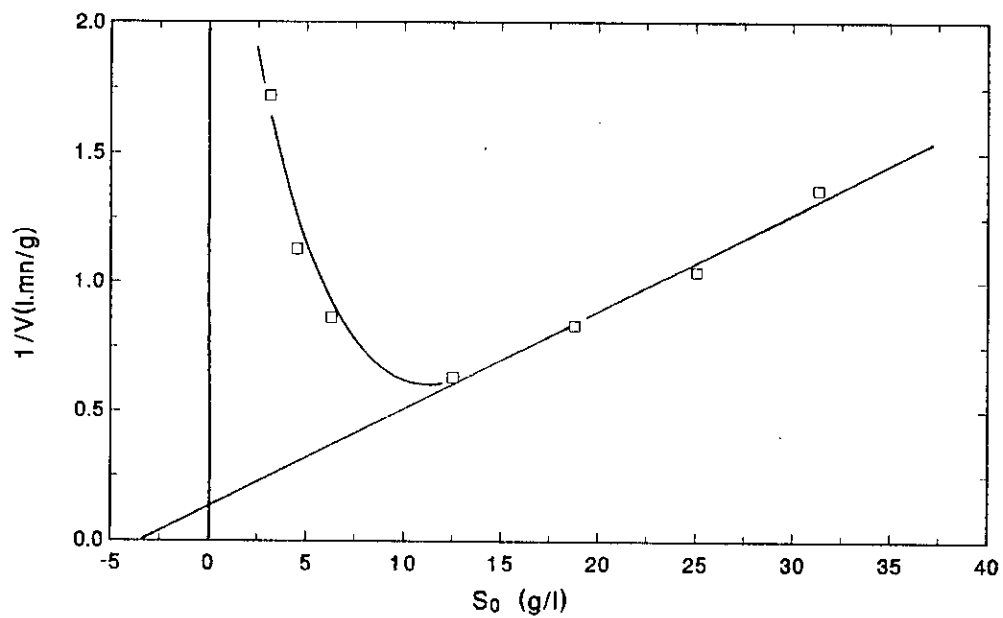


Figure 47 : Determination de la constante d'inhibition K_s
 pH = 8, T = 55°C, E = 4g/l

Il convient de noter que toutes ces constantes cinétiques ne sont qu'apparentes à cause de la complexité du substrat étudié.

Il existe cependant une éventualité que nous n'avons pas pu écarter en réacteur discontinu, celle de l'existence d'une inhibition de la papaïne par les produits de l'hydrolyse.

L'application de l'ultrafiltration pour la séparation entre le mélange Enzyme-substrat et les produits de réaction semble être une alternative sans équivoque pour la lutte contre ce type d'inhibition.

II-3-6- Etude du bilan de matière dans le réacteur discontinu :

Le bilan de matière dans un réacteur discontinu a été établie dans le chapitre IV (équation 16).

$$v = - \frac{dS}{dt}$$

Où v est la vitesse d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine par la papaïne en réacteur discontinu

S est la concentration en hémoglobine

t est le temps

L'expression de la vitesse d'hydrolyse enzymatique est :

$$v = v_{\max} \frac{S}{S + K_m + S^2/K_s}$$

$$v_{\max} \frac{S}{S + K_m + S^2/K_s} dt = - dS \quad (44)$$

Intégrons entre l'instant initial t = 0 et un temps quelconque t.

$$\int_0^t v_{\max} dt = - \int_{S_0}^S \left(1 + \frac{K_m}{S} + \frac{S}{K_s} \right) dS.$$

$$v_{\max} \cdot t = (S_0 - S) + K_m \log \frac{S_0}{S} + \frac{S_0^2 - S^2}{2 K_s} \quad (45)$$

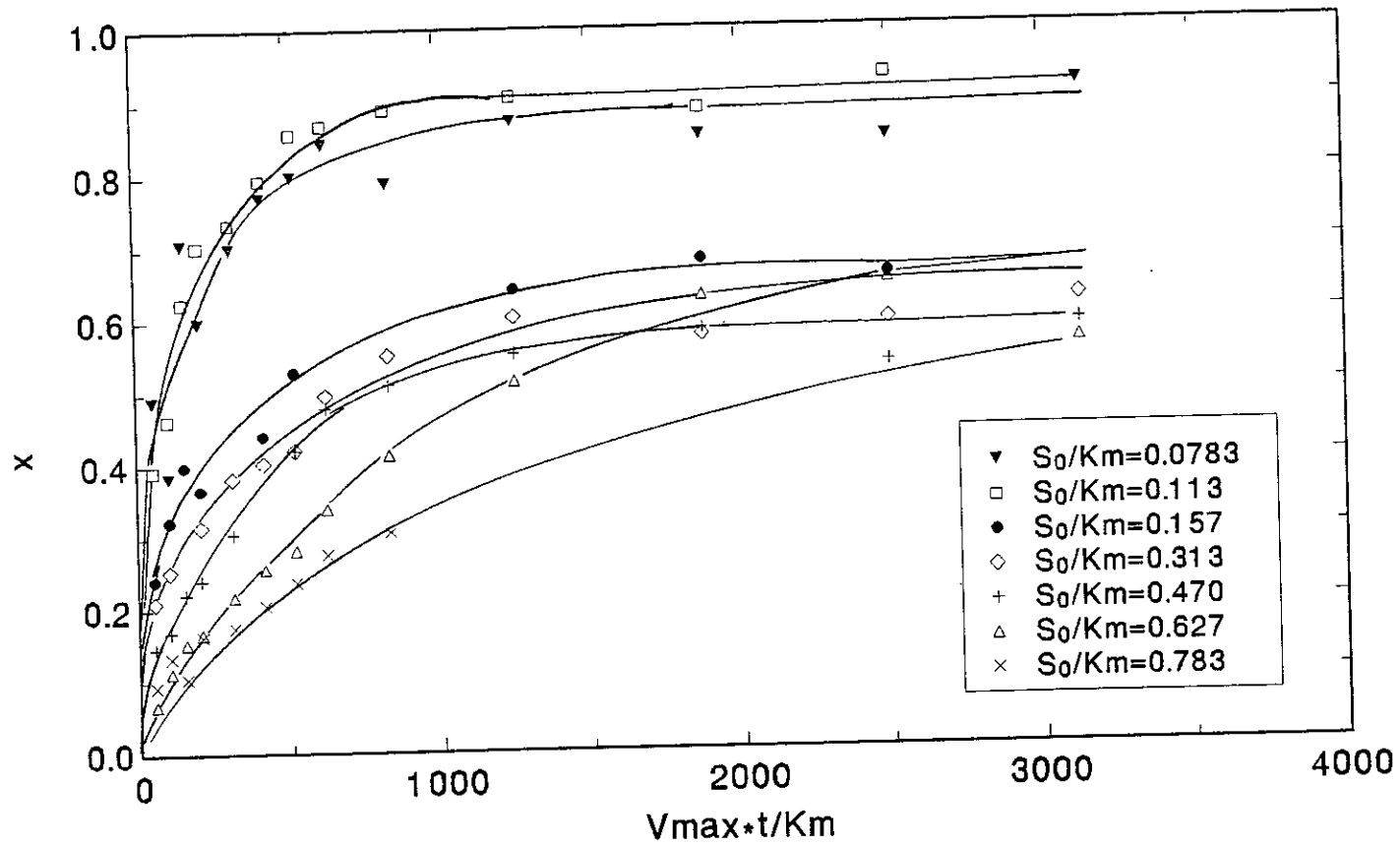


Figure 48 : Determination du bilan de matiere en reacteur discontinu
 $\text{pH} = 8$, $T = 55^\circ\text{C}$, $E = 4 \text{ g/l}$

Soit x le taux de conversion

$$x = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad \text{donc } S = S_0 (1 - x)$$

Le bilan de matière devient :

$$\frac{v_{\max} t}{K_m} = \frac{x S_0}{K_m} + \log \left(\frac{1}{1-x} \right) + \frac{x \cdot S_0^2 \cdot (2-x)}{2 K_m \cdot K_s} \quad (46)$$

en remplaçant K_m , v_{\max} et K_s par leurs valeurs l'équation 46 s'écrit :

$$0,208 t = x \cdot \frac{S_0}{40} + \log \left(\frac{1}{1-x} \right) + \frac{x S_0^2 (2-x)}{240}$$

Pour différentes valeurs de S_0/K_m , le taux de conversion x est représenté en fonction de $v_{\max} t / K_m$ en figure 48.

Nous constatons que les faibles valeurs de S_0/K_m assurent des taux de conversion élevés en un minimum de temps, les courbes obtenues pour $S_0/K_m = 7,833 \cdot 10^{-4}$; $11,278 \cdot 10^{-4}$ sont presque identiques.

Par contre, les fortes valeurs de S_0/K_m donnent des taux de conversion faibles qui n'évoluent que très lentement.

Dans un réacteur discontinu, le but principal est d'avoir un bon taux de conversion:rendement proche de 1 en un temps minimal, nous devons donc assurer des valeurs de S_0/k_m très faibles en jouant sur S_0 ou sur K_m .

Cela suppose le choix des faibles concentrations en substrat pour arriver à de bons rendements d'hydrolyse enzymatique ou le changement de l'enzyme à utiliser.

En conclusion l'étude de l'hydrolyse papaïque de l'hémoglobine en mode discontinue, nous a permis d'une part d'optimiser les paramètres pH, température et concentration en enzyme et d'autre part de faire une étude cinétique approfondie de la réaction d'hydrolyse.

Le bilan de matière établi dans ces conditions a orienté notre choix de gamme de concentration en substrat à utiliser en réacteur discontinue.

II-4- Etude de l'hydrolyse enzymatique en réacteur continue couplé à un ultrafiltre :

Le couplage du module d'ultrafiltration à un réacteur enzymatique permet le passage d'un procédé discontinu à un procédé continu.

Il importe que la membrane utilisée soit imperméable à l'enzyme. La rétention de celle-ci nécessite donc un seuil de coupure relativement bas, ce qui pose une limite aux débits de perméat.

Un compromis entre ces deux phénomènes doit être fait pour le choix de la membrane la plus appropriée.

L'efficacité de deux membranes à seuils de coupure différents a été étudiée.

- Une membrane carbosep M14 (0,14 μm) à seuil de coupure élevé, la rétention de l'enzyme est assurée grâce à un colmatage approprié.

- Une membrane carbosep M5 (10.000 Da) à faible seuil de coupure.

Nous avons en premier, déterminé la perméabilité hydraulique L_p pour les deux membranes propres.

Nous avons ensuite étudié les paramètres hydrodynamiques de l'ultrafiltration de l'hydrolysât enzymatique avec recyclage de perméat, diverses vitesses de recirculation ont été testées.

L'ultrafiltration est alors couplé à l'hydrolyse enzymatique avec les deux membranes M14 et M5.

II-4-1- Détermination de la courbe du solvant :

Le passage de l'eau déminéralisée sur la membrane propre, à débit constant permet la mesure de la perméabilité à l'eau L_p .

Pour chaque pression transmembranaire ΔP , les débits de perméat sont mesurés à température ambiante par empotage.

Le flux de perméat J_v en l/h.m^2 est dans tous les cas déterminé par la formule suivante :

$$J_v = \frac{Q_p}{S_m} \quad (47)$$

Où Q_p est le débit de perméat en l/h

S_m est la surface d'échange de la membrane en m^2

$S_m = 120 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ pour les deux membranes M14 et M5.

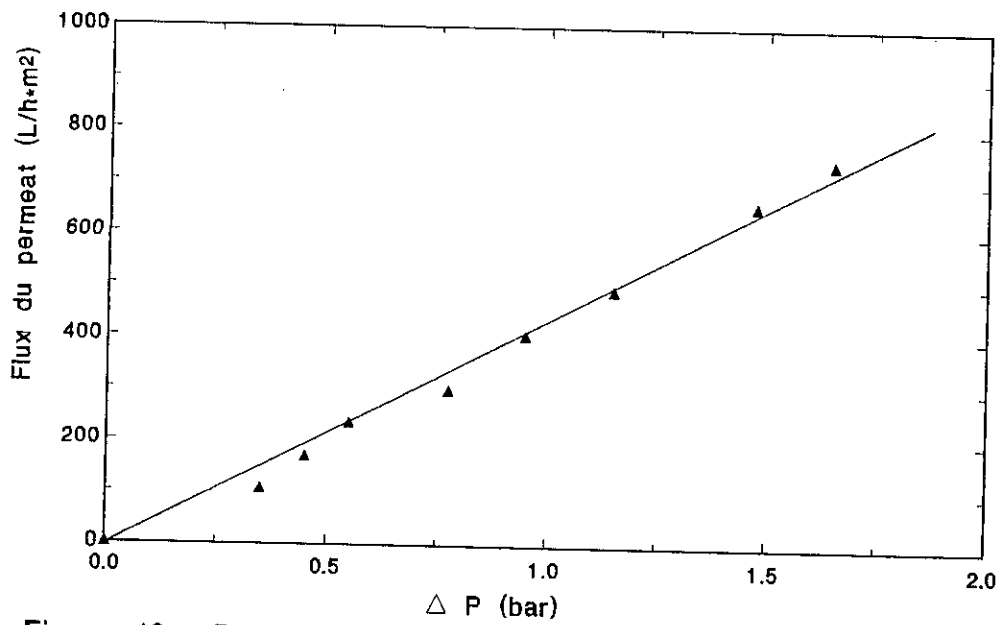


Figure 49 : Determination de la courbe du solvant pour la membrane M14 .

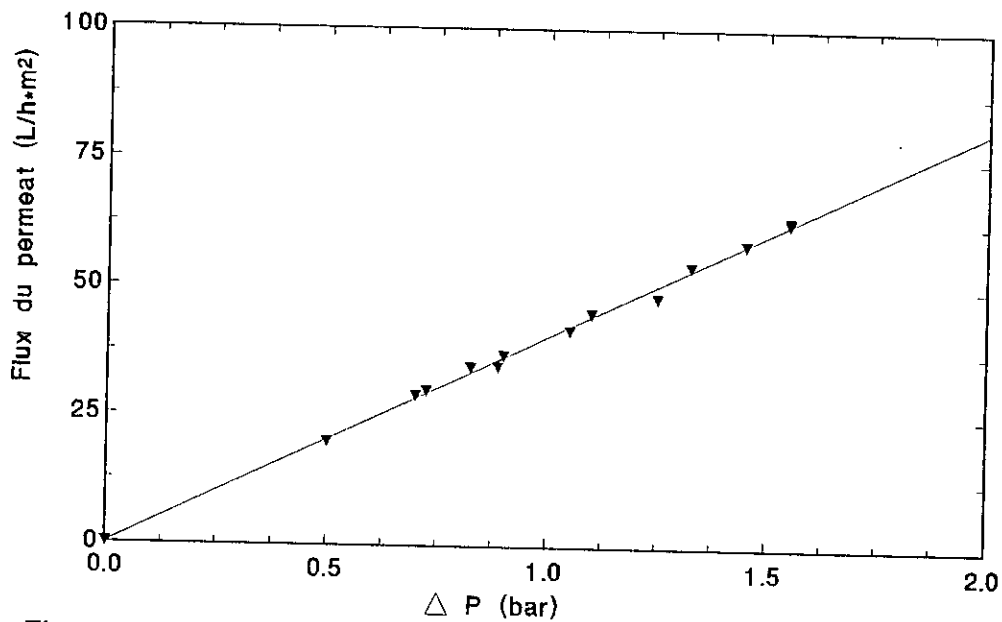


Figure 50 : Determination de la courbe du solvant pour la membrane M5 .

Les figures 49 et 50 représentent l'évolution de J_v en fonction de ΔP , respectivement pour la membrane M14 et M5, nous obtenons deux droites passant par l'origine de pente $L_p = 402,97 \text{ l/h.m}^2 \cdot \text{bar}$ pour la membrane M14 et $L_p = 40,73 \text{ l/h.m}^2 \cdot \text{bar}$ pour la membrane M5.

La variation du flux de perméat J_v en fonction de la pression transmembranaire ΔP obéit donc à l'équation de DARCY (équation 32) (BRUN, 1989).

La mise en place ou non de l'âme inox dans le module détermine l'épaisseur de la lame liquide.

Elle est essentiellement utilisée dans les cas suivants :

- Les produits peu chargés en matières en suspension, les produits peu visqueux, les produits fragiles.

- Si la pompe de recirculation n'est pas assez puissante pour assurer des vitesses de recirculations élevées sans âme inox.

Dans notre cas, La pompe de recirculation utilisée donne un débit maximale de 106,88 l/h qui correspond à une vitesse de 1,0688 m/s sans âme inox et à une vitesse de 3,42 m/s avec âme inox.

Les courbes de solvants obtenues avec et sans âme inox, sont identiques, la perméabilité hydraulique L_p est de $L_p = 402,97 \text{ l/h.m}^2 \cdot \text{bar}$ pour la membrane M14 et $L_p = 40,73 \text{ l/h.m}^2 \cdot \text{bar}$ pour la membrane M5.

Ainsi, l'utilisation de l'âme inox sera effectuée pour opérer à des vitesses de recirculation élevées.

II-4-2- Influence de la vitesse de recirculation et de la pression transmembranaire sur le flux de perméat :

Un hydrolysate d'hémoglobine à concentration initiale de 12,53 g/l est préparé en réacteur discontinu à pH8 et à une température de 55°C.

La solution péptidique obtenue est ensuite ultrafiltrée à différentes vitesses de recirculation et pressions transmembranaires.

II-4-2-1- Cas de la membrane M14 :

Les courbes de variation du flux de perméat J_v en fonction de la pression transmembranaire ΔP pour différentes vitesses de recirculation 0,133 m/s, 0,4008 m/s et 0,668 m/s sont représentées en figure 51.

La variation du flux de perméat est linéaire pour les faibles valeurs de pression transmembranaire. Au delà d'une certaine valeur de la pression pour chaque vitesse de recirculation, cette linéarité n'est plus respectée. Le flux de

perméat devient constant et indépendant de la pression confirmant ainsi l'existence d'une polarisation de la membrane.

Pour une vitesse de recirculation de 0,133 m/s, cette pression transmembranaire limite est de 0,5 bar. Par contre pour les vitesses de recirculation de 0,4008 m/s et de 0,668 m/s, celle ci s'élève respectivement à 0,8 et 1,2 bar.

D'autre part, nous constatons que l'augmentation de la vitesse de recirculation provoque une croissance du flux de perméat, les performances de l'ultrafiltration sont donc améliorées.

En conclusion, l'ultrafiltration de l'hydrolysât peptidique avec recyclage de perméat, nous permet de prévoir les performances du couplage des deux techniques hydrolyse et ultrafiltration.

Une pression transmembranaire relativement faible de l'ordre de 0,8 bar sera choisie pour la suite de notre étude.

Le choix définitif de la vitesse de recirculation sera effectuée en mode continu, pour plus de précision et pour voir l'influence de celle ci sur les performances de l'hydrolyse enzymatique.

II-4-2-2- Cas de la membrane M5 :

Suivant le même protocole expérimentale, différentes vitesses de recirculation ont été testées pour la membrane M5.

La figure 52 représente l'évolution des flux de perméat J_v , en fonction de la pression transmembranaire ΔP .

Initialement, le flux varie linéairement avec la pression pour l'ensemble des vitesses utilisées. Au delà d'une certaine valeur de pression, celui ci devient indépendant de la pression et tend à se stabiliser.

Cette pression limite est de 1,15 bar pour la vitesse de 0,133 m/s et atteint 1,35 bars et 1,4 bars respectivement pour les vitesses 0,4008 m/s et 0,668 m/s.

Pour déterminer la vitesse de recirculation optimale, l'étude en mode continu est plus représentative, deux pressions transmembranaires ont été étudiées $\Delta P = 0,8$ bar et $\Delta P = 1,35$ bars.

La première pour comparer les performances des deux membranes M14 et M5 dans les mêmes conditions, et la seconde pour voir l'influence d'une pression élevée sur l'hydrolyse enzymatique.

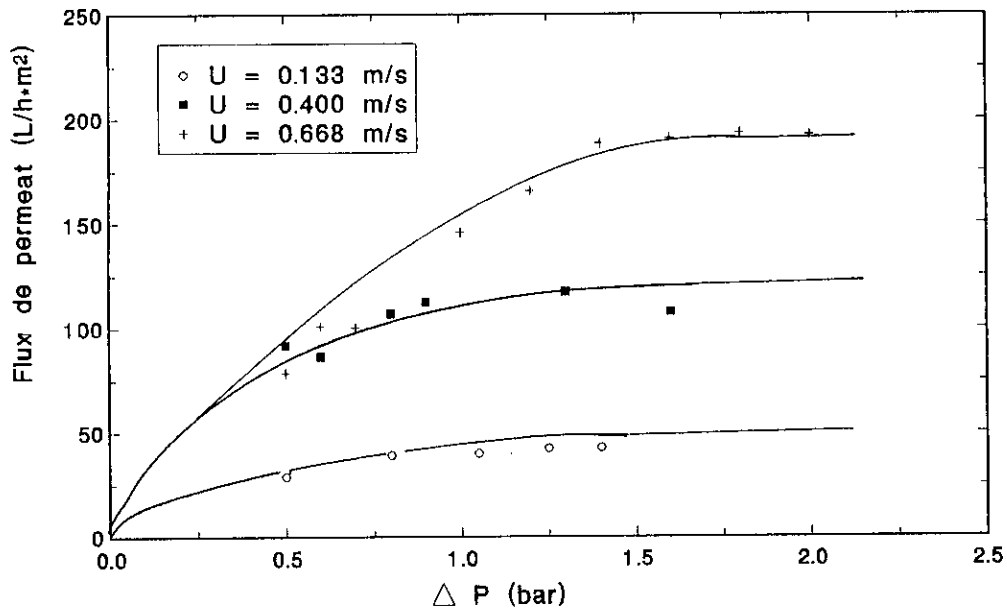


Figure 51 : Influence de la vitesse de recirculation et de la pression transmembranaire sur le flux de permeat pour la membrane M14 .

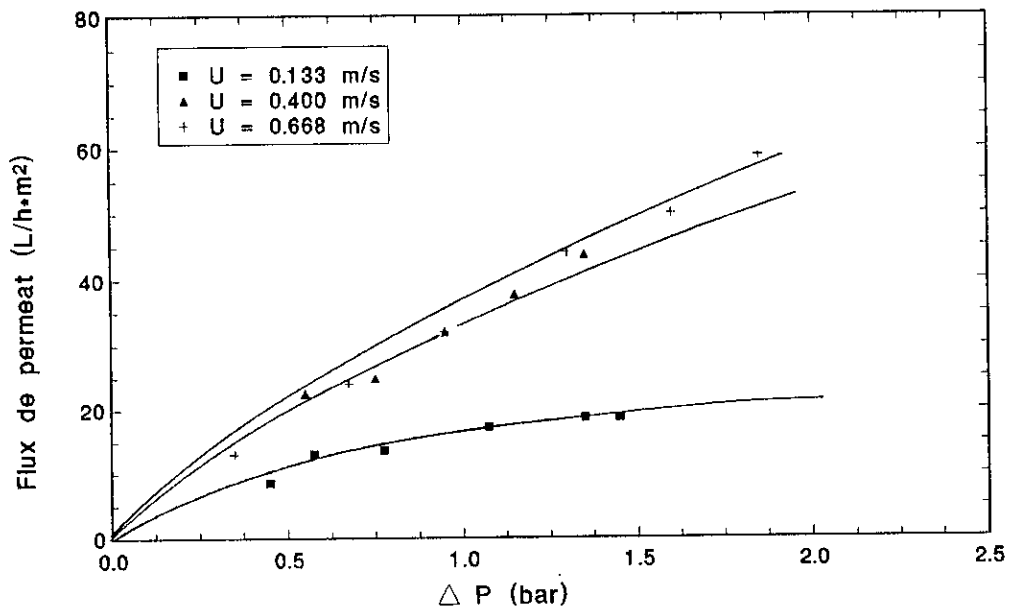


Figure 52 : Influence de la vitesse de recirculation et de la pression transmembranaire sur le flux de permeat pour la membrane M5 .

II-4- 3 - Etude du couplage de l'ultrafiltration à l'hydrolyse enzymatique dans un bioréacteur en continu :

Le couplage du module d'ultrafiltration au réacteur enzymatique utilisé auparavant permet la production d'un hydrolysât péptidique en continu.

Plusieurs étapes ont régis notre étude :

- Au début, nous avons étudié les performances et l'efficacité des membranes M5 et M14.

Pour ce faire, nous avons déterminé l'activité enzymatique résiduelle dans le retentat, le milieu réactionnel et enfin dans le perméat.

- Nous avons ensuite effectué le couplage des deux techniques (hydrolyse et ultrafiltration) en se situant aux conditions optimales d'activité de l'enzyme, et de fonctionnement du module d'ultrafiltration à différentes vitesses de recirculation.

- Nous étudions alors, la cinétique d'hydrolyse enzymatique en continu et la possibilité d'application du modèle cinétique de Michaélis - Menten, et en fin de ce procédé, nous avons tenté de comprendre le mécanisme de colmatage dans les deux membranes utilisées.

II-4-3-1- Etude de la rétention de l'enzyme :

Dans tout procédé d'ultrafiltration, il est nécessaire de s'assurer que la membrane utilisée est imperméable à l'enzyme, dans le cas contraire son utilisation serait inefficace.

II-4-3-1-1- Cas de la membrane M14 :

L'activité enzymatique résiduelle de la papaïne est évaluée au cours de l'hydrolyse en continu, de l'hémoglobine.

Le substrat standard utilisé est la caséine entière et le protocole de mesure d'activité suivi est celui cité au chapitre matériels et méthodes et étudié par KONDO et al (1994).

La figure 53 illustre l'évolution des activités résiduelles de la papaïne au cours du temps, pour le perméat, le retentat et le mélange réactionnel lors de l'utilisation de la membrane M14.

Après 120 minutes de fonctionnement, l'activité de la papaïne dans le mélange réactionnel est appréciable 75% de son activité initiale, la diminution globale d'activité enzymatique est donc d'environ 25%.

Cette légère perte d'activité semble être due soit à la fuite progressive de l'enzyme ou des fragments d'enzyme dans le perméat (GAOUAR, 1995), (LECONTE, 1989), soit au chauffage prolongé de celle-ci qui cause sa dénaturation thermique.

D'autre part, l'activité enzymatique du retentat diminue d'une manière générale au cours du temps, au bout de 120 minutes, celle ci atteint 80% de sa valeur initiale.

Ceci est vraisemblablement du au piégeage de l'enzyme à la surface de la membrane colmatée par adsorption ou par blocage au niveau des pores membranaires (VAN DER HORST, 1995), (BOYEN et HALL, 1995), (PUNIDADAS et al, 1990).

S'ajoute à cela, toutes les contraintes mécaniques et thermiques causées par l'agitation, le pompage, le recyclage, et le chauffage qui dénaturent progressivement l'enzyme.

Le perméat présente une activité croissante au cours du temps, elle tend à se stabiliser au bout de 100 minutes de fonctionnement.

L'activité détectée au perméat après 3 heures s'élève à 43,4% qui est une valeur assez élevée.

Celle ci est probablement causée par, le passage à travers les pores de la membrane soit des molécules de papaïne entières, soit des fragments d'enzyme actifs provenant de l'autolyse de la papaïne.

L'efficacité du colmatage de notre membrane est donc à améliorer, si le réacteur continu est utilisé pendant de longues périodes.

Par ailleurs un colmatage trop accentué donne lieu à un débit de perméat très faible, ce qui rend le procédé d'ultrafiltration peu performant.

PUNIDADAS et al (1990), illustrent le colmatage des membranes par les protéines en citant toutes les contraintes qui peuvent s'opposer au flux du perméat J_v ; ils proposent donc une expression en considérant toutes les résistances :

$$J_v = \frac{\Delta P}{R_m + R_{rev} + R_{irr}} \quad (48)$$

Où R_m est la résistance de la membrane propre

R_{rev} est la résistance qui se forme sur la surface de la membrane et s'élimine par rinçage.

R_{irr} est la résistance due à un colmatage interne irréversible.

Plus R_{irr} est grande plus les pores membranaires tendent à se colmater et la perméabilité hydraulique L_p , difficile à réobtenir.

Le but de la présente étude n'est pas de bloquer les pores de la membrane, mais de stabiliser la couche de polarisation et d'assurer par la même une adsorption réversible du mélange colmatant de façon à pouvoir régénérer la membrane en fin de procédé.

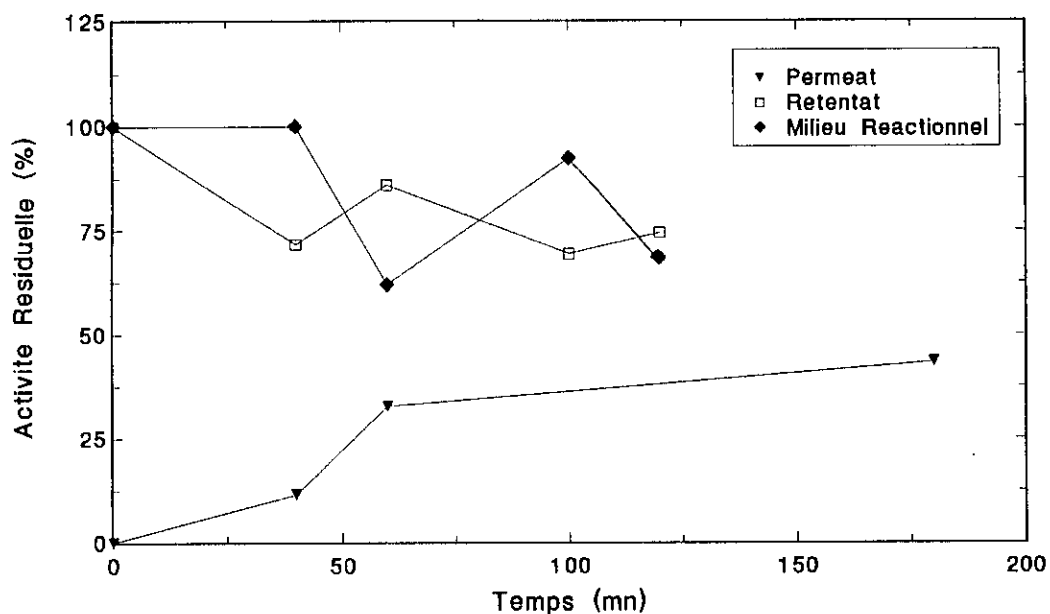


Figure 53 : Evolution de l'activité résiduelle de la papaine au cours de l'hydrolyse en réacteur continu à membrane .
Cas de la membrane M14.

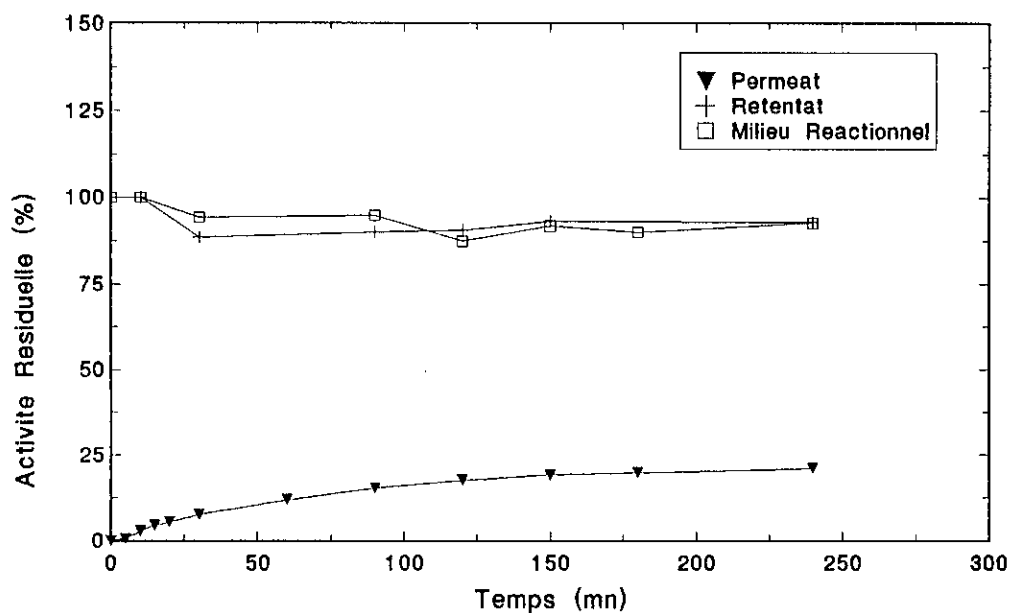


Figure 54 : Evolution de l'activité résiduelle au cours de l'hydrolyse enzymatique en réacteur continu à membrane .
Cas de la membrane M5 .

Pour cela deux solutions protéiques ont été testés pour le colmatage de la membrane M14, une solution d'hémoglobine et une solution peptidique obtenue par hydrolyse enzymatique de cette protéine.

Les deux méthodes ont données des résultats similaires, pour la suite de notre travail avec la membrane M14, le colmatage sera effectué pendant 1 heure avec l'une ou l'autre des deux solutions suivant le but de l'essai.

Une étude plus approfondie du mécanisme de colmatage des membranes sera présenté dans les chapitres suivants .

II-4-3-1-2- Cas de la membrane M5 :

Un essai similaire est effectué avec la solution de papaine à 4 g/l, à 55°C et à pH = 8.

La solution d'enzyme recircule dans le réacteur à membrane avec recyclage de perméat et du retentat, le volume réactionnel est donc maintenue constant.

A intervalles de temps réguliers des mesures d'activités résiduelles ont été effectuées sur le perméat, le retentat et le mélange réactionnel.

La figure 54 représente l'évolution de ces activités résiduelles en fonction du temps. Le retentat et le mélange réactionnel présentent des activités enzymatiques élevées tout le long de la manipulation.

Après 4 heures d'ultrafiltration, elles atteignent respectivement 92,66% et 92,83%, cette légère diminution semble probablement être due à l'hétéroporosité de la membrane M5, causant ainsi d'éventuelles pertes d'enzyme dans le perméat.

Sans oublier toutes le contraintes mécaniques et thermiques ainsi que les phénomènes d'adsorption à la surface de la membrane.

Par ailleurs, l'activité enzymatique dans le perméat augmente légèrement au cours de l'ultrafiltration pour atteindre 20,94% après 4 heures.

Ceci est principalement du à la fuite de fragments d'enzyme ou éventuellement d'enzymes entières dans le perméat.

Ainsi les phénomènes observés avec la membrane M14 colmatée se reproduisent avec la membrane M5 mais à une intensité moindre. Le perméat recueilli de la membrane M5 est beaucoup moins actif que celui obtenu avec la membrane M14.

En conclusion pour prolonger l'efficacité des deux membranes, il faudra penser à apporter l'enzyme en petites fractions au lieu de l'introduire initialement et de risquer ainsi d'avoir des pertes d'activités élevées.

II-4-3-2- Influence de la vitesse de recirculation sur les performances de l'hydrolyse enzymatique en réacteur continue à ultrafiltre:

Une gamme de vitesses assez large a été choisie pour mener à bien cette série de manipulations.

L'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine est effectuée en deux phases.

- 1 heure de discontinu et 3 heures de continu avec couplage du module d'ultrafiltration, muni de la membrane M14 colmaté ou de la membrane M5.

Les conditions opératoires sont : pH = 8

- Une température de 55°C
- Une concentration en papaïne de 4 g/l
- Une concentration en hémoglobine de 12,53 g/l

II-4-3-2-1- Cas de la membrane M14 :

La solution péptidique obtenue par hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine est utilisée pour colmater la membrane M14.

La procédure suivie est celle citée en matérielset méthodes. Le colmatage est effectué pendant 1 heure.

La phase d'hydrolyse en continue commence donc quand la vanne de sortie du perméat est ouverte et la vanne sortie du retentat fermée jusqu'à l'obtention d'une pression transmembranaire de 0,8 bar.

Cette dernière étape est donc poursuivie pendant 3 heures, cinq vitesses ont été expérimentées 0,4008 m/s ; 0,668 m/s ; 0,93 m/s sans utilisation d'âme inox et 2,23 m/s ; 3,12 m/s avec utilisation de l'âme inox.

La figure 55 illustre l'évolution des degrés d'hydrolyse en fonction du temps pour chaque vitesse de recirculation pour les deux phases d'hydrolyse (discontinue et continue).

Pour toute la série d'essai, les degrés d'hydrolyse en phase discontinue sont presque identiques et de l'ordre de 18,46% . Ce résultat confirme la reproductibilité des hydrolysats d'hémoglobine (WISMER - PEDERSEN, 1988) ; (LECONTE, 1989) ; (PIOT, 1989).

En phase continue, les degrés d'hydrolyse diffèrent suivant la vitesse de recirculation de l'essai.

Pour les vitesses modérées 0,4008 m/s, 0,668 m/s et 0,93 m/s, les degrés d'hydrolyse augmentent avec la croissance de la vitesse de recirculation pour atteindre en fin de manipulation respectivement 23,46% , 25,76% et 27,49%.

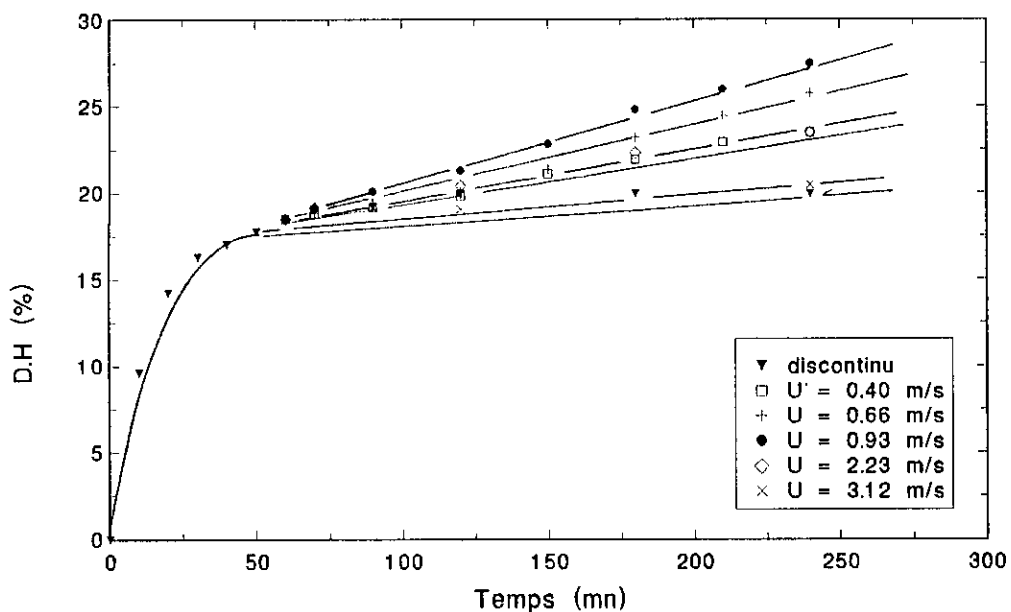


Figure 55 : Influence de la vitesse de recirculation sur le degre d'Hydrolyse . Cas de la membrane M14.

$S_0=12.53$ g/l, $T = 55^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8$, $E = 4\text{g/l}$, $\Delta p=0.8\text{bar}$

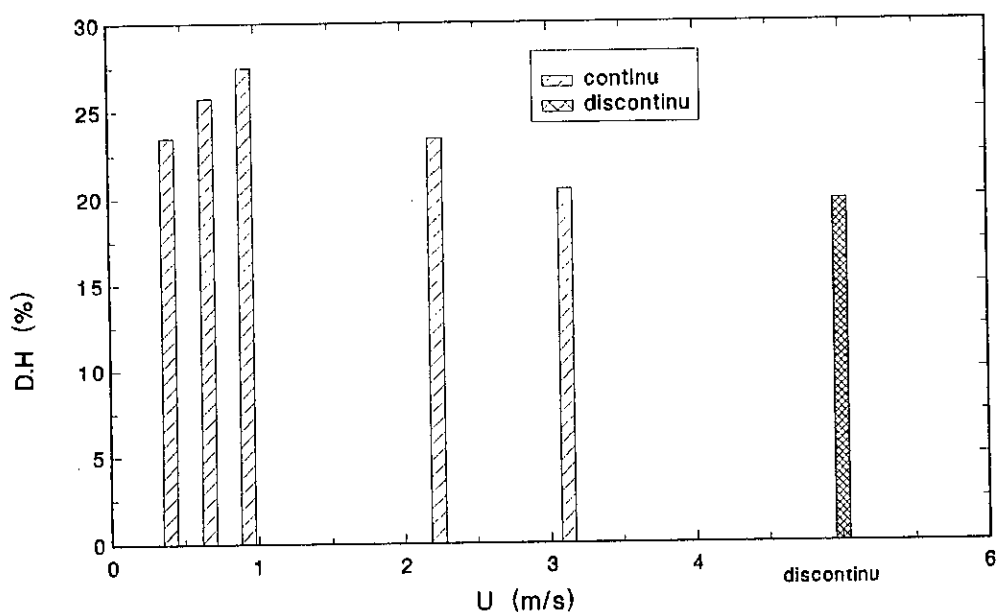


Figure 56 :Influence de la vitesse de recirculation sur le degre d'Hydrolyse global .Cas de la membrane M14.

Cependant les degrés d'hydrolyse obtenus à des vitesses de recirculation plus élevées (2,23 m/s et 3,12 m/s) ne suivent pas la même tendance.

En effet, dans ce cas l'élévation de la vitesse provoque la diminution des degrés d'hydrolyse pour atteindre des valeurs très faibles respectivement 23,40% et 20,45%.

La figure 56 représente les degrés d'hydrolyse globaux pour toutes les vitesses de recirculation, après 4 heures d'hydrolyse (1 heure de discontinu, et 3 heures de continu), ainsi que le degré d'hydrolyse après 4 heures de réaction en discontinue seulement.

Nous constatons d'une part que l'utilisation du réacteur continu augmente les performances de l'hydrolyse pour toutes les vitesses de recirculation et d'autre part, qu'il existe une vitesse de recirculation optimale permettant d'obtenir un maximum en degré d'hydrolyse.

Ainsi l'hydrolyse est meilleure pour les vitesses comprises entre 0,668 m/s et 0,93 m/s (sans âme inox) avec un léger ascendant pour 0,93 m/s.

De plus l'évaluation de la productivité instantanée P_i pour le bioréacteur continue à membrane, donne plus d'information sur la qualité de l'hydrolysât obtenu.

Ce paramètre défini par CHERYAN et DEESLIE (1983), représente la masse de peptides produits dans le perméat par unité de masse d'enzyme.

$$P_i = \frac{C_p \cdot Q_p \cdot t}{E \cdot V} \quad (49)$$

Où P_i est la productivité instantanée en réacteur continue (g/g).

C_p est la concentration en peptides dans le perméat (g/l).

Q_p est le débit de perméat (l/h).

t est le temps (h)

E est la concentration en enzyme (g/l)

V est le volume du réacteur (l)

La représentation en figure 57 des productivités instantanées en fonction du temps montre que celles ci augmentent avec les vitesses de recirculation.

Les degrés d'hydrolyse obtenus pour les deux vitesses 2,23 m/s, 3,12 m/s sont les plus faibles.

Ceci est probablement du aux valeurs élevées du débit de recirculation qui ne permettent pas un temps de contact enzyme - substrat assez élevé.

De plus, il semblerait aussi qu'à ces vitesses de recirculation, il y aurait un passage de l'enzyme dans le perméat au début de l'expérimentation.

En effet, au moment du démarrage, la fraction péptidique contenue dans le perméat est plus élevée que celle contenue dans le retentat ou dans le milieu réactionnel, comme le montre le tableau 6.

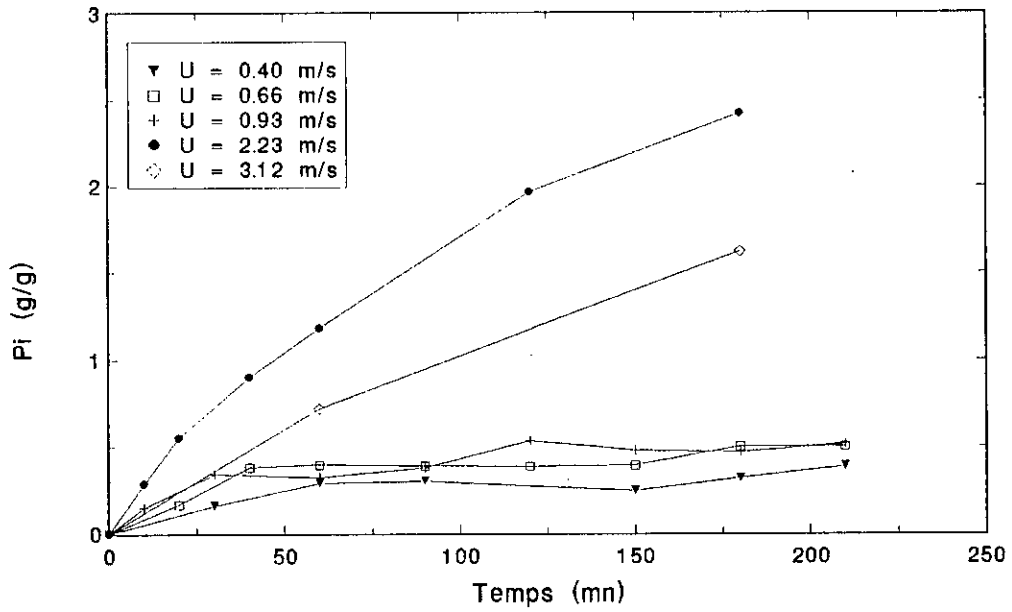


Figure 57: Influence de la vitesse de recirculation sur la productivité instantanée. Cas de la membrane M14
 $S_0=12.53$ g/l, pH=8, $T=55^\circ\text{C}$, $E=4$ g/l, $\Delta P=0.8$ bar

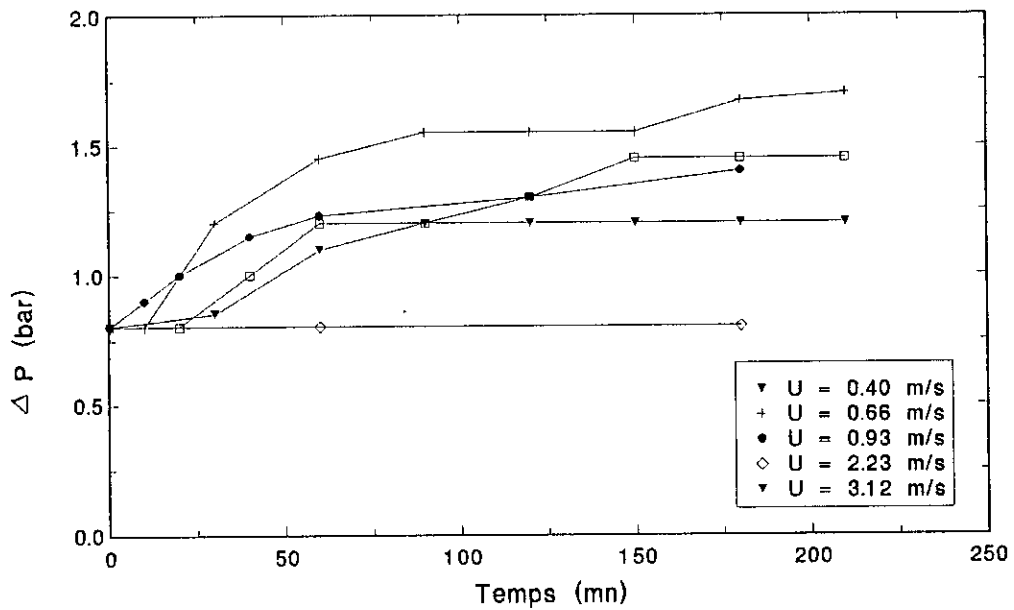


Figure 58: Influence de la vitesse de recirculation sur la pression transmembranaire. Cas de la membrane M14.
 $S_0=12.53$ g/l, $T=55^\circ\text{C}$, pH=8, $E=4$ g/l,

Ces vitesses élevées ne permettent donc pas d'obtenir un colmatage stable en seulement une heure à cause de l'augmentation des turbulences qu'elles engendrent au niveau des pores membranaires

Tableau 6 : Influence de la vitesse de recirculation sur l'hydrolyse enzymatique en continue pH8, T = 55°C, E = 4 g/l , So = 12,53 g/l , $\Delta P = 0,8$ bar.

| Vitesse de recirculation U(m/s) | Concentration en peptides (g/l) | | Flux de perméat (l/h.m ²) | | Degré d'hydrolyse (%) | Productivité (g/g) |
|------------------------------------|---------------------------------|---------|---------------------------------------|-------|-----------------------|--------------------|
| | Retentat | Perméat | | | | |
| Temps (h) | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 |
| 0,4008 | 8,63 | 7,16 | 38,08 | 12,50 | 23,46 | 0,320 |
| 0,668 | 7,34 | 6,36 | 50,15 | 17,54 | 25,76 | 0,500 |
| 0,93 | 6,28 | 7,81 | 109,49 | 16,34 | 27,49 | 0,397 |
| 2,23 | 8,00 | 8,73 | 135,68 | 75,10 | 23,40 | 1,935 |
| 3,12 | 7,59 | 8,89 | 137,46 | 60,00 | 20,45 | 1,620 |

Enfin, l'évolution de la pression transmembranaire ΔP et du flux de perméat J_v en fonction du temps présentés aux figures 58 et 59 respectivement pour toute la série de vitesses de recirculation permet de faire deux constatations :

- La pression transmembranaire augmente au cours du temps en se stabilisant au bout de deux heures de continue. Cette élévation de pression est probablement due à l'accumulation des macropéptides hémiques dans la couche limite située au voisinage de la membrane (LECONTE, 1989).

- Le débit de perméat diminue au début très rapidement et fini par se stabiliser lui aussi après 1 à 2 heures de continue.

Pour les essais avec âme inox, la chute en débit de perméat est notable. A la vitesse 3,12 m/s, J_v décroît de 131,46 l/h.m² à 68,74 l/h.m² en seulement 20 minutes d'hydrolyse.

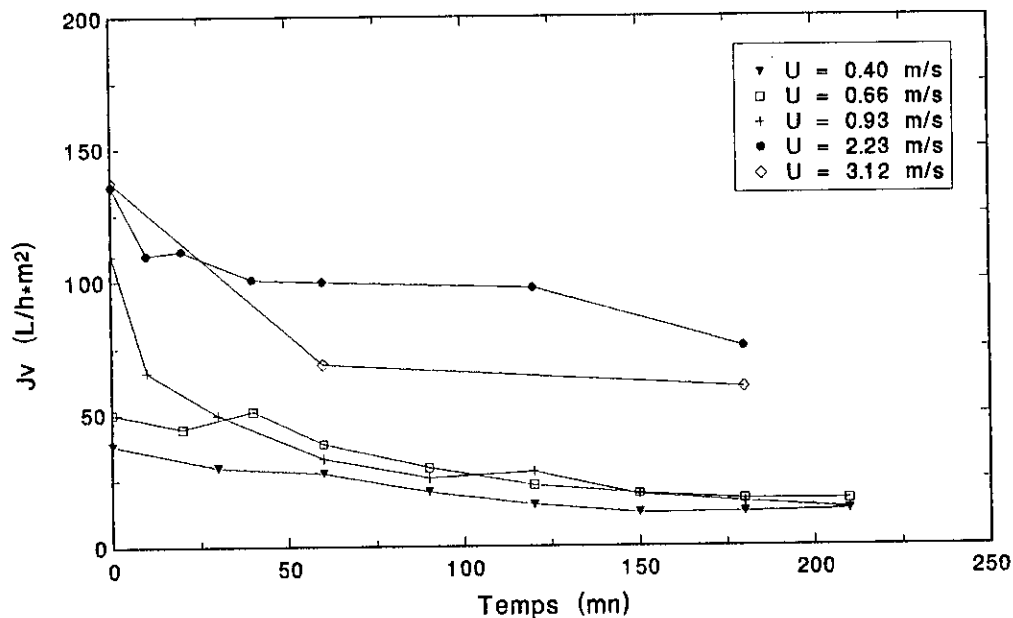


Figure 59 : Influence de la vitesse de recirculation sur le flux de perméat .Cas de la membrane M14 .
 $S_0=12.53 \text{ g/l}$, $T=55^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8$, $E=4\text{g/l}$, $\Delta P=0.8 \text{ (bar)}$

Le même phénomène est observé pour les essais sans âme inox, mais avec une intensité moindre, sauf pour la vitesse 0,93 m/s où la perte en débit de perméat est appréciable.

En définitive, la vitesse 0,668 m/s semble être la plus appropriée, la chute en débit de perméat est faible et le régime permanent est rapidement atteint, comme le montre de tableau comparatif 6, Le degré d'hydrolyse et la productivité obtenus sont appréciables et respectivement de l'ordre de 25,76% et 0,5 (g/g) avec en moyenne un rendement peptidique de 55,38%.

II-4-3-2-2- Cas de la membrane M5 :

La membrane M5 mise en place, deux séries de vitesses de recirculation ont été expérimentées respectivement à une pression transmembranaire $\Delta P = 0,8$ bar et $\Delta P = 1,35$ bar.

L'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine à une concentration de 12,53 g/l est effectuée à l'aide de deux phases, une phase en discontinu pendant 1 heure et une phase en continu avec couplage du module d'ultrafiltration pendant 3 heures.

Le même protocole expérimentale que la membrane M14 est donc suivi mais sans colmatage de la membrane, deux vitesses de recirculations 0,4008 m/s et 0,668 m/s ont été testées à une pression de 1,35 bars et deux autres vitesses 0,668 m/s et 2,23 m/s à une pression de 0,8 bar.

La figure 60 représente l'évolution des degrés d'hydrolyse pour les deux phases discontinue et continue pour toute la série de vitesses étudiées.

La vitesse 0,668 m/s à 1,35 bar présente les degrés d'hydrolyse les plus élevées 30,74% en fin de procédé.

par contre pour, la vitesse 0,4008 m/s à la même pression les plus faibles performances ont été obtenues.

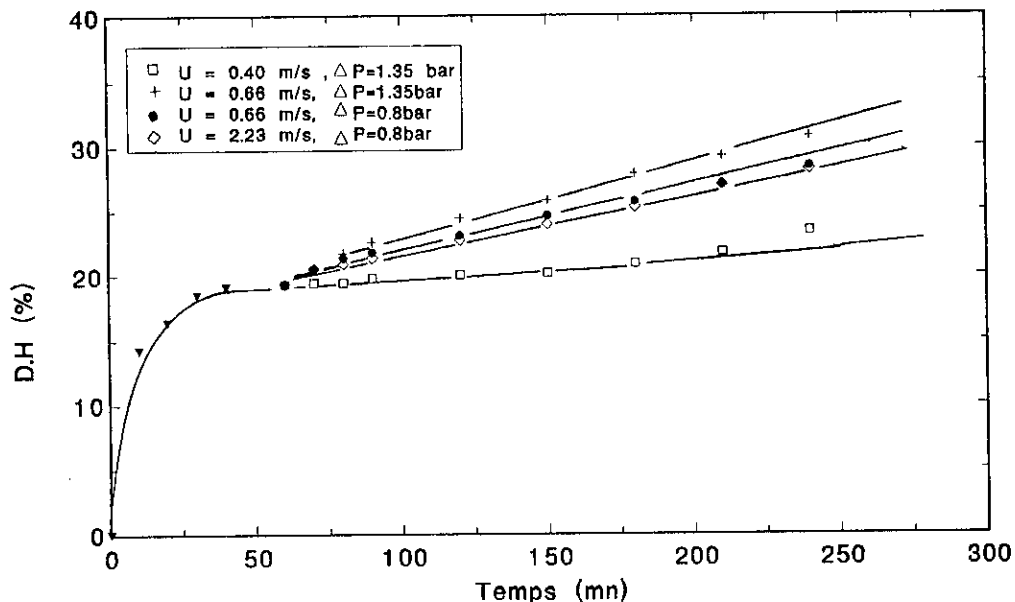


Figure 60: Influence de la vitesse de recirculation sur le degré d'Hydrolyse .Cas de la membrane M5 .

$S_0=12.53$ g/l, $T=55^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8$, $E=4\text{g/l}$

Cependant à 0,8 bar, les deux vitesses étudiées 0,668 m/s et 2,23 m/s aboutissent à des degrés d'hydrolyse appréciables et très proches (28,42% et 28,22%).

Par ailleurs, la détermination des productivités instantanées P_i montre que le maximum est observé à la vitesse 2,23 m/s suivi par la vitesse 0,668 m/s à la pression transmembranaire de 0,8 bar (figure 61).

A 1,35 bars, les productivités instantanées obtenues sont faibles, 0,603 et 0,51 respectivement pour 0,668 m/s et 0,4008 m/s.

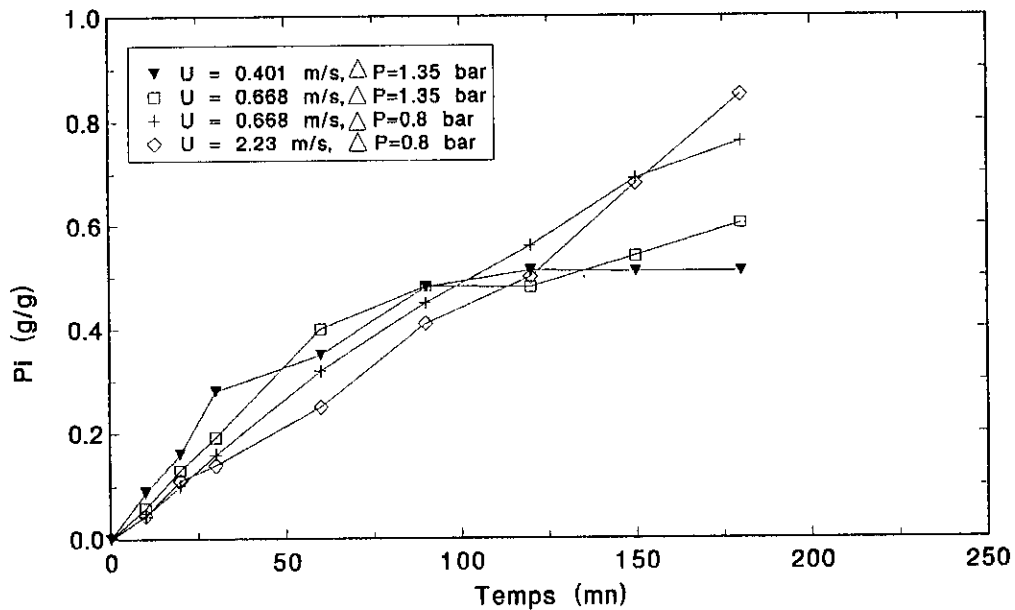


Figure 61: Influence de la vitesse de recirculation sur la productivité instantanée. Cas de la membrane M5.

$S_0 = 12.53$ g/l, $T = 55^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8$, $E = 4$ g/l

Le Tableau 7 illustre l'influence des différentes vitesses et des pressions transmembranaires sur les performances de l'hydrolyse enzymatique.

Tableau 7 : Influence de la vitesse de recirculation et de la pression transmembranaire sur l'hydrolyse enzymatique en continue

pH = 8, T = 55°C, E= 4 g/l, So = 12,53 g/l.

| | Vitesse de recirculation | Concentration en peptides (g/l) | | Flux de perméat (l/h.m ²) | | Degré d'hydrolyse (%) | Productivité (g/g) |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------|---------------------------------------|-------|-----------------------|--------------------|
| | | Retentat | Perméat | | | | |
| Temps (h) ΔP (bar) | U (m/s) | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 |
| 1.35 | 0,4008 | 8,05 | 6,69 | 48,13 | 19,27 | 23,44 | 0,510 |
| | 0,668 | 7,67 | 5,12 | 43,58 | 22,59 | 30,74 | 0,603 |
| 0.8 | 0,668 | 8,21 | 5,55 | 30,97 | 28,13 | 28,42 | 0,761 |
| | 2,23 | 8,03 | 6,05 | 30,72 | 32,99 | 28,22 | 0,85 |

La vitesse 2,23 m/s à 0,8 bar semble donner les meilleurs résultats en productivité, degré d'hydrolyse et débit de perméat.

Les figures 62 et 63 représentent respectivement l'évolution de la pression transmembranaire et du débit de perméat au cours de l'hydrolyse en continue.

Le débit est très stable pour les vitesses 2,23 m/s et 0,668 m/s à 0,8 bar après seulement 10 minutes de fonctionnement.

Inversement, pour les vitesses 0,668 m/s et 0,4008 m/s à 1,35 bar, les débits de perméat chutent brusquement sans atteindre de stabilité au cours de la période étudiée.

La pression transmembranaire augmente pour toutes les vitesses ; pour se stabiliser après 1 heure 30 de continu, nous observons cependant un maximum pour les vitesses de recirculation qui ont débuté à 1,35 bars.

Ainsi, opérer à une pression transmembranaire relativement élevée de 1,35 bars risque en accélérant le colmatage, de rendre le procédé inefficace très rapidement, par la diminution brusque du débit de perméat.

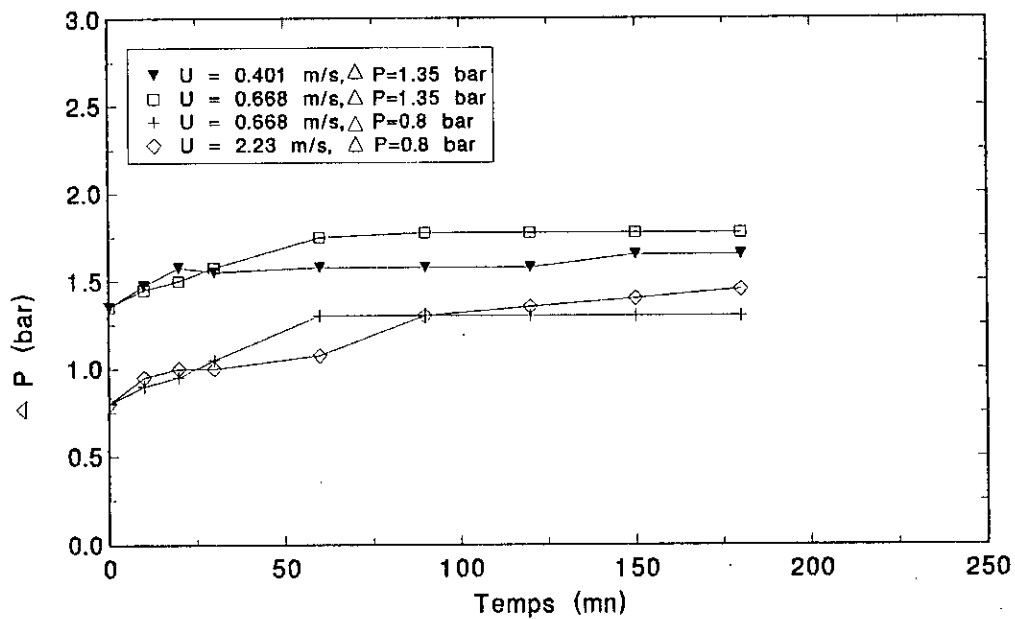


Figure 62: Influence de la vitesse de recirculation sur la pression transmembranaire .Cas de la membrane M5 .
 $S_0=12.53$ g/l, $T=55^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8$, $E=4\text{g/l}$

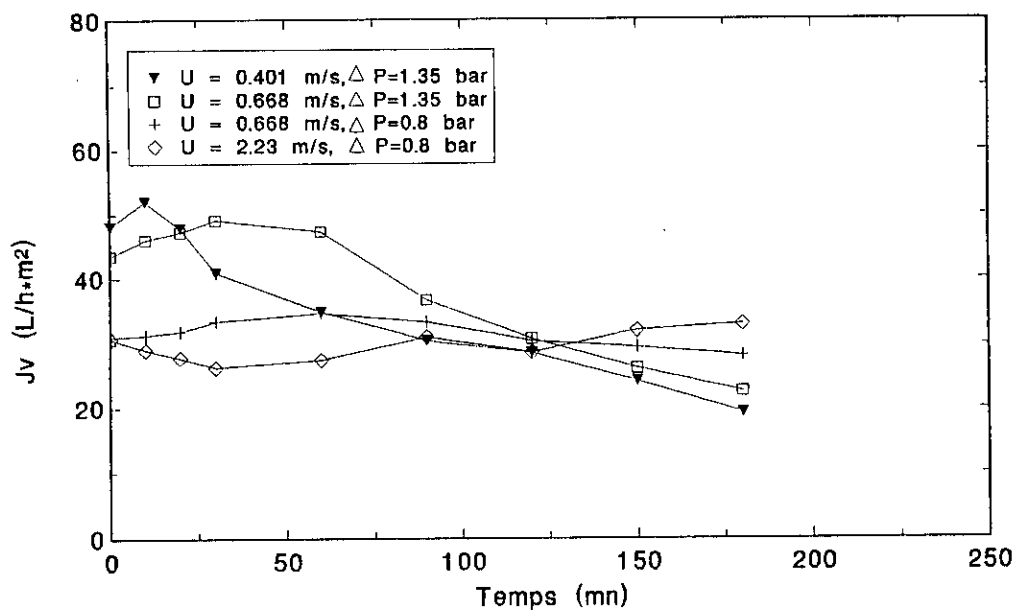


Figure 63 : Influence de la vitesse de recirculation sur le debit de permeat .Cas de la membrane M5 .
 $S_0=12.53$ g/l, $T=55^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8$, $E=4\text{g/l}$

De plus, la rétention de la fraction péptidique est identique pour toutes les vitesses de recirculation, inversement à ce qui a été observé avec la membrane M14.

En conclusion une vitesse de recirculation de 2,23 m/s à 0,8 bar sera choisie pour la suite de notre étude avec la membrane M5.

Globalement, l'étude de l'influence de la vitesse de recirculation en réacteur continu à membrane, nous a permis de choisir le mode de fonctionnement pour chaque membrane.

- La membrane M14 suggère l'utilisation du module d'ultrafiltration sans âme inox avec une vitesse modérée de 0,668 m/s à une pression transmembranaire de 0,8 bar.

- La membrane M5 est plus performante à une vitesse plus élevée de l'ordre de 2,23 m/s, sous une pression transmembranaire de 0,8 bar, le module d'ultrafiltration est alors muni de l'âme inox.

Les résultats confirment ceux de PUNIDADAS et al (1990).

- Cet auteur a en effet suggéré pour les membranes de faibles seuils de coupure de se placer dès le départ à forte vitesse tangentielle, afin de limiter l'épaisseur de la couche résistante qui se forme en surface.

De même, pour les membranes de diamètres de pores plus grand, la vitesse doit être faible au départ pour augmenter la porosité de la couche de particules qui se déposent sur la surface et dans ce dernier cas, on a recours à la formation d'une membrane dynamique pour effectuer la séparation.

II-4-3-3- Etude de la cinétique d'hydrolyse enzymatique en réacteur continu couplé à un ultrafiltre :

Pour mener à bien cet essai, nous avons fixé, les conditions opératoires obtenues auparavant à savoir un pH = 8, une température de 55°C, une concentration en enzyme de 4 g/l et enfin une vitesse de recirculation de 0,668 m/s sans utilisation d'âme inox pour une pression transmembranaire de 0,8 bar.

Les concentrations en hémoglobine varient de 3,13 g/l à 62,66 g/l.

Le colmatage de la membrane M14 est effectué avec la solution d'alimentation en hémoglobine pendant 1 heure pour chaque essai, les deux vannes perméat sont fermées et la vanne rétentat ouverte. L'hydrolyse enzymatique est alors menée en phase continu seulement pendant 3 heures.

La figure 64 illustre l'évolution des concentrations péptidiques en fonction du temps pour toute la série d'essai, les vitesses initiales sont déterminées graphiquement par le calcul des pentes à l'origine.

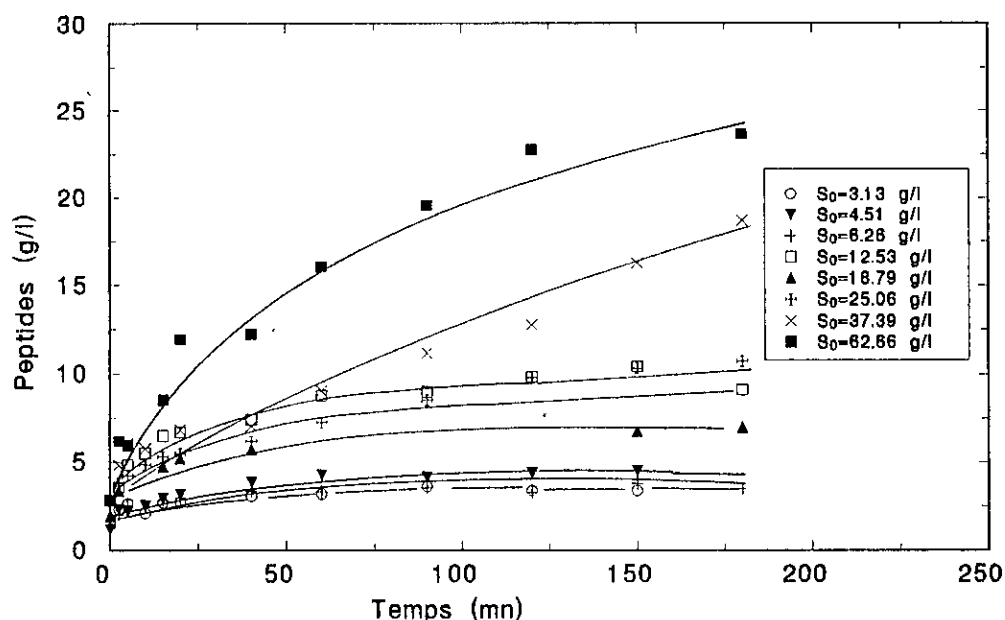


Figure 64 : Evolution de la concentration en peptides au cours du temps. Membrane M14 .

T=55°C, pH=8, E=4g/l, U=0.668m/s, $\Delta P=0.8$ bar

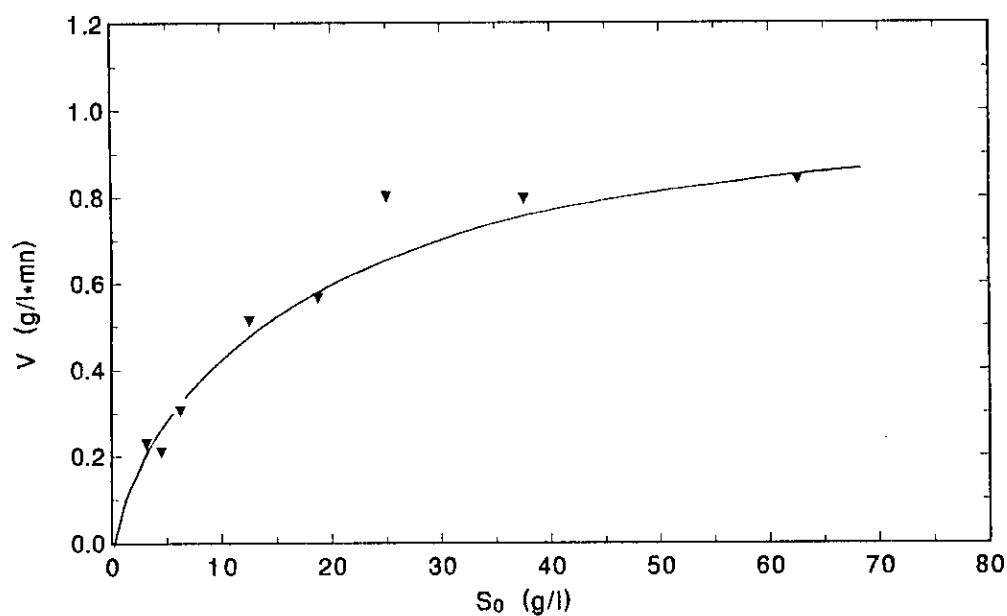


Figure 65 : Evolution de la vitesse initiale en fonction de la Concentration en Hemoglobine . membrane M14

T=55°C, pH=8, E=4g/l, U=0.668 m/s, $\Delta P=0.8$ bar

Celles ci sont représentées en fonction des concentrations initiales en hémoglobine sur la figure 65.

Il apparaît en premier que les vitesses initiales d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine en mode continu augmente avec les concentrations initiales S_0 , cette évolution tend à se stabiliser au delà des concentrations de l'ordre de 25 g/l. Ce résultat diffère de celui obtenu en discontinu où un optimum a été obtenu pour une concentration de 12,53 g/l.

Nous avons ainsi pu confirmer l'existence d'un phénomène d'inhibition pour les concentrations supérieures à 12,53 g/l.

En mode continue, jusqu'à une concentration 5 fois plus élevée, nous n'avons pas obtenu de décroissance des vitesses initiales. Par ailleurs, nous nous sommes limités à cette concentration à cause des problèmes de viscosité qui peuvent surgir au delà.

La cinétique d'hydrolyse en continu semble donc être du type michaélienne, en effet la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk $1/v = f(1/S_0)$ en figure 66 permet le tracé d'une droite de pente K_m/v_{max} et qui coupe l'axe des abscisses en $-1/K_m$ avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0,90$.

Les constantes cinétiques K_m et v_{max} déterminées graphiquement sont :

$$K_m = 12,647 \text{ g/l et } v_{max} = 1,027 \text{ g/l.mn}$$

Le rapport v_{max}/k_m apporte plus d'information en ce terme d'affinité, en effet pour les faibles concentrations en substrat, la vitesse de réaction devient proportionnel à v_{max}/K_m .

D'une façon générale, l'affinité d'une enzyme augmente avec le rapport v_{max} / K_m .

Le tableau comparatif 8 représente les valeurs de K_m et v_{max} ainsi que le rapport v_{max}/K_m .

Nous avons donc traité les résultats obtenus lors des expériences effectuées avec le réacteur en mode discontinu et celui en mode continu couplé à un ultrafiltre.

Nous avons en fin comparé nos résultats à ceux présentés dans la littérature relatifs à l'hydrolyse enzymatique de différentes protéines.

Tableau 8 : Constantes cinétiques relatives à l'hydrolyse enzymatique des protéines

| Constantes cinétiques | Km (g/l) | vmax (g/l.mn) | vmax ----- (mn -1) Km | Enzyme / protéines (Auteurs) |
|-----------------------|----------|---------------|--------------------------|---|
| Continu | 12,647 | 1,027 | 0,081 | Papaine / hémoglobine (MOKRANE, 1996) |
| Discontinu | 40,000 | 8,333 | 0,208 | |
| Continu | 36,860 | 0,619 | 0,017 | Alcalase / caseïne (MANNHEIM et CHERYAN, 1990) |
| Discontinu | 2,260 | 3,088 | 1,366 | |
| Continu | 2,940 | 0,250 | 0,085 | Alcalase / Protéines de plasma (BRESSOLIER et al , 1988) |
| Discontinu | 7,400 | 0,530 | 0,072 | |
| Continu | 2,776 | 0,130 | 0,047 | Pronase / Protéines de soja (DEESLIE et CHERYAN , 1981) |
| Discontinu | 6,940 | 0,781 | 0,113 | |

Pour l'hydrolysât d'hémoglobine le Km et vmax en réacteur continu sont respectivement 3 fois et 8 fois plus petit que ceux obtenus en réacteur discontinu.

De même, le rapport vmax/Km est plus faible en réacteur continu, cela signifie que l'enzyme présente une affinité plus grande pour l'hémoglobine en mode discontinu.

Ceci est probablement dû à la perte d'activité enzymatique au cours de l'hydrolyse en continu, causée par une éventuelle fuite d'enzyme ou bien par l'action dénaturante de la température et des contraintes mécaniques.

S'ajoute à cela, le phénomène d'adsorption de la papaine sur la surface membranaire la rendant inactive.

Il convient de noter que le colmatage de la membrane M14, a été fait avec une solution d'hémoglobine fraîche pour maintenir une concentration maximale et constante en enzyme le plus longtemps possible.

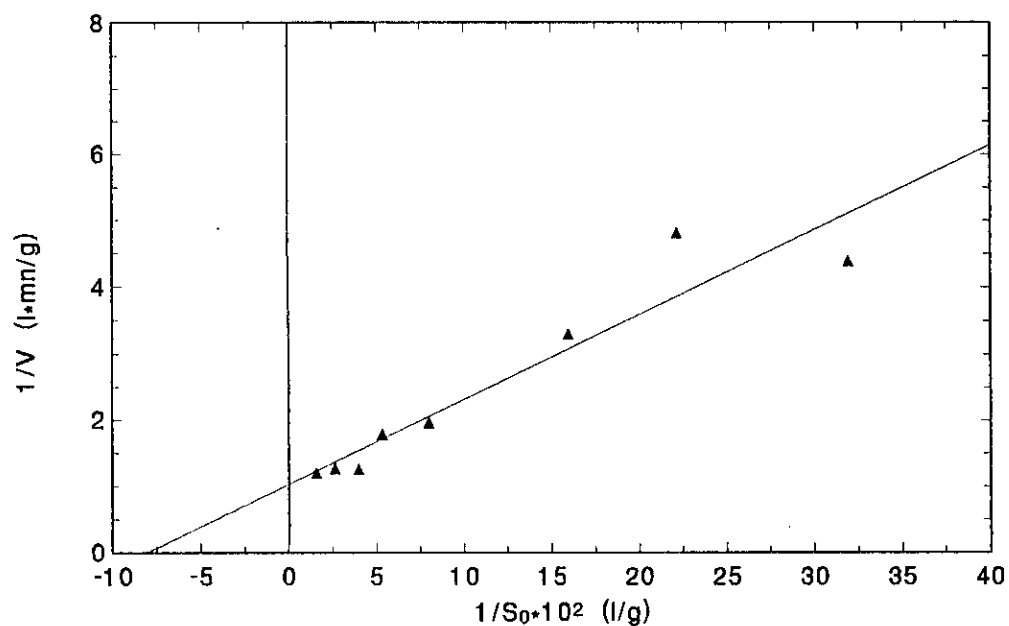


Figure 66 :Representation de Lineweaver-Burk pour l'hydrolyse enzymatique de l'Hemoglobine en reacteur continu a membrane
 T=55°C, pH=8, E=4g/l, U=0.668 m/s, Δ P=0.8bar

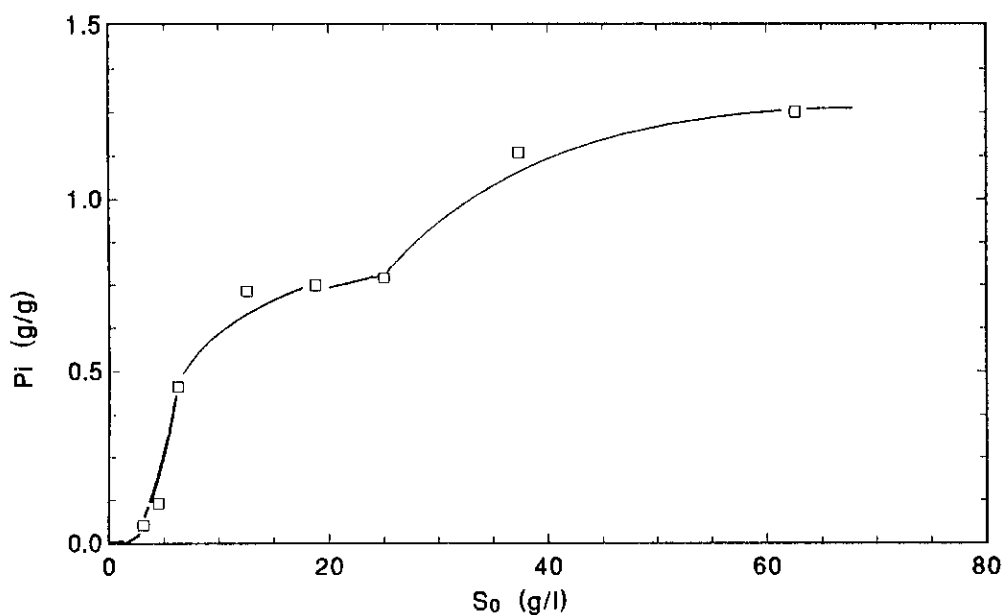


Figure 67 : Influence de la concentration initiale en Hemoglobine sur la productivite instantanee
 T=55°C, pH=8, E=4g/l, U=0.668m/s, Δ P=0.8bar

Des résultats similaires ont été obtenus par DEESLIE et CHERYAN (1981). L'hydrolyse de la promine D, une protéine de soja avec la pronase une enzyme d'origine microbienne (*Streptomyces griseus*) a été effectuée dans les deux réacteurs discontinu et continu.

Les constantes cinétiques K_m et v_{max} chutent en réacteur continu ainsi que le rapport v_{max}/K_m . L'affinité en réacteur discontinu est donc plus élevée.

- De même lors de l'hydrolyse des protéines de plasma par l'alcalase (enzyme d'origine microbienne *Bacillus licheniformis*), K_m et v_{max} diminuent en réacteur à membrane, cependant le rapport v_{max}/K_m augmente légèrement.

L'affinité enzymatique est ainsi plus grande en réacteur continu (BRESSOLIER et al, 1988).

- L'équipe de MANNHEIM et CHERYAN (1990), a hydrolysé la caséine par l'alcalase, en réacteur continu, K_m est très élevée et v_{max}/K_m très faible, l'affinité enzyme/substrat est donc très faible.

D'une manière générale, l'utilisation de bioréacteurs à membrane permet de traiter des concentrations initiales en protéines 5 à 6 fois plus élevées qu'en réacteur discontinu, sans apparition de problèmes d'inhibition.

La cinétique de la réaction d'hydrolyse enzymatique est alors dans tous les cas cités michaélienne et peut être exprimée par la relation suivante :

$$v = v_{max} \cdot \frac{S}{S + K_m}$$

Par ailleurs, la représentation de la productivité instantanée obtenue après 3 heures d'hydrolyse, en fonction de la concentration initiale S_0 (figure 67) montre que celle ci augmente avec S_0 .

Au delà de 40 g/l, la productivité tend à se stabiliser à une valeur de l'ordre de 1,25 g/g.

En définitive, une concentration de l'ordre de 62,66 g/l semble être la concentration optimale pour l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine en réacteur continu.

Des résultats similaires ont été obtenues avec la membrane M5, la concentration 62,66 g/l présente les meilleurs performances, une étude comparative sera effectuée dans les chapitres suivants :

II-4-3-4- Etude du bilan de matière dans un réacteur continu à ultrafiltre : (Modélisation)

Le bilan de matière en réacteur continu couplé à un ultrafiltre a été étudié en détail dans le chapitre IV, l'équation du bilan est donc :

$$\frac{F}{V} (S_0 - S) = v + \frac{dS}{dt} \quad (50)$$

en considérant le régime permanent $\frac{dS}{dt} = 0$

La vitesse v d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine a été exprimée :

$$v = v_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_m} \quad \text{avec } v_{\max} = 1,027 \frac{\text{g}}{\text{l.mn}}$$

$$K_m = 12,647 \frac{\text{g}}{\text{l}}$$

On retrouve donc l'équation (29) trouvée au chapitre IV pour une cinétique michaelienne :

$$\frac{v_{\max} \cdot \theta}{K_m} = \frac{x \cdot S_0}{K_m} + \frac{x}{1 - x}$$

Nous remplaçons K_m et v_{\max} par leur valeurs obtenues au chapitre II-4-3-3.

$$0,0812 = \frac{x \cdot S_0}{12,647} + \frac{x}{1 - x} \quad (51)$$

Le taux de conversion x est représenté en figure 68 en fonction de $v_{\max} \cdot \theta / K_m$ pour toute la série d'expériences effectuées.

Pour toute la gamme de concentrations étudiées, le taux de conversion augmente au début rapidement pour ralentir progressivement et atteindre sa valeur maximale $x = 1$.

Les données expérimentales sont très proches des courbes théoriques, dont l'équation est déterminée par un simple remplacement de $K_m = 12,647 \text{ g/l}$, $v_{\max} = 1,027 \text{ g/l.mn}$ et de S_0 la concentration initiale.

Les courbes expérimentales et théoriques sont donc presque confondues, le léger écart est probablement dû à la difficulté du maintien des conditions du régime d'écoulement.

Ces fluctuations sont cependant très faibles et n'influencent pas sur l'allure générale de la courbe expérimentale.

Ainsi le modèle de Michaélis-Menten s'applique parfaitement pour l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine en réacteur continu à membrane.

Dans tout réacteur biologique, le but est d'atteindre le taux de conversion maximal en un minimum de temps, ce dernier est proportionnel au facteur adimensionnel $\frac{v_{max} \cdot \theta}{K_m}$.

Il suffira de déterminer le temps ou la valeur de $\frac{v_{max} \cdot \theta}{K_m}$ minimale qui correspond à un $x = 1$.

La vitesse maximale d'hydrolyse peut être exprimée par $v_{max} = k_{cat} \cdot E$ avec k_{cat} la constante de vitesse et E la concentration en enzyme $E = 4 \text{ g/l}$ pour la papaïne.

$$\frac{v_{max} \cdot \theta}{K_m} = k_{cat} \cdot \tau = \frac{E \cdot \theta}{K_m} \quad (52)$$

Le temps minimale d'hydrolyse pour atteindre $x = 1$ est donc défini par τ et déterminé graphiquement.

Les taux de conversion maximaux atteints au cours de l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine après 4 heures de réaction, sont de l'ordre de 0,74 pour 4,51 g/l et 0,33 pour 62,66 g/l pour les essais avec la membrane M14 colmatée.

Cependant, l'utilisation de la membrane M5 provoque une légère augmentation des taux de conversion x , pour les essais à 62,66 g/l celui-ci atteint 0,41 après 4 heures d'hydrolyse.

Il semble en définitive que les concentrations élevées, en substrat ne présentent pas des rendements élevés en seulement 4 heures d'hydrolyse en continu, pour augmenter ce rendement, il faudra prolonger la durée de l'expérience ou bien prévoir une phase d'hydrolyse en discontinu avant d'entamer la phase continu.

Par ailleurs, le bilan de matière établie grâce à l'expression de la vitesse d'hydrolyse, a pu être confirmé grâce à la comparaison des courbes ($x = f(\frac{v_{max} \cdot \theta}{K_m})$) théoriques et expérimentales.

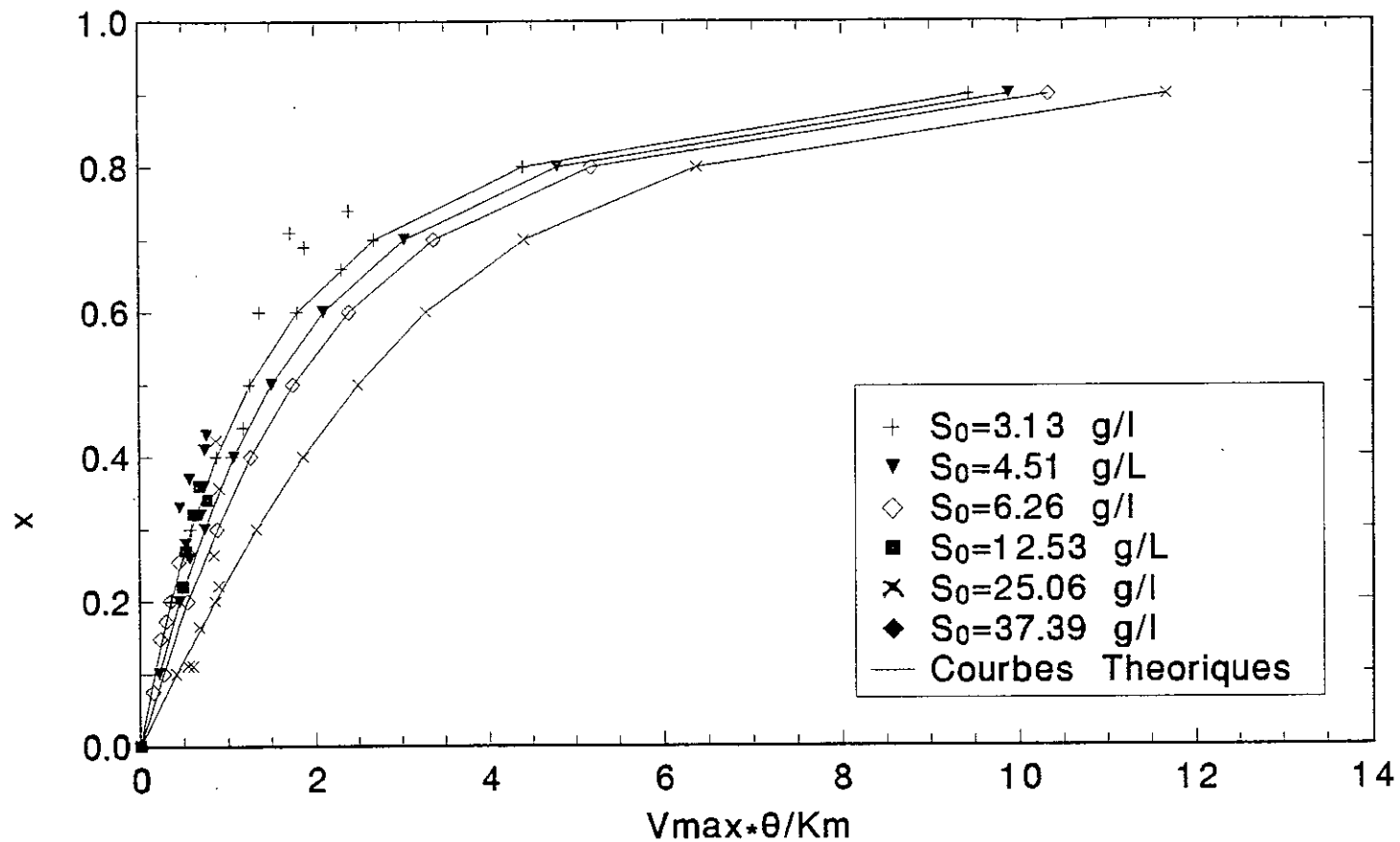


Figure 68 : Determination du bilan de matiere en reacteur continu a membrane M14 $T=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8$, $E=4\text{g/l}$, $U=0.668\text{m/s}$, $\Delta P=0.8\text{bar}$

II-4-3-5- Etude du mécanisme de colmatage :

Le but de la présente étude est la compréhension du mécanisme de colmatage mis en jeu, pour les deux membranes utilisées.

II-4-3-5-1- Cas de la membrane M14 :

La membrane M14 (0,14 μm) est une membrane de microfiltration à l'origine, un colmatage approprié lui est appliqué pour diminuer son seuil de coupure et la rendre ainsi une membrane d'ultrafiltration.

Cependant, un phénomène important est à prendre en compte, c'est l'hétérogénéité des pores membranaires ainsi formées, il peut y avoir simultanément des pores complètement bloqués et des pores superficiellement.

Nous avons appliqué les deux modèles SBM et CFM présentés préalablement au chapitre V - 6.

En exploitant les résultats obtenus lors de L'hydrolyse de l'hémoglobine dans le réacteur continu à membrane.

La forme la plus linéaire détermine le choix du modèle mathématique le plus approprié et donc la description du mécanisme de colmatage pour chaque essai.

a- Influence de la vitesse de recirculation sur le mécanisme de colmatage :

Pour toutes les vitesses de recirculations auparavant étudiées nous appliquons les deux modèles de colmatage SBM et CFM.

Pour la gamme de vitesse 0,4008 m/s, 0,668 m/s, 0,93 m/s et 2,23 m/s (avec l'âme inox), nous relevons les volumes de perméat à des intervalles de temps réguliers.

Les valeurs de t/V_p sont représentées en fonction du temps t et du volume de perméat V_p respectivement en figure 69 et 70, Le tracé des droites moyennes nous permet la détermination des coefficients de corrélation r^2 .

Globalement, le modèle CFM, représente mieux le phénomène de colmatage puisque les coefficients de corrélation sont effectivement plus élevés, en comparaison avec ceux obtenus pour le modèle SBM (Tableau 9).

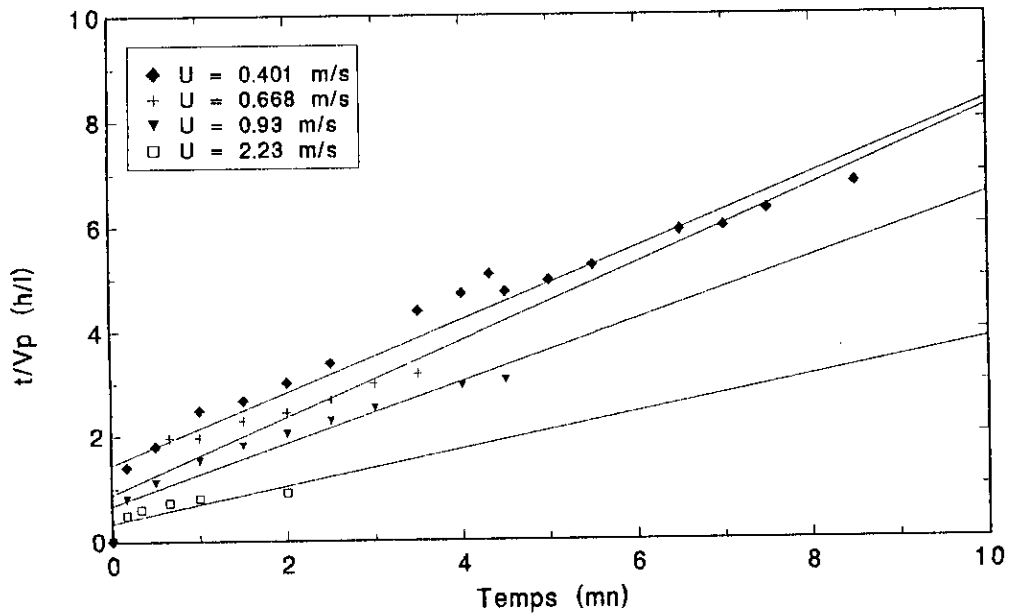


Figure 69 : Influence de la vitesse de recirculation sur le mecanisme de colmatage de la membrane M14 . Colmatage interne (Modele S.B.M)
 $S_0=12.53$ g/l, $T=55^{\circ}\text{C}$, $E=4\text{g/l}$, $\text{pH}=8$; $\Delta P=0.8\text{bar}$

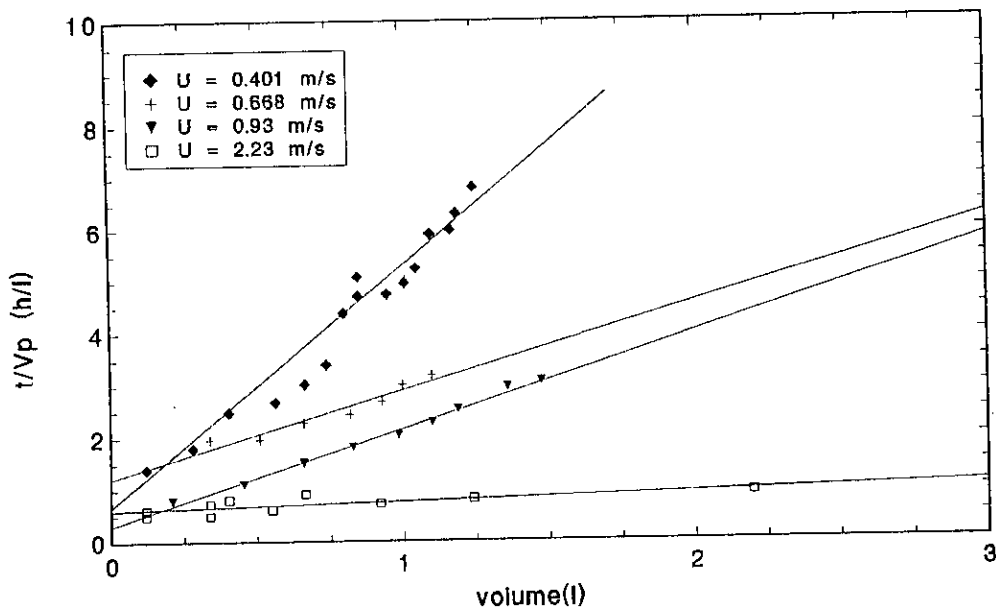


Figure 70: Influence de la vitesse de recirculation sur le mecanisme de colmatage de la membrane M14. Colmatage superficiel (Modele C.F.M)
 $S_0=12.53$ g/l, $T=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8$, $E=4$ g/l, $\Delta P=0.8\text{bar}$

Tableau 9 : Influence de la vitesse de recirculation sur le mécanisme de colmatage (coefficients de corrélation)

| r^2 | Vitesses de recirculations (m/s) | | | |
|---------|----------------------------------|-------|-------|-------|
| Modèles | 0,4008 | 0,668 | 0,930 | 2,230 |
| SBM | 0,94 | 0,79 | 0,91 | 0,86 |
| CFM | 0,95 | 0,81 | 0,99 | 0,89 |

Les vitesses 0,93 m/s et 0,4008 m/s présentent des coefficients de corrélation élevés dans les deux modèles avec une meilleure linéarité pour le modèle CFM.

Cette possibilité d'application simultanée des deux modèles CFM et SBM montre que le colmatage de la membrane est effectivement hétérogène. Nous avons affaire à une combinaison des deux phénomènes pour la membrane M14 qui a des pores de diamètre assez importants.

Par contre, les résultats obtenus avec la vitesse 2,23 m/s (avec utilisation de l'âme inox) sont similaires mais légèrement inférieurs, la linéarisation est plus accentuée pour le modèle CFM.

Globalement, les deux types de colmatages réversibles (CFM) et irréversible (SBM) coexistent simultanément pour la membrane M14 dans la gamme de vitesses de recirculation étudiée, les macromolécules telles que l'enzyme, l'hémoglobine entière ainsi que les peptides à haut poids moléculaire sont donc en partie retenues au niveau des pores de la membrane. Ce type de colmatage risque de détériorer ces pores et de les boucher d'une façon irréversible, mais ce phénomène n'est pas majoritaire. En effet le colmatage en surface ou réversible (CFM) participe à part entière lors du phénomène de colmatage de la membrane et cela pour les diverses vitesses étudiées.

b - Influence de la concentration en hémoglobine sur le mécanisme de colmatage :

Deux concentrations en hémoglobine ont été testées pour l'étude du colmatage de la membrane M14, (12,53 g/l et 62,66 g/l).

L'hydrolyse enzymatique est poursuivie pendant 4 heures à une vitesse de recirculation de 0,668 m/s et une pression transmembranaire de 0,8 bar. Les conditions de pH, température et concentration en enzyme sont respectivement 8, 55°C et 4 g/l.

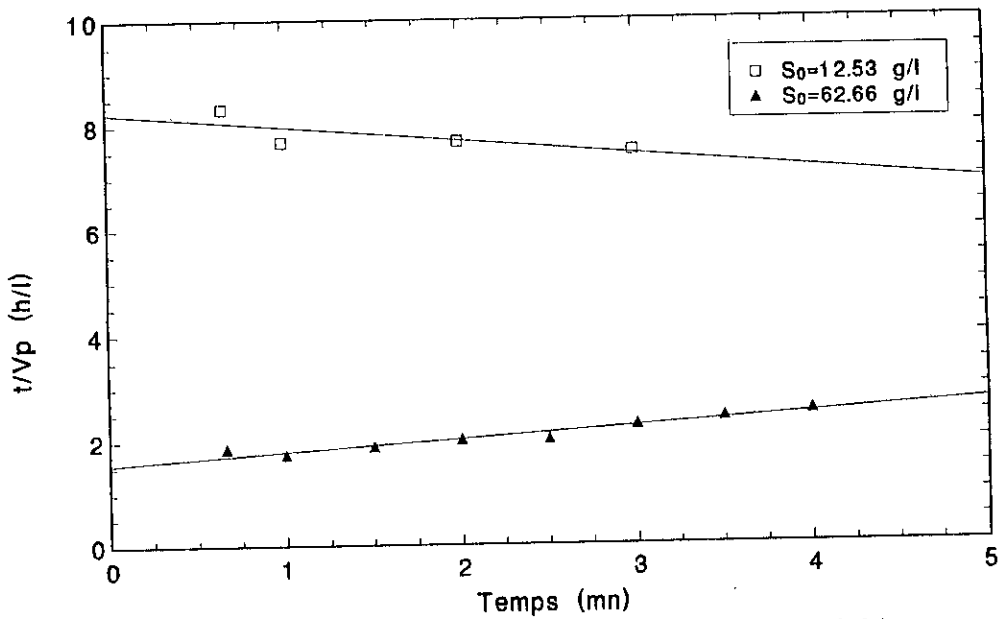


Figure 71 : Influence de la concentration en Hemoglobine sur le mecanisme de colmatage de la membrane M14 .Colmatage Interne M14. (Modele S.B.M) $T=55^{\circ}C$, $pH=8$, $E=4g/l$, $U=0.668$ m/s, Δ $P=0.8bar$

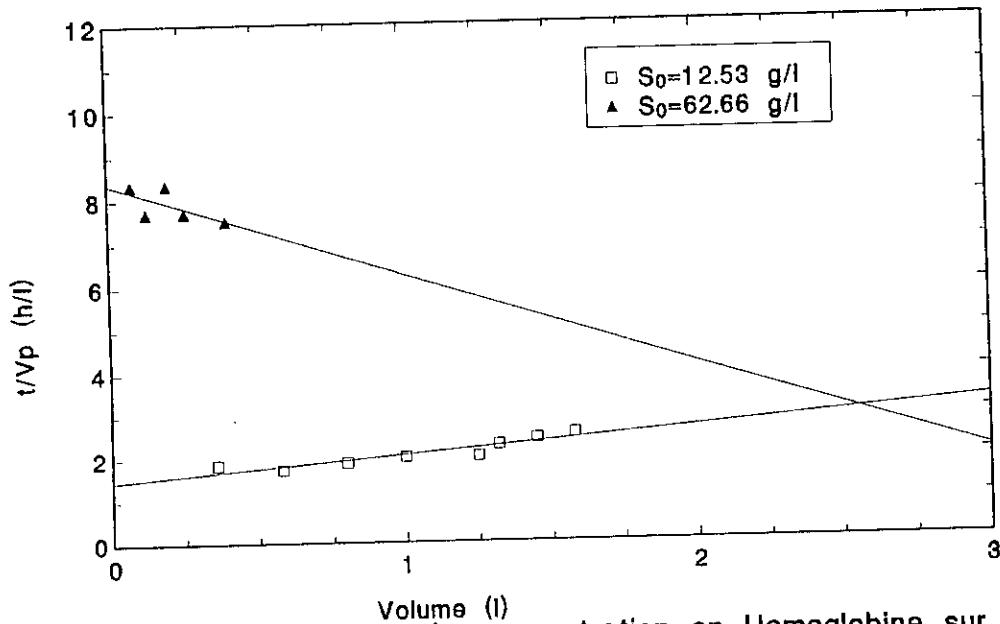


Figure 72 : Influence de la concentration en Hemoglobine sur le mecanisme de colmatage de la Membrane M14 . Colmatage Superficiel (C.F.M) $T=55^{\circ}C$, $pH=8$, $E=4g/l$, $U=0.668m/s$, Δ $P=0.8bar$.

Les volumes de perméat sont régulièrement relevés en fonction du temps d'hydrolyse.

Les figures 71 et 72 illustre l'évolution de t/V_p en fonction du temps t et du volume V_p . Par régression linéaire nous traçons les droites moyennes et déterminons les coefficients de corrélation correspondant à chaque concentration (Tableau 10).

Tableau 10 : Influence de la concentration en hémoglobine sur le mécanisme de colmatage (coefficients de corrélation)

| r^2 | Concentrations initiales d'hémoglobine (g/l) | |
|----------------|--|-------|
| Modèles | 12,53 | 62,66 |
| SBM | 0,92 | 0,61 |
| CFM | 0,81 | 0,44 |

Il semble que le modèle de colmatage, irréversible est plus représentatif du phénomène de colmatage de la membrane M14 pour les concentrations étudiées que le modèle de colmatage réversible.

Par ailleurs, les deux modèles ne semblent plus pouvoir s'appliquer pour des concentrations très élevées telles que 62,66 g/l. Les coefficients de corrélation sont en effet très faibles, nous n'observons donc presque plus de linéarité. Cependant une comparaison entre les deux modèles montre que le modèle SBM est le plus apte à représenter le phénomène de colmatage.

II-4-3-5-2- Cas de la membrane M5 :

Une étude similaire du mécanisme de colmatage de la membrane a été effectuée mais sans succès les coefficients de corrélation obtenus sont très faibles, cela est vraisemblablement dû à la modalité d'application des deux modèles SBM et CFM qui ne sont utilisés qu'en microfiltration (BOWEN et HALL, 1995).

La membrane M5 (10.000 Da) est une membrane d'ultrafiltration, utilisée sans colmatage préalable.

a- Influence de la vitesse de recirculation sur le mécanisme de colmatage :

Les deux modèles SBM et CFM ont été appliqués pour toute la série de vitesses de recirculation étudiées.

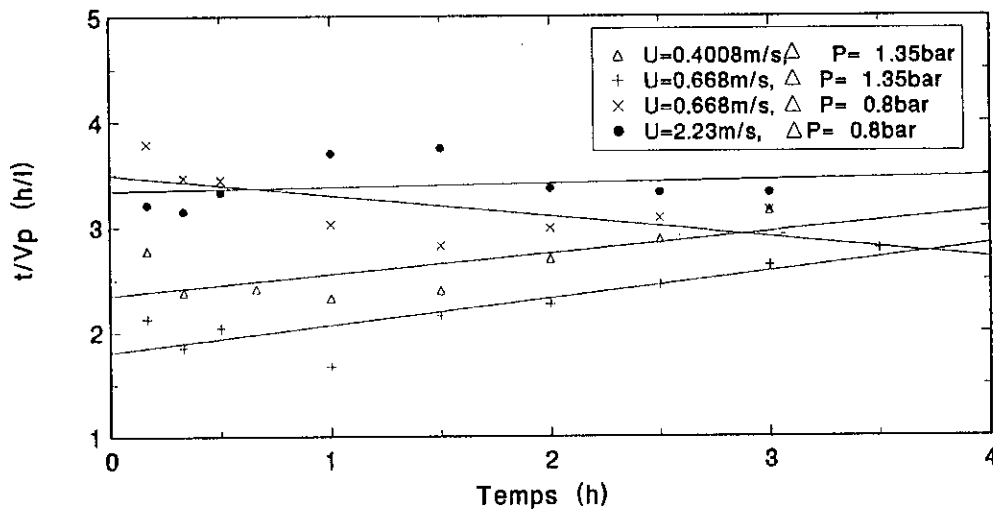


Figure 73 : Influence de la vitesse de recirculation sur le mecanisme de colmatage de la membrane M5.

Colmatage Interne (Model S.B.M) $S_0=12.53\text{g/l}$, $T=55^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8$, $E=4\text{g/l}$

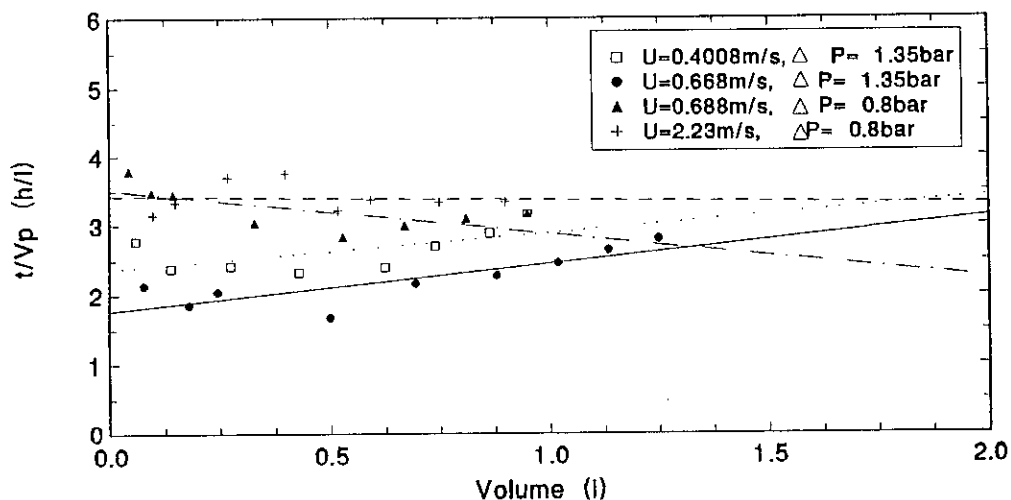


Figure 74 : Influence de la vitesse de recirculation sur le mecanisme de colmatage de la membrane M5.

Colmatage Superficiel (C.F.M) $S_0=12.53\text{g/l}$, $\text{pH}=8$, $T=55^\circ\text{C}$, $E=4\text{g/l}$

Les figures 73 et 74 représentent donc l'évolution de t/V_p en fonction du temps t et du volume de perméat V_p .

La détermination des coefficients de corrélation pour toutes les droites moyennes montre que les deux modèles sont peu représentatifs (Tableau 11).

Tableau 11 : Influence de la vitesse de recirculation sur le mécanisme de colmatage (Coefficient de corrélation)

| r^2 | Vitesses de recirculation (m/s) | | | |
|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | $\Delta p = 0,8$ bar 0,4008 m/s | $\Delta p = 0,8$ bar 0,668 m/s | $\Delta p = 1,35$ bar 0,668 m/s | $\Delta p = 1,35$ bar 2,23 m/s |
| Modèles | | | | |
| SBM | 0,49 | 0,75 | 0,42 | 0,01 |
| CFM | 0,35 | 0,66 | 0,47 | 0,01 |

Nous ne pouvons donc pas affirmer la qualité du colmatage de la membrane M5.

b - Influence de la concentration en hémoglobine sur le mécanisme de colmatage :

Suivant le même protocole expérimentale que la membrane M14 et pour deux concentrations en hémoglobine (12,53 et 62,66 g/l), les deux modèles de colmatage ont été appliqués sans succès. Les coefficients de corrélation sont très faibles et la linéarisation impossible dans les deux cas (Tableau 12).

Tableau 12 : Influence de la concentration en hémoglobine sur le mécanisme de colmatage (Coefficient de corrélation)

| r^2 | Concentration en hémoglobine(g/l) | |
|----------------|-----------------------------------|-------|
| | 12,53 | 62,66 |
| Modèles | | |
| S.B.M | 0,03 | 0,63 |
| C.F.M | 0,01 | 0,21 |

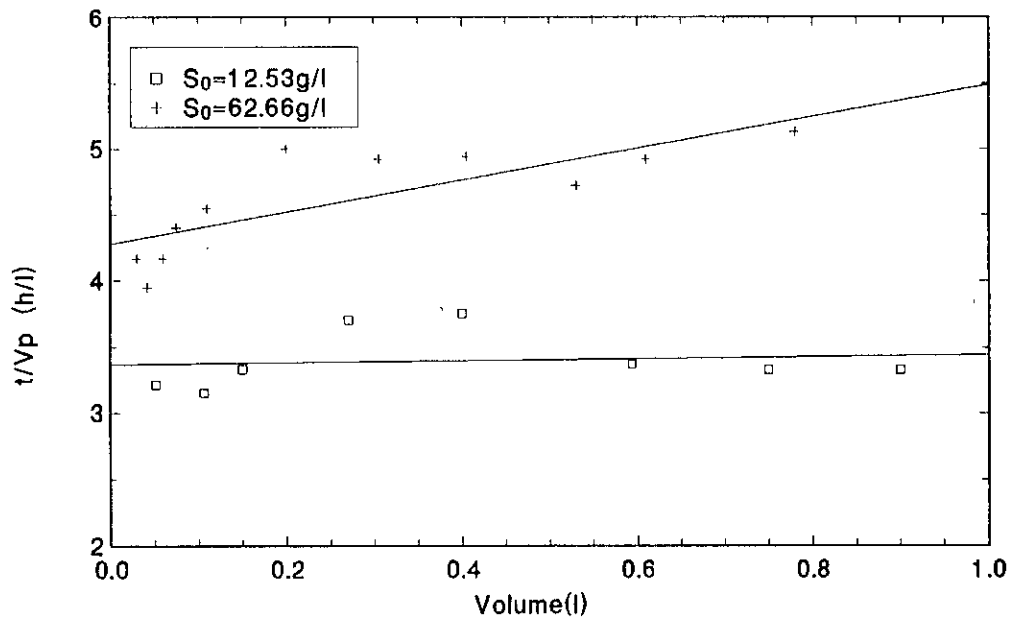


Figure 76 : Influence de la concentration en Hemoglobine sur le mecanisme de colmatage de la membrane M5.

Colmatage Superficiel (C.F.M)

T=55°C, pH=8, E=4g/l, U=2.23m/s, ΔP=0.8bar

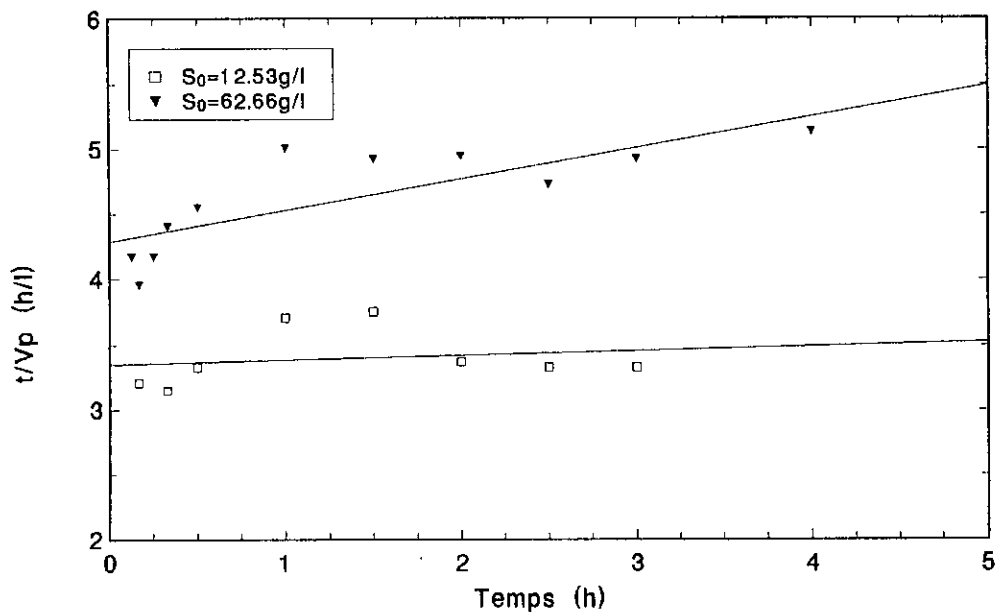


Figure 75 : Influence de la concentration en Hemoglobine sur le mecanisme de colmatage de la membrane M5.

Colmatage Interne (S.B.M)

T=55°C, pH=8, E=4g/l, U=2.23m/s, Δ P=0.8bar

Les figures 75 et 76 se présentent sous forme de courbes, les modèles SBM et CFM ne peuvent pas s'appliquer pour la membrane M5.

La nature du colmatage de la membrane M5 n'a donc pas pu être défini avec précision, cependant, il semblerait qu'un colmatage de type réversible est le plus apparent.

Inversement pour la membrane M14, le colmatage est hétérogène sur toute la membrane, il doit y avoir en même temps des pores totalement bloqués (colmatage irréversible) et d'autres seulement partiellement (colmatage réversible).

PUNIDADAS et al (1990), suggère que plus le diamètre des pores est grand plus le colmatage irréversible est favorisé et ces conclusion sont en accord avec nos résultats.

II-4-3-6- Influence du seuil de coupure de la membrane sur l'hydrolyse enzymatique de 62,66 g/l d'hémoglobine en réacteur continu couplé à un ultrafiltre :

Le but de la présente étude est essentiellement basé sur la comparaison des performances des deux membranes M5 et M14 en fonctionnement optimal.

L'hydrolyse papaique de 62,66 g/l d'hémoglobine est menée en phase continu pendant 4 heures.

Le pH est fixé à 8, la température à 55 °C, la concentration en enzyme à 4g/l.

La membrane M14 est auparavant colmatée pendant 1 heure avec la solution mère d'hémoglobine, la vitesse de recirculation est fixée à 0,668 m/s sous une pression transmembranaire de 0,8 bar, le flux de perméat est de 22 l/h.m².

D'autre part, le membrane M5 est directement utilisée sans colmatage, la vitesse de recirculation est fixée à 2,23 m/s, sous une pression transmembranaire de 0,8 bar, le flux de perméat est de 24 l/h.m².

II-4-3-6-1- Evolution des degrés d'hydrolyse :

La figure 77 représente l'évolution des D.H au cours des 4 heures d'hydrolyse en continu pour les deux membrane M14 e M5.

L'augmentation des D.H est au début similaire pour les deux membranes, cependant, au delà de 30 minutes d'hydrolyse, ceux ci évoluent différemment pour atteindre au bout de 4 heures 15,01% et 20,05% respectivement pour les membranes M14 et M5.

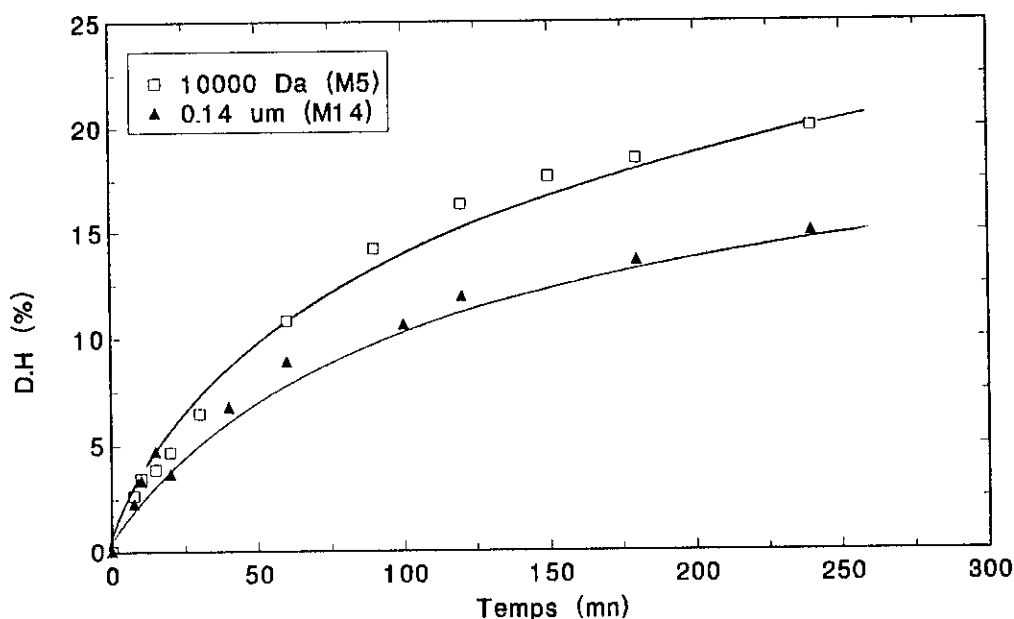


Figure 77 : Influence du seuil de coupure de la membrane sur le degré d'Hydrolyse.

$S_0=62.66$ g/l, $T=55^{\circ}\text{C}$, $E=4\text{g/L}$, $\Delta P=0.8\text{bar}$

Cet écart plus ou moins grand semble confirmer le passage de fragments d'enzyme ou de l'enzyme elle-même au travers de la membrane M14.

Il importe de noter que ces pertes d'activité enzymatique n'ont pas pu être évitées malgré, l'utilisation d'une solution d'hémoglobine exempte d'enzyme pour le colmatage de la membrane M14.

La couche de polarisation ainsi formée est constituée seulement de molécules d'hémoglobine.

Inversement, la membrane M5 présente des pores très petits qui ne permettent pas ces fuites d'enzyme le seuil de coupure de la membrane M5 est de 10.000 Da et la masse molaire de la papaine est de 20.700 Da.

La quantité d'enzyme active introduite dans le réacteur reste probablement constante tout le long de la phase d'hydrolyse en continu ce qui explique ces valeurs élevées en D.H.

II-4-3-6-2- Evolution de la fraction peptidique :

La fraction peptidique contenue dans le perméat et dans le surnageant TCA du retentat est déterminée par la lecture des absorbances à 280 nm.

L'évolution de ces deux concentrations peptidiques est représentée en figure 78 pour les deux membranes M14 et M5.

La membrane M5 présente les plus hautes concentrations peptidiques aussi bien dans le retentat que dans le perméat.

Pour la membrane M14, les fractions peptidiques dans le retentat et dans le perméat sont presque identiques avec une légère élévation pour le retentat.

Ainsi, la totalité des peptides hydrolysés solubles dans le TCA passent du retentat vers le perméat, la membrane M14 ne retient donc que les molécules d'hémoglobine complètes ou légèrement hydrolysées.

Par ailleurs, le retentat de la membrane M5 présente des concentrations peptidiques beaucoup plus élevées que celles du perméat.

Cette membrane ne laisse donc passer que les peptides de faibles poids moléculaires, la rétention est en effet plus accentuée.

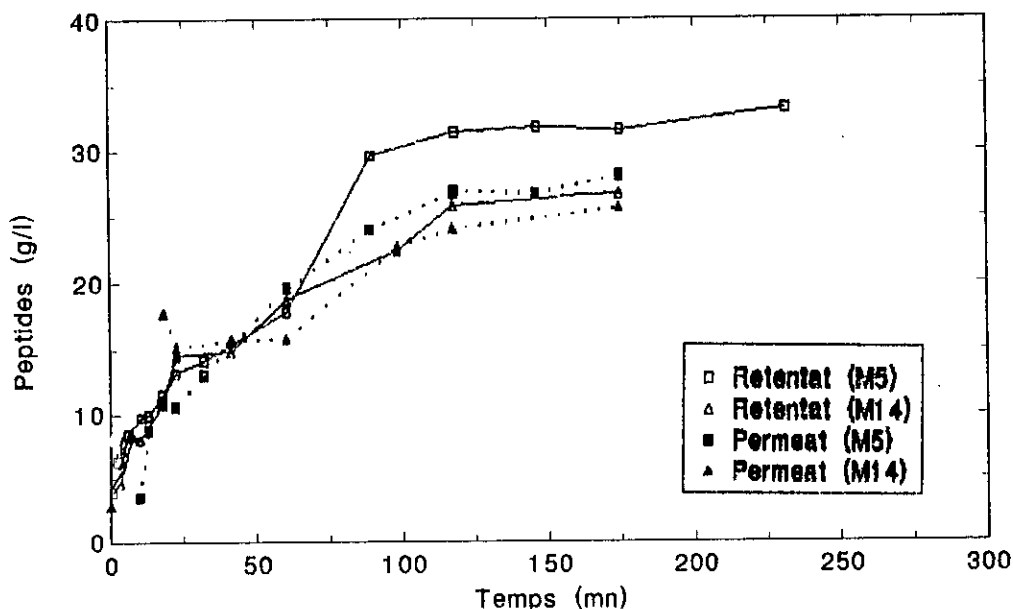


Figure 78 : Influence du seuil de coupure de la membrane sur la concentration en peptides

$S_0=62.66$ g/l, $T=55^{\circ}\text{C}$, $E=4\text{g/l}$, $\Delta P=0.8\text{bar}$

II-4-3-6-3- Evolution de la fraction héminique :

La fraction héminique est déterminée par la lecture de l'absorbance à 400 nm dans le perméat et le surnageant TCA du retentat pour les deux membranes.

Les courbes représentant la fraction héminique contenue dans le surnageant TCA du retentat, sont de même allure et presque identiques avec une légère augmentation pour le retentat de la membrane M5 (figure 79).

De même, la fraction héminique contenue dans le perméat évolue de la même manière pour les deux membranes M5 et M14 mais pas avec la même intensité.

L'absorbance à 400 nm, dans le perméat augmente donc très rapidement pour atteindre un maximum au bout de 15 minutes 0,528 et 2,153 respectivement pour les membranes M5 et M14.

Ces valeurs dépassant de loin, les fractions héminiques contenues dans le surnageant TCA du rétentat, elles sont probablement dues à la libération de molécules d'hème ou de peptides héminiques de faibles poids moléculaire lors des différentes étapes de préparation de la solution d'hémoglobine à savoir ajout d'anticoagulants, centrifugation, hémolyse, hydrolyse bactérienne etc...

D'autre part toutes ces fractions héminiques sont retenues par le TCA dans le coagulât des échantillons de retentat.

Cette élévation rapide en absorbance à 400 nm est suivie après 15 minutes d'hydrolyse d'une chute brusque s'achevant après 1 heure 30 par une stabilité de la fraction héminique dans le perméat des deux membranes M5 et M14.

Par contre, malgré l'allure similaire des fractions héminiques dans le perméat des deux membranes, celle issue de la membrane M14 est 4 fois supérieure à celle de la membrane M5.

Selon leurs seuils de coupure, les membranes jouent donc un rôle de filtre plus ou moins performants de la fraction héminique contenue dans le retentat.

De plus, le colmatage de la membrane M14 effectué avec la solution d'hémoglobine, accentue le passage de la fraction héminique dans le perméat.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par LECONTE en 1989 lors de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine.

II-4-3-6-4- Evolution du flux de perméat :

La représentation en figure 80 des flux de perméat J_v en fonction du temps d'hydrolyse pour les deux membranes M5 et M14, montre que ceux ci diminuent progressivement pour se stabiliser après 1 à 2 heures de manipulation.

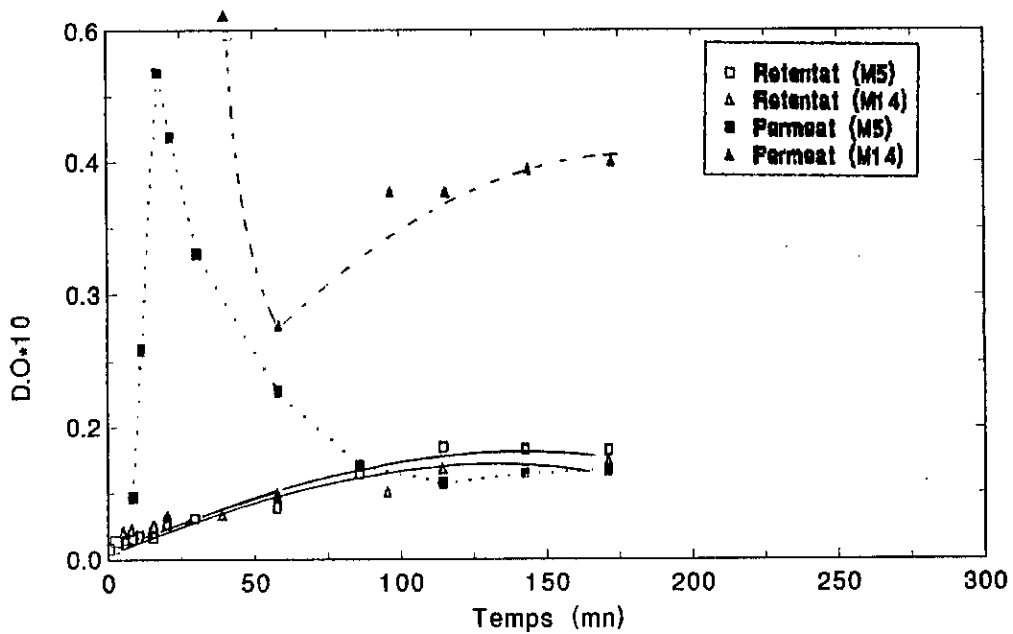


Figure 79 : Influence du seuil de coupure de la membrane sur la libération de peptides hémiques.
 $S_0=62.66$ g/l, $T=55^\circ$, $pH=8$, $E=4$ g/l, $\Delta P=0.8$ bar

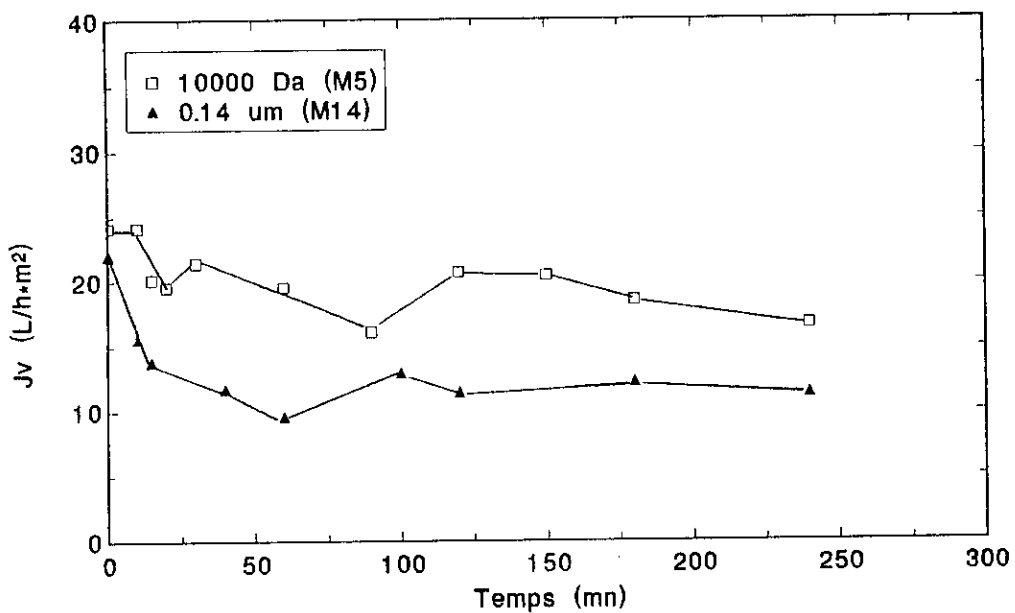


Figure 80 : Influence du seuil de coupure de la membrane sur le flux de permeat.
 $S_0=62.66$ g/l, $T=55^\circ C$, $E=4$ g/L, $\Delta P=0.8$ bar

Il convient de noter que cette chute en flux de perméat est beaucoup plus accentuée pour la membrane M14 que pour la membrane M5.

II-4-3-6-5- Evolution de la productivité instantanée :

La détermination des productivités instantanées pour les deux membranes M5 et M14 colmatée devrait nous informer plus amplement sur la qualité du produit fini.

La figure 81 illustre l'évolution de celles ci au cours du temps pour les deux cas.

La membrane M5 permet l'obtention de productivités instantanées très élevées et doubles par rapport à celles de la membrane M14.

En effet, après 4 heures d'hydrolyse en réacteur continu à membrane, les productivités instantanées atteignent 1,25 et 2,5 respectivement pour la membrane M14 colmatée et la membrane M5.

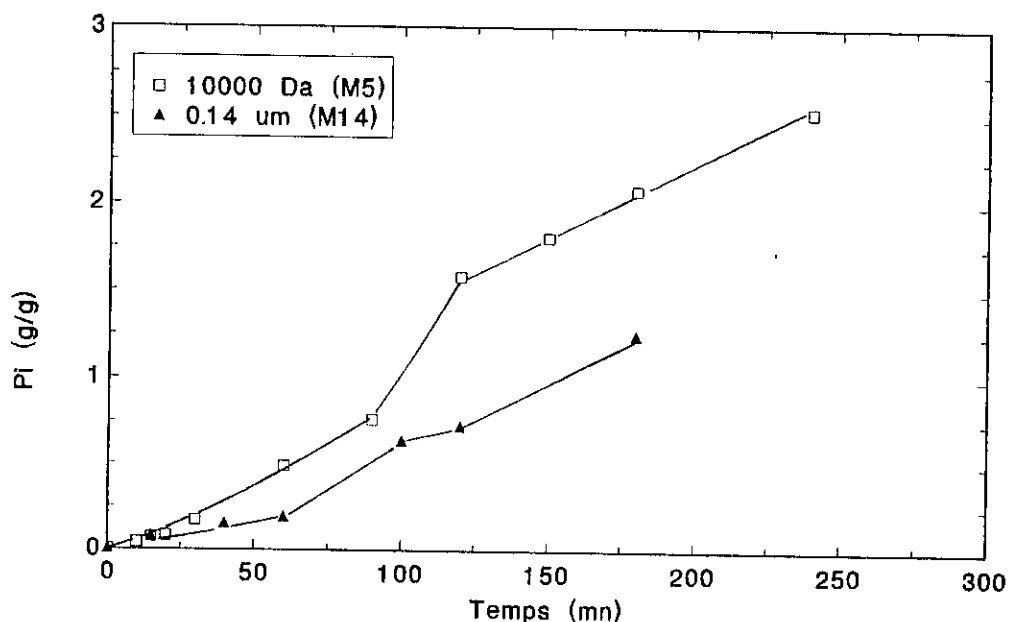


Figure 81 : Influence du seuil de coupure de la membrane sur la productivité instantanée

$S_0=62.66$ g/l, $T=55^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8$, $E=4\text{g/l}$, $\Delta P=0.8\text{bar}$

Ainsi, l'utilisation de la membrane M5, nous permet de doubler les performances de notre réacteur.

En conclusion, la membrane M5 semble présenter de meilleurs performances comparée à la membrane M14.

Les degrés d'hydrolyses sont appréciables 20,05% , la rétention de l'enzyme est meilleure, les rendements peptidiques plus élevés et la productivité est doublée.

De plus, le perméat issu de la membrane M5 est moins chargé en peptides héminiques indésirables.

En fin de procédé, sa décoloration sera donc plus aisée.

D'autre part, la période de colmatage et de décolmatage nécessaire pour l'utilisation de la membrane M14 est évitée pour la membrane M5.

La durée de préparation, d'utilisation et de lavage est effectivement un paramètre décisif pour le choix d'un procédé.

En outre, pour atteindre un même débit de perméat, il nous a fallu choisir une vitesse de recirculation très élevée 2,23 m/s pour la membrane M5 seulement en mettant en place l'âme inox.

Il n'y a donc pas de consommation supplémentaire d'énergie.

Cependant, la technique de colmatage reste une méthode très prometteuse pour un tel procédé, nous avons obtenu des résultats certes plus faibles mais s'approchant de près de ceux obtenus avec la membrane M5.

II-5- Décoloration de l'hydrolysat:

L'hydrolyse papaique de l'hémoglobine bovine produit un hydrolysate fortement coloré, en réacteur continu à membrane.

L'objectif de cette étude est la mise au point d'un procédé de décoloration de cet hydrolysate.

L'élimination de la fraction hémique du perméat est donc effectuée avec l'alumine acide.

L'adsorption est effectuée en mode batch suivant plusieurs étapes:

- La détermination du temps d'équilibre.
- L'étude de l'influence du pH, de la température et de la masse d'alumine.

Nous étudierons donc la décoloration d'un perméat obtenu à partir de l'hydrolyse de 62.66 g/l d'hémoglobine par 4 g/l de papaine, à pH 8 et 55°C. La concentration en peptides est de 22.7 g/l pour le perméat de la membrane M14 et 25.26 g/l pour le perméat de la membrane M5.

II-5-1- Détermination du temps d'équilibre:

L'adsorption du perméat est effectuée avec 1 g d'alumine acide pour 100 ml de solution, à pH 4 et à température 60°C pendant 24 heures.

Le dosage de la fraction hémique à 400 nm et de la fraction peptidique total à 280 nm à des intervalles de temps réguliers, nous permet le calcul des rendements de décoloration R_D et de pertes en peptides R_p' .

avec:

$$R_D = \frac{D_{400} \text{ initial} - D_{400} t}{D_{400} \text{ initial}} \times 100 \quad (53)$$

$$R_p' = \frac{D_{280} \text{ initial} - D_{280} t}{D_{280} \text{ initial}} \times 100 \quad (54)$$

avec D_{400} est l'absorbance à 400 nm.

D_{280} est l'absorbance à 280 nm.

La figure 82 représente l'évolution des rendements de décoloration R_D et de pertes en peptides R_p' au cours du temps d'adsorption.

La réaction d'adsorption de la fraction hémique sur l'alumine acide est très rapide.

En effet, il semble que 20 minutes de contact suffisent pour que 45.54 % de la coloration soit éliminée pour une perte en peptides de 5.48 % seulement.

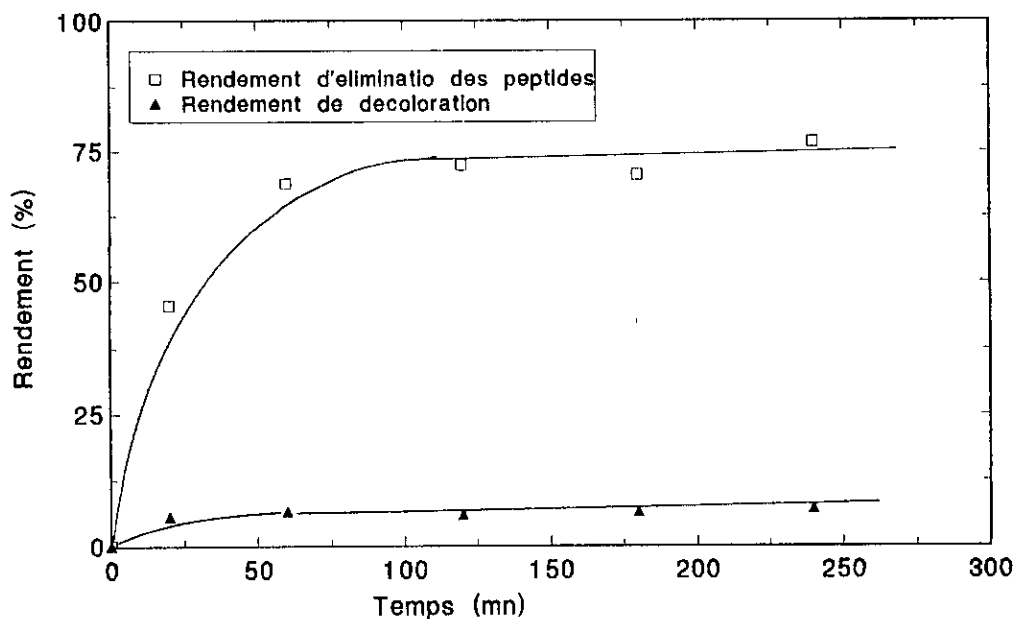


Figure 82 : Determination du temps d'equilibre pour la decoloration de l'hydrolysat .

$S_0 = 62.66 \text{ g/l}$, $T = 60^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4$, $m_{\text{alumine}} = 1 \text{ g/100ml}$

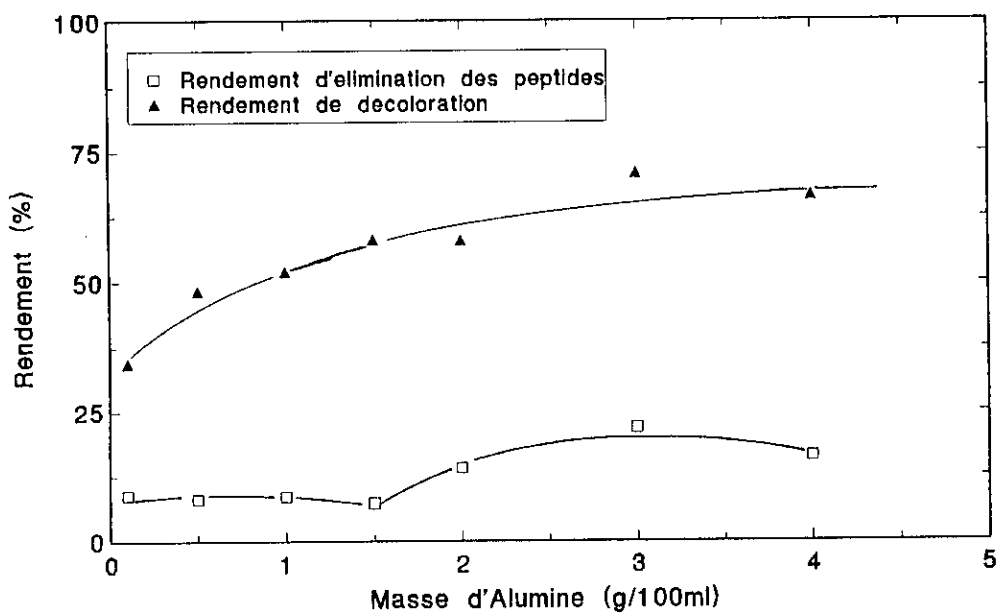


Figure 83 : Influence de la masse d'alumine sur la decoloration de l'hydrolysat

$S_0 = 62.66 \text{ g/l}$, $T = 25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4$

Au delà, l'élimination de la fraction hémique continue plus lentement, le gain en décoloration entre 4 h et 24 h de réaction est seulement de 3.57 % ce qui est très faible.

Nous suggérons donc pour la suite de notre étude des durées de décoloration de 4 heures, le rendement de décoloration R_D est de 78.79 % et de pertes de peptides de 6.96 %.

II-5-2- Influence de la masse d'alumine:

L'étude de l'influence de la quantité d'alumine acide a été effectuée en mode batch à pH 4, pour un hydrolysate d'hémoglobine et à température ambiante.

Sept quantités croissantes d'alumine sont testées 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 et 4 g par 100 ml de perméat.

La figure 83 représente l'évolution des rendements de décoloration R_D et de pertes en peptides R_p pour chaque masse d'alumine introduite.

Globalement, la décoloration évolue de manière croissante avec la masse d'alumine, de même, les pertes en peptides augmentent.

Pour 1 g d'alumine les rendements de décoloration sont de 52.02 % avec seulement 8.58 % en pertes en peptides.

Les essais avec des masses d'alumine plus élevées engendrent de plus grandes pertes en peptides.

Une augmentation de la quantité relative d'alumine acide a un effet positif sur la vitesse et le degré de décoloration mais diminue dans le même temps le rendement en protéines.

Pour minimiser ces pertes en peptides et maximiser le procédé de décoloration du perméat, nous suggérons 1 g d'alumine comme masse optimale.

II-5-3- Influence du pH:

La détermination du pH optimal d'action de l'alumine acide est effectuée à température ambiante pour une gamme de pH de 1 à 10.

Les pH sont obtenus par ajout de l'acide chlorhydrique ou de la soude. les solutions de perméat (100 ml) au pH voulus sont alors additionnées de 1 g d'alumine acide, la décoloration est effectuée pendant 4 heures.

Les rendements de décoloration R_D et d'élimination en peptides R_p sont représentées en figure 84 pour chaque pH.

La fixation des peptides hémiques, sur l'alumine acide semble augmenter avec le pH pour atteindre un maximum à pH 4, le pourcentage de décoloration est de 58.24 % et d'élimination en peptides de 15.45 %.

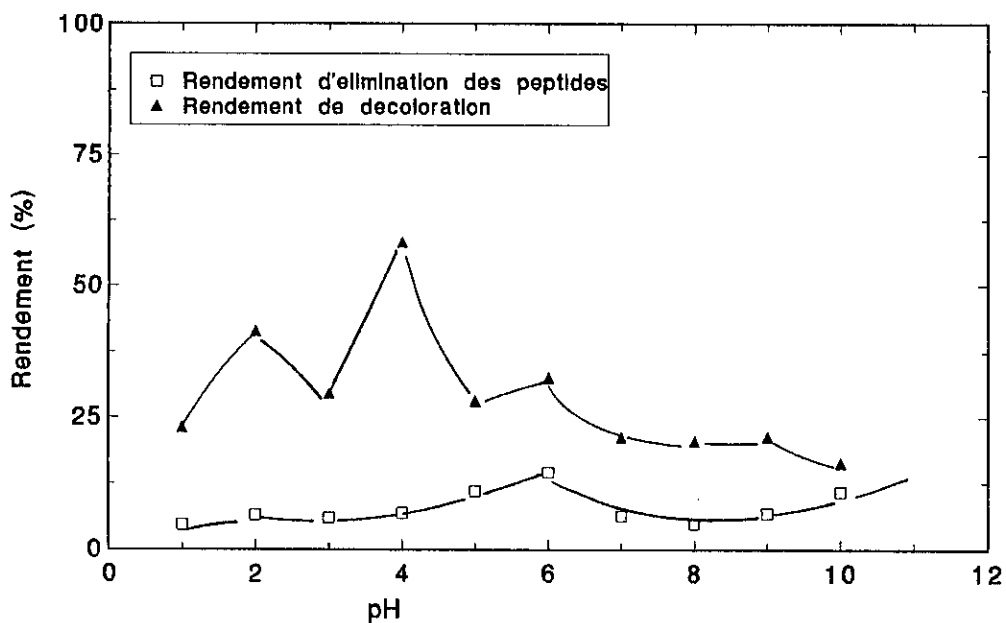


Figure 84 : Influence du pH sur la decoloration

$S_0 = 62.66 \text{ g/l}$, $T = 25^\circ\text{C}$, Matumine = 1 g/100ml

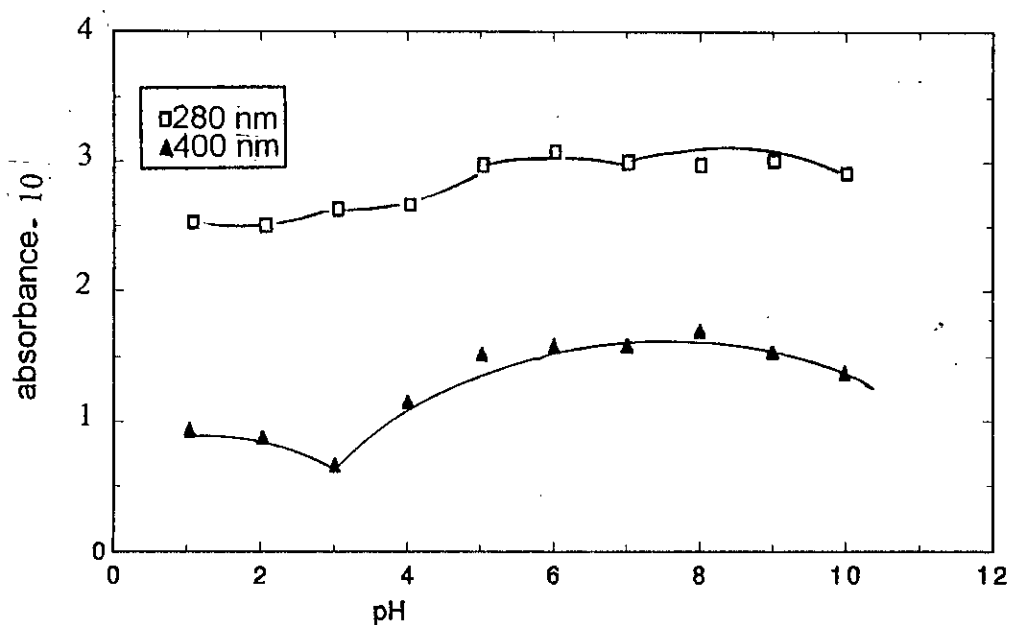


Figure 85 : Influence du pH sur la solubilité des peptides hémiques . $S_0 = 62.66\text{g/l}$, $T=25^\circ\text{C}$

Pour des pH supérieurs à 4, les rendements de décoloration chutent progressivement, la décoloration est donc d'autant plus rapide et complète que le pH est bas mais supérieur ou égal à 4.

Par ailleurs, la solubilité des peptides avant action de l'alumine acide passe par un minimum lorsque le pH de la solution est égal à leur pH isoionique (pHi), il est donc possible en faisant varier le pH, de précipiter des fractions de pHi différents.

L'étude de la solubilité du mélange peptidique obtenu après hydrolyse, permet de déterminer le pH optimal pour la précipitation de la fraction héminique.

La figure 85, illustre l'influence du pH de la solution sur la solubilité de la fraction peptidique en général et héminique en particulier par la représentation des absorbances à 400 nm et à 280 nm.

La fraction héminique reste soluble dans la solution jusqu'à un pH 5, sa solubilité diminue lentement. Au pH inférieurs à 5, cette chute en solubilité devient très rapide, sa solubilité diminue lentement pour remonter aux pH inférieurs à 2.

Il existe deux zones de pH où la fraction héminique est soluble, les pH supérieur à 5 et les pH acides inférieurs à 2.

Le pH de décoloration devra probablement être compris dans l'intervalle de pH où la solubilité de la fraction héminique est minimale.

De plus, la décoloration supplémentaire avec l'alumine acide est meilleur à pH 4 et la fraction héminique atteint son maximum d'insolubilisation.

Ce pH semble donc être optimal pour une décoloration avec l'alumine acide.

II-5-4- Influence de la température:

L'hydrolysate obtenu après ultrafiltration est décoloré à pH 4, avec un rapport masse d'alumine volume de perméat de 1 % à différentes températures 10°C, 20°C, 40°C et 60°C.

Pour chaque température des prélèvements sont effectués après 4 heures de décoloration, ils sont directement centrifugés à 4000 tr/mn. Les absorbances à 400 nm et 280 nm sont alors lues.

La figure 86 représente l'évolution des rendements de décoloration R_D et d'élimination des peptides R_p en fonction de la température.

L'élévation de la température permet une nette amélioration des rendements de décoloration, on atteint pour 60°C un rendement de 85.24 %.

Les rendements d'élimination peptidiques sont proches pour les différentes températures avec une valeur légèrement plus élevée pour la température de 10°C. Il est donc possible par une augmentation de la température de décolorer des hydrolysats à fortes teneurs en peptides héminiques, avec des quantités d'alumine

et des temps de décoloration modérés ainsi que des rendements de décoloration élevés.

De plus, la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine étant réalisée à 55°C, il semble approprié de maintenir, et de décolorer à une température proche à savoir 60°C, les hydrolysats peptidiques à la sortie de l'ultrafiltration.

La cinétique de décoloration semble être endothermique.

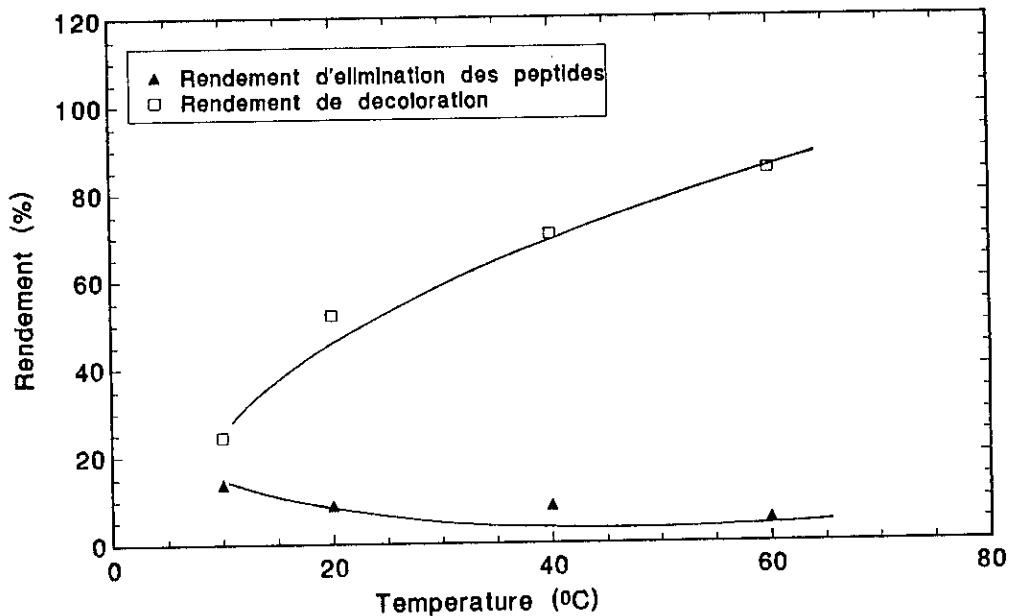


Figure 86 : Influence de la température sur la décoloration.
 $S_0 = 62.66$ g/l, pH = 4, $m_{\text{alumine}} = 1$ g/100ml

En conclusion, l'optimisation de la décoloration d'un perméat issu de l'hydrolyse papaïque de 62.66 g/l d'hémoglobine conduit à un rendement de décoloration optimale de 85.24 %, avec un taux de peptides perdues très faible.

En outre, la température optimale de décoloration permet d'envisager une possibilité de mise en oeuvre d'un procédé industriel continu rassemblant les trois étapes hydrolyse - Ultrafiltration - décoloration -

Par ailleurs, le pH optimal 4 présente l'avantage d'inactiver l'enzyme (papaïne) ou les fragments d'enzymes éventuellement présents dans le perméat, surtout pour le cas de la membrane M14.

II-6- Analyse de l'hydrolysat obtenu:

Des études analytiques ont été réalisées sur différents lots d'hydrolysats papaique de l'hémoglobine bovine, pour les deux membranes M14 et M5 en fonctionnement optimal:

- D'une part, nous avons déterminé la teneur en acides aminés en pourcentage massique par HPLC (Chromatographie- Liquide- Haute-performance).
- D'autre part, nous avons évalué la répartition des masses molaires de la population peptidique de l'hydrolysat par électrophorèse sur gel polyacrylamique.

II-6-1- Composition en acides aminés de l'hydrolysats:

L'hydrolysat peptidique est analysé à différents stades du procédé: avant et après décoloration à l'alumine.

Ce produit est obtenu par hydrolyse enzymatique de 62.66 g/l d'hémoglobine, à pH 8, à une température de 55°C, avec 4 g/l en papaïne sous une pression transmembranaire de 0.8 bar et une vitesse de recirculation de 0.668 m/s pour la membrane M14 et 2.23 m/s pour la membrane M5.

Le tableau 13 représente les pourcentages massiques des différents acides aminés pour 100 g d'acides aminés totaux.

Globalement, les hydrolysats issus de la membrane M14 ou de la membrane M5 ont des compositions proches avec une légère augmentation pour l'hydrolysat de la membrane M14.

Tableau 13: Composition en acides aminés en g/100 g d'acides aminés

| Acides aminés | Perméat M14 | Perméat M14 décoloré | Perméat M5 | Perméat M5 décoloré |
|--|--------------|----------------------|--------------|---------------------|
| Asp | 1.12 | 1.25 | 5.24 | 1.69 |
| Ser | 0.16 | 0.36 | 0.94 | 1.28 |
| Glu | | 0.43 | 3.04 | 1.34 |
| Gly | 11.64 | 12.68 | 15.24 | 8.30 |
| His | 3.49 | | | |
| Arg | 0.92 | 5.25 | 1.48 | 7.83 |
| Thr | | 1.21 | 0.98 | |
| Ala | 1.02 | 1.804 | 5.37 | 3.37 |
| Pro | 8.01 | 6.62 | 10.26 | 5.24 |
| Cys | 2.36 | 6.36 | | |
| Tyr | 4.55 | 7.45 | 4.29 | 7.84 |
| Val | 6.04 | | | |
| Met | 6.63 | 15.87 | 9.67 | 17.82 |
| Lys | 15.66 | 14.53 | 12.84 | 21.63 |
| ILe | 18.60 | 10.63 | 17.06 | 9.63 |
| Lev | 13.36 | 7.25 | 6.59 | 5.68 |
| Phe | 6.41 | 8.28 | 6.97 | 8.37 |
| Pourcentages d'acides aminés essentiels | 70.19 | 57.77 | 54.11 | 63.13 |

Le pourcentage d'acides aminés libres dans l'hydrolysate est en effet de 5.07 % et 3.31 % respectivement pour les membranes M14 et M5.

Cette faible teneur en acides aminés libres est recommandée pour les applications en nutrition entérale humaine (PIOT, 1989), et pour les utilisations en alimentation du bétail (SILVESTRE et al, 1994 a).

Les petites chaînes peptidiques présentent une plus grande valeur nutritive et leur assimilation est plus rapide que les acides aminés libres (SILVESTRE et al, 1994 a), (BOZA et al, 1995).

Par ailleurs à l'état libre, la tyrosine et la cystine sont peu solubles, la glutamine et la cystéine sont instables après les étapes de stérilisation et de stockage (SILVESTRE et al, 1994 b).

Dans notre cas, la cystéine n'a pas pu être détectée dans le perméat M5 et est présente en très faible teneur dans le perméat M14, cela est vraisemblablement dû à son instabilité au cours de la période de stockage avant analyse.

D'autre part, le pourcentage d'acides aminés essentiels est très proche de celui des protéines de l'oeuf (51.8 %), en effet pour les deux membranes M14 et M5, le perméat décoloré présente respectivement 57.75 % et 63.13 % d'acides aminés essentiels.

Les acides aminés les plus abondants sont la glycine, la méthionine, la lysine, l'isoleucine et enfin la phénylalanine avec des teneurs de même ordre pour les perméats issus de la membrane M5 ou de la membrane M14.

Ce sont tous des acides aminés essentiels, ce qui rend l'hydrolysât ainsi obtenu très riche et multiplie ces domaines d'applications.

Il existe cependant, une notable carence en histidine, thréonine et valine..

De plus, l'action décolorante de l'alumine et acidifiante du pH (pH = 4 pour une décoloration optimale) n'agit que faiblement sur les teneurs d'acides aminés libres. Cette gamme de pH désactive l'enzyme et assure un milieu défavorable aux attaques bactériennes.

La perte peptidique observée au cours de la décoloration semble être principalement due à la rétention des peptides héminiques et non à la fixation des acides aminés libres.

De plus, notre hydrolysât semble se classer dans la troisième et dernière génération d'hydrolysâts protéiques, caractérisée par sa composition en acides aminés inférieure à 20 %.

Selon LAHL et al, (1994), les hydrolysâts protéiques sont classés en trois générations, la première caractérisée par une composition en acides aminés de 70 % avec des peptides à enchaînement de 8 acides aminés au maximum. La deuxième génération est composée de 40 à 60 % d'acides aminés libres avec des peptides à 12 acides aminés au maximum.

La troisième génération d'hydrolysâts avec son pourcentage faible en acides aminés libres et ses peptides à 15 acides aminés, présente le plus grand pouvoir nutritionnel.

En conclusion, la composition en acides aminés de notre hydrolysât issu des deux membranes M5 et M14 est reproductible et montre des qualités nutritionnelles élevées.

II-6-2- Electrophorèse:

L'électrophorèse de plusieurs échantillons d'hydrolysats a été effectuée suivant le protocole expérimental cité au chapitre Matériels et Méthodes.

Une gamme assez large de marqueurs à hauts et bas poids moléculaires a été utilisée: Phosphorylase b: 94000 Da; Albumine: 67000 Da; Ovalbumine: 43000 Da; Carbonic anhydrase: 30000 Da; Trypsin inhibitor: 20100 Da; ¹ α-Lactalbumine: 14400 Da.

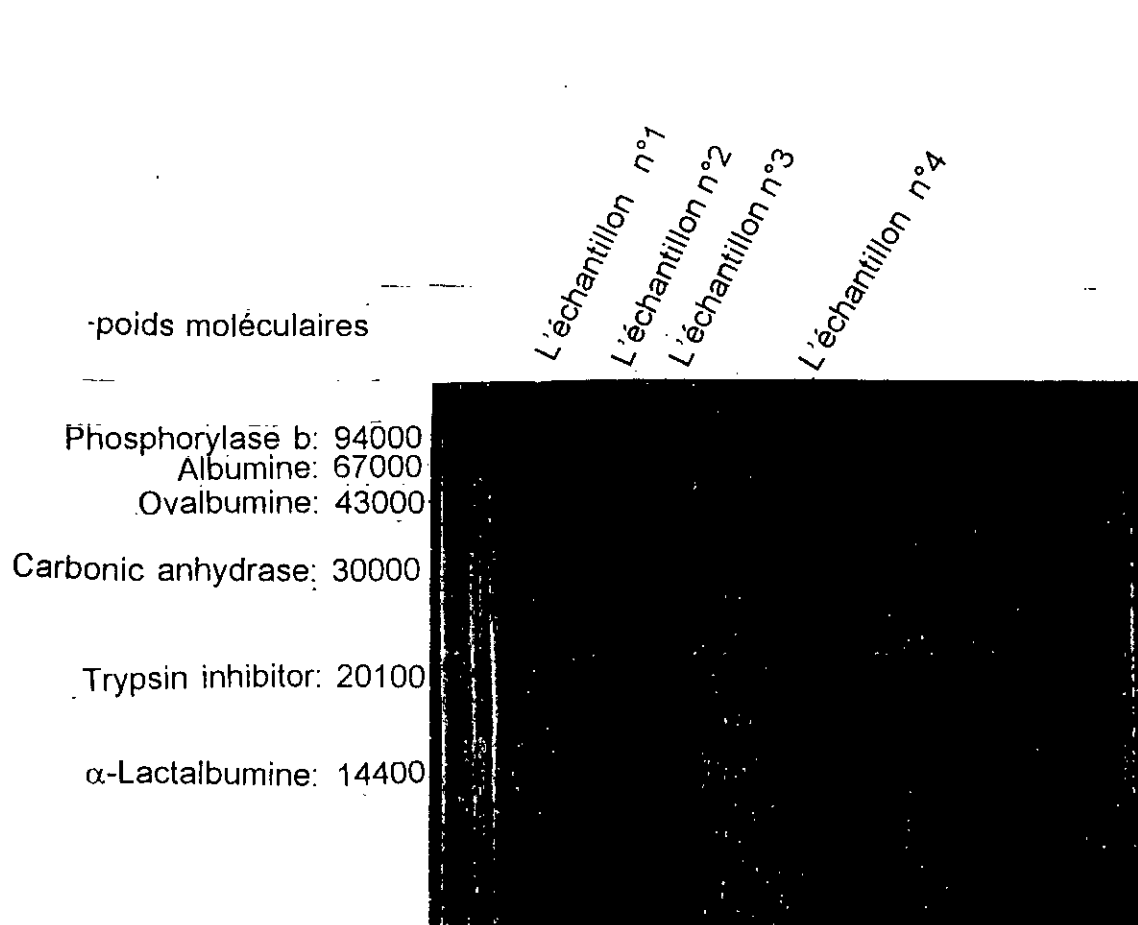


FIGURE 87 : GEL D'ELECTROPHORÉSE

Sur un même gel d'électrophorèse de type Polyacrylamide, quatre échantillons d'hydrolysats peptidiques sont analysés comme le montre la figure 87.

L'échantillon n°1 représente les marqueurs à masses moléculaires connues et précédemment citées.

L'échantillon n°2 représente le perméat issu du réacteur continu muni de la membrane M14 colmatée, une série de bandes est observée, la détermination des poids moléculaires correspondants montre la présence de peptides de 27000, 20500, 17000, 14500 à 11900 Da ainsi que de petits peptides inférieurs à 11900 Da.

L'échantillon n°3 représente le perméat issu du réacteur continu muni de la membrane M5.

Une série de bandes est observée, la détermination des poids moléculaires montre l'existence de peptides de 29500, 28500, 16000, 11900 Da ainsi que des peptides inférieurs à 11900 Da.

L'échantillon n°4 représente l'hydrolysats brut ou le retentat. La bande observée montre qu'il y'a une forte dégradation.

Le perméat issu de la membrane M14 colmatée ainsi que celui issu de la membrane M5 présentent des profils très proches, les macropeptides et micropeptides qui les composent sont similaires et de même ordre.

Les peptides à 29500 Da et 28500 Da ainsi que 27000 Da sont prédominants pour les deux hydrolysats.

Il faudrait probablement prévoir une phase d'hydrolyse enzymatique en réacteur discontinu assez longue avant d'entamer le couplage de l'ultrafiltration en mode continu pour obtenir un hydrolysats riche en peptides de faibles poids moléculaires.

D'autre part, la technique de colmatage que nous avons effectuée sur la membrane M14 semble être plus ou moins performante.

Cependant la présence de peptides à masses moléculaires supérieures à celle de la papaïne suggère le passage éventuel de la papaïne dans le perméat.

En effet, les pourcentages d'activité enzymatique résiduelle observés dans le perméat des deux membranes M5 et M14 sont respectivement de 20.94 et de 43.36 % après seulement 4 heures d'hydrolyse en mode continu.

Pour parer à cela DEESLIE et CHERYAN (1991) ont proposé d'effectuer un traitement d'inactivation de l'enzyme à la sortie du réacteur à membrane, par action du pH ou de la température.

Dans notre cas, les conditions opératoires de l'étape de décoloration à savoir un pH acide (pH 4) et une température élevée (60°C) favorisent la dénaturation de la papaïne contenue dans le perméat.

Un traitement supplémentaire serait donc inutile.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les sous produits d'abattoirs dont principalement le sang sont encore mal valorisés dans notre pays.

Nous espérons par l'intermédiaire de cette étude contribuer à l'élaboration d'un programme de récupération de cette ressource protéique.

Au cours de nos travaux, nous avons montré qu'il était possible de produire à partir de l'hémoglobine bovine un hydrolysate peptidique reproductible et parfaitement défini.

L'étude de la thermostabilité de la papaïne vis à vis d'un substrat standard : la caséine isoélectrique, nous a permis de choisir dans un premier temps la gamme de température qui préserve le maximum de l'activité enzymatique originelle.

L'activité de la papaïne est fortement affectée par la température pour des durées de chauffage prolongées. Une heure de chauffage à 55°C abaisse l'activité enzymatique à 96.61% par contre pour une durée plus grande 4h, celle ci s'abaisse à 52,54% de sa valeur initiale.

L'hydrolyse papaïque de l'hémoglobine a été effectuée en mode discontinu dans un bioréacteur de deux litres.

Les performances de cette hydrolyse ont été optimisées , nous avons obtenu pour un pH de 8, une température de 55°C et une concentration en enzyme de 4 g/l, des degrés d'hydrolyse appréciables de 20%, des rendements peptidiques élevés de 68% après seulement 4 heures d'hydrolyse.

De plus l'étude de la cinétique d'hydrolyse papaïque de l'hémoglobine révèle l'existence d'une inhibition par le substrat pour les fortes concentrations en hémoglobine supérieures à 12,53 g/l, les constantes cinétiques obtenues graphiquement sont :

$$K_m = 40\text{g/l}, K_s = 3\text{g/l}, V_{\text{max}} = 8,33\text{g/l.mn}$$

Le bilan de matière établi nous a permis l'orientation de notre choix de concentration en substrat, en effet, les faibles concentrations donnent des taux de conversion élevés proches de 1.

Le couplage des deux techniques : Hydrolyse enzymatique et Ultrafiltration en continu est assuré dans le bioréacteur de deux litres pour les deux membranes M14 colmatée et M5.

L'étude de la rétention de la papaïne par ces deux membranes permet de constater que le perméat de la membrane M14 colmatée présente une activité enzymatique élevée de 43,36%, par contre le perméat issu de la membrane M5 est caractérisé par une très faible activité enzymatique, provenant probablement des fragments d'enzyme non retenus par la membrane.

Pour parer à cela, nous suggérons un apport graduel en papaïne pour les deux membranes, et un colmatage plus prononcé pour la membrane M14.

Les vitesses de recirculation optimales sont respectivement de 0,668 et 2,23 m/s avec une pression transmembranaire de 0,8 bar pour M14 et M5.

La cinétique d'hydrolyse enzymatique en réacteur continu à membrane est mickaelienne, les constantes K_m et V_{max} sont 3 fois et 8 fois plus petites que celles obtenues en réacteur discontinu : $K_m = 12.647\text{g/l}$, $V_{max} = 1.027\text{g/l.mn}$.

Cependant le rapport V_{max}/K_m est plus faible en réacteur continu, la papaïne possède donc une affinité plus grande pour l'hémoglobine en mode discontinu.

L'utilisation du réacteur continu nous a permis de lever les différentes inhibitions observées en discontinu et par la même de traiter des concentrations initiales 5 à 6 fois plus élevées.

Le bilan de matière en réacteur continu à membrane montre que les courbes expérimentales et théoriques sont très proches pour la gamme de concentration étudiées.

Au cours de la durée d'étude le régime d'écoulement est donc maintenu permanent.

Les taux de conversion maximaux sont de l'ordre de 0,74 et 0,33 respectivement pour 4.51 g/l et 62.66 g/l en hémoglobine.

Pour les concentrations élevées, il faudrait vraisemblablement prolonger le temps d'hydrolyse.

Le colmatage de la membrane M14 est hétérogène, les deux modèles de colmatage S.B.M et C.F.M sont appliqués avec succès.

L'augmentation de la vitesse de recirculation favorise le colmatage superficiel ou réversible.

Inversement, l'augmentation de la concentration en hémoglobine accroît le nombre de pores totalement bloqués et par la même rend le colmatage interne ou irréversible majoritaire.

Globalement la membrane M5 semble présenter les meilleurs résultats, les degrés d'hydrolyse et les rendements peptidiques sont meilleurs que la membrane M14, les débits de perméat sont de même ordre pour des vitesses de recirculation de 0.668 et 2.23 m/s à 0.8 bar respectivement pour M14 et M5.

Il convient de préciser que ces vitesses correspondent à un même débit de recirculation 66,8 l/h, l'utilisation de l'âme inox pour M5, nous a permis d'atteindre cette vitesse, il n'y a donc aucune consommation supplémentaire d'énergie.

Le colmatage des membranes reste cependant une technique prometteuse pour un tel procédé, nous avons obtenu des résultats certes plus faibles mais s'approchant de près de ceux obtenus avec la membrane M5.

La décoloration du perméat est sensiblement améliorée après optimisation. Les rendements de décoloration atteignent 85,24% avec seulement 5% de pertes en peptides.

L'hydrolysât obtenu en réacteur continu présente une composition en acides aminés bien équilibrée avec un pourcentage en acides aminés essentiels élevé respectivement de 57.75 et 63.13% pour les membranes M14 et M5.

De même, l'électrophorèse de différents lots d'hydrolysats révèle la présence d'une famille de peptides à poids moléculaires variés de même ordre pour les deux membranes M14 colmatée et M5.

Globalement, les résultats obtenus sont satisfaisants, notre hydrolysât appartient à la 3ème et dernière génération d'hydrolysats protéiques (LAHL et BRAUN, 1994).

Il serait intéressant dans un proche avenir d'envisager une production de cet hydrolysât à une échelle plus grande et son application dans les différents domaines.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- ALAIS, C., 1975.** Sciences du lait, principes et techniques laitières, 3^{ème} ed.
- ADLER-NISSEN, J., 1979.** Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, J. Agric. Food. Chem, Vol 27, N°6, pp 1256-1262.
- AUTIO, K., LYYTIKAINEN, H., MALKKI, Y., KANKO, S., 1985.** Penetration studies of blood globin gels, J. Food. Sci, Vol 50, N°3, pp 615-617.
- BAILEY, J.E., OLLIS, D.F., 1986.** Biochemical engineering fundamentals, 2nd ed, Mac Graw Hill.
- BEDNARSKI, W., LEMAN, J., 1979.** Detoxification and parallel modification of some functional properties of unconventional protein by enzymatic treatment, Acta alim Polonica, Vol 5, N°2, pp 165-181.
- BEREZIN, I.V., MARTINECK, K., 1977.** Les bases physico-chimiques de la catalyse enzymatique, ed VICK School MOSCOU.
- BERGMEYER, H.U., 1983.** Methods of enzymatic analysis, 3^{ème} ed, Jurgen Bergmeyer and Marianne Grabl.
- BOURGEOIS, C. M., LEROUX, P., 1982.** Protéines animales extraits, concentrés et isolats en alimentation, ed technique et Documentation.
- BOWEN, W. R., HALL, N. J., 1995.** Properties of microfiltration membranes: Mechanisms of flux loss in the recovery of an enzyme, Biotechnol. Bioeng, Vol 46, pp 28-35.
- BOZA, J. J., MARTINEZ-AUGUSTIN, O., GILL, A., 1995.** Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate, J. Agric. Food. Chem, Vol 43, pp 872-875.
- BRESSOLIER, Ph., PETIT, J. M., JULIEN, R., 1988.** Enzyme hydrolysis of plasma proteins in a CSTR ultrafiltration reactor: Performances and modeling, Biotechnol. Bioeng, Vol 31, pp 650-658.
- BRUN, J. P., 1989.** Procédés de séparation par membranes, ed Masson.
- CALDIRONI, H. A., OCKERMAN, H. W., 1982.** Incorporation of blood proteins into sausage, J. Food. Sci, Vol 47, N°2, pp 405-408.
- CARBOSEP, 1994.** Micro modules carbosep: Manuel technique.

- CEMPEL, N., PIOT, J.M., GUILLOCHON, D., 1994.** Preparation of photodynamic hydrolysates from bovine hemoglobin, *J. Agric. Food. Chem*, Vol 42, pp 2059-2063.
- CHERYAN, M., DEESLIE, D., 1983.** Soy protein hydrolysis in membrane reactors, *J.A.O.C.S*, Vol 60, N°6, pp 1112-1115.
- CULIOLI, C., NOEL, P., GOUTEFONGEA, R., VIZET, N., CHAZEIX, J., COQUILLET, R., 1981.** Texturation par filage de mélanges de protéines végétales et de protéines de sang. 1. Etude de la coloration obtenue par formation de nitrosylhémoglobine, *Sciences des Aliments*, Vol 1, N°2, pp 169-185.
- DALEV, P.G., 1994.** Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate, *Bioresource Technology*, Vol 48, pp 265-267.
- DEESLIE, W.D., CHERYAN, M., 1991.** Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes, *J. Food. Sci*, Vol 57, N°2, pp 411-413.
- DEESLIE, W. D., CHERYAN, M., 1981.** Continuous enzymatique modification of proteins in an ultrafiltration reacteur, *J. Food. Sci*, Vol 46, pp 1035-1042.
- DELANEY, R.A.M., DONNELLY, J. K., BENDER, L.D., 1975.** Concentration and characterisation of porcine Blood Plasma, *Lebensm-Wiss. V. Technol*, Vol 8, pp 20-24.
- DELANEY, R.A.M., 1977.** Protein concentrates from slaughter animal blood, Vol 12, pp 339-354.
- DELAUDEY, J., 1986.** *Biochimie T.D*, ed HERMann, Paris.
- DIVE, D., PIOT, J.M., SANNIER, F., GUILLOCHON. D, CHARET. P, LUTRAT. S, 1989.** Use of hemoglobin enzyme hydrolysater, prepared on a pilot-plant scale, as a nitrogen source for the cultivation of three species of tetrahymena, *Enz. Microb. Teckno*. Vol 11, pp 165-169.
- DO CARMO GONCALVES, M., GALEMBECK, F., 1989.** Serum protein fractionation by membran processes, centrifugal ultrafiltration, osmosedimentation, and multistage ultrafiltration, *separ. Sci. Tecknol*, Vol 24, pp 303-316.

- DUARTE, F.J., ARROYO, O., BERISTAIN, C.I., ARGAIZ, A., GARCIA, H.S., 1988.** Enzymic hydrolysis of whole bovine blood and its relationship to some colligative properties, *J. Food. Sci.*, Vol 53, N°1, pp 272-273.
- DRIOLI, E., 1992.** Emerging membrane processes, récents progrès en génie des procédés- Lavoisier, Vol 6, N°22, pp 339-348.
- DURAND, G., MONSAN, P., 1982.** Les enzymes: Production et utilisations industrielles, ed Gauthier villars.
- FRUTEAU DE LACLOS, K., 1986.** Contribution à l'étude de la valorisation des sous produits d'abattoirs, Thèse 3^{ème} cycle, Montpellier.
- GAOUAR, O., 1995.** Etude d'un réacteur continu à membrane d'ultrafiltration pour la conversion enzymatique de l'amidon de Manioc en sirop de Maltose, Thèse docteur ingénieur, Montpellier.
- GHAYAL, C.D., JOSHI, R.N., 1983.** A kinetic study of papaïn immobilized in paraffin wax, *Biotech. Bioeng.*, Vol 25, N°3, pp 2099-2101.
- GHOSH, S., 1992.** Hydrolysis of soy bean by papaïn immobilized on wood by radiation polymerization, *Biotech. Technol.*, Vol 6, N°2, pp 181-184.
- GOLDBERG, M., CHEVRIER, D., 1979.** traitement du plasma de bovins par ultrafiltration. Estimation des surfaces nécessaires, *Industries alimentaires et Agricoles.*
- GRAY, H.B., HAIGHT, G.P., 1985.** Principes de chimie, ed Inter éditions.
- HALASZ, A., MIETSCH, F., HAJOS, GY., 1982.** Procedure for the recovery of haem-free beef blood for food technological purposes, *Food. Indus. and the Environment Int. Symp.*, Budapest, Sept, pp 415-420.
- HALE, M.B., 1969.** Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish protein, *Food. Technol.* Vol 23, pp 107-110.
- HAN, D., MAC MILLAN, W., GODBER, J.S., 1994.** Hemoglobin, myoglobin and total pigments in beef and chicken muscles: Chromatographie determination, *J. Food. Sci.*, Vol 59, N°6, pp 1279-1282.
- HALD-CHRISTENSEN, V., 1978.** Decolorisation of slaughter blood by partial enzymic hydrolysis, *Proc. 24 th Europ. Meeting Meat Res. Workers.* Kulmbach.
- HAROLD, W., HARPER, A., 1985.** Précis de biochimie, Ed. Lavoisier.

- HAYAKAWA, S., MATSUURA, Y., NAKAMURA, R., SATO, Y., 1986.** Effect of heat treatment on preparation of colorless globin from bovine hemoglobin using soluble carboxymethyl cellulose, *J. Food. Sci.*, Vol 51, N°3, pp 786-790.
- HOULIER, B., 1988.** Récolte et traitement du sang des abattoirs, 2^{ème} ed Apria.
- HUYARD, A., TROUVE, E., MANEM, J., 1992.** Recent advances on membrane bioreactors applications to water and wastewater treatment, *Récents. progrès des génie des procédés*, Vol 6, N°21, pp 189-193.
- INGHAM, J., DUNN, I.J., HEIZLE, E., PRENOSIC, J.E., 1994.** Chemical engineering dynamics: Modeling with PC simulation, ed V.C.H, Weinheim.
- ITO, T., YOSHIDA, S., KAMISOYAMA, H., TANAKA, H., 1990.** Electrolytic reduction of heme proteins: Attempt to prepare stable natural colorant for sausage, *J. Food. Sci.*, Vol 55, N°6, pp 1689-1695.
- JOBLING, A., 1986.** Recovery and utilisation of edible protein from abattoir by-products. Lensfield Products Ltd, BEDFORD, UK.
- JOPE, E.M., JOPE, H.M, O'BRIEN, J.R., 1949.** Crystallizable recombined haemoglobin from human red-cell haemoglobin, *nature*, Vol 164, N° 4171, pp 622-621.
- KONDO, A., IMURA, K., HIGASHITANI, K., 1994.** preparation of immobilized papain using thermosensitive latex particles, *J. Ferm. Bioeng*, Vol 78, N° 183, pp 241-265.
- KOULIAS, D.P., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., MACRIS; B.J., KOUKIOS, E.G., 1991.** Correlating the effet of pretreatment of the enzymatic hydrolysis of straw, *Biotech. Bioeng*, Vol 39, N°1, pp 113-116.
- LAHL, W.J., BRAUN, S.D., 1994.** Enzymatic production of protein hydrolysates for food use, *Food. technol*, Oct 94, pp 68-71.
- LANG, C., 1990.** Valorisation non alimentaire du cinquième quartier des abattoirs, *I.A.A*, Vol 107, N°10, pp 951-957.
- LECONTE, D., 1989.** Contribution à l'étude de la valorisation du cruor des abattoirs: Application de l'Ultrafiltration à la préparation d'hydrolysats peptidiques à partir de l'hémoglobine bovine. Thèse Docteur Ingénieur, Compiègne.

- LEE, Y.Z., WANG, R.M., NAKAI, S., 1990.** Preparation of colorless globin from bovine hemoglobin using sodium alginate, *J. Food. Sci*, Vol 55, N°2, pp 577-578.
- LEHNINGER, A., 1981.** Biochimie. Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires, 2^{ème} ed Flammarion. Medecine, Sciences, Paris.
- LIU, J.K., WAIBEL, P.E., NOLL, S.L.** Nutritional evaluation of blood meal and feather meal for turkeys, *Poultry science*, Vol 68, N°1, pp 1513-1518.
- LUQUET, F.M., 1985.** Laites et produits laitiers: vache, brebis, chèvre, Vol 2: les produits laitiers: Transformation et technologie, Ed. Technique et Documentation.
- MAHMOUD, M.I., 1994.** Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products, *Food. Technol*, Oct 94, pp 89-98.
- MANNHEIM, A., CHERYAN, M., 1990.** Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor, *J. Food. Sci*, Vol 55, N°2, pp 381-390.
- MEIRELES, M., AIMAR, P., SANCHEZ, V., 1992.** Les techniques à membranes: Micro et ultrafiltration, le technoscope de biofutur, N°111, pp 3-18.
- MOODY, G.M., BAKER, P.B., 1987.** Bioreacteurs and biotransformations, ed Elsevier Applied Science Publishers.
- MOURANCHE, A., COSTES, C., 1985.** Hydrolases et dépolymérasés: Enzymes d'intérêt industriel, ed Gauthier- Villars.
- NAJARIAN, S., BELHOUSE, B.J., 1996.** Effet of liquid pulsation on protein fractionation using ultrafiltration processes, *J. Membrane. Sci*, Vol 114, pp 245-253.
- NAU, F., KERHERVE, F.L., LEONIL, J., DAUFIN, G., 1995.** Selective separation of tryptic β -casein peptides through ultrafiltration membranes: Influence of ionic interactions, *Biotech. Bioeng*, Vol 46, N°3, pp 246-253.
- NOVO INDUSTRIES, 1981.** Blood hydrolysates, *Research Disclosure*, August 81, pp 322-323.
- NUMATA, M., YAMADA, H., YUUKI, S., MIYAGUSHI, Y., NAKAMURA, T., 1992.** Propriétés d'hydrolysats d'hématies de porc comme source de peptone pour les milieux de culture pour bactéries, *Nippon Shokuhin Koguo Gakkaishi*, Vol 39, N°2, pp 142-150.

- OELLINGRATH, I.M., SLINDE., 1988.** Sensory evaluation of rancidity and off flavor in frozen stored meat loaves fortified with blood, *J. Food. Sci*, Vol 53, N°3, pp 967-968.
- PELMONT, J., 1989.** Les enzymes, ed Presse universitaire de Grenoble.
- PIOT, J.M., 1989.** Contribution à l'étude de la production et de la résolution d'un hydrolysats d'hémoglobine bovine: Applications, Thèse Docteur d'état en sciences physiques, Compiègne.
- PIOT, J.M., GUILLOCHON, D., LECONTE, D., THOMAS, D., 1988.** Application of ultrafiltration to the preparation of defined hydrolysates of bovine hemoglobin, *J. Chem. Tech. Biotechnol*, Vol 42, pp 147-146.
- PIOT, J.M., GUILLOCHON, D., THOMAS, D., 1988.** Size-exclusion and high-performance liquid chromatography separation of peptides from peptic hemoglobin hydrolysates obtained by ultrafiltration, *chromatographia*, Vol 25, N°4, pp 307-312.
- PIOT, J.M., ZHAO, Q., GUILLOCHON, D., DHULSTER, P., RICART, G., THOMAS, D., 1990.** Semi- preparative purification and characterization of peptides from complex haemoglobin hydrolysate by HPLC- Mass spectrometry, Vol 30, N°3/4, pp 205-210.
- PUNIDADAS, P., DECLoux, M., TRYSTRAM, G., 1990.** Microfiltration tangentielle sur membrane minérale en céramique: Application au traitement du sucre roux, I.A.A.
- QUAGLIA, B.G., MASSACI, A., 1982.** Proteolysates from slaughter- house blood, *J. Sci. Food. Agric*, Vol 33, N°7, pp 634-637.
- QUEBRIAC, O., BOURGEOIS, C.M., 1985.** Valorisation du sang animal, ed Apria.
- RAO, H.G.R., GRANDISON, A.S., LEWIS, M.J., 1994.** Flux pattern and fouling of membranes during ultrafiltration of some dairy products, *J. Sci. Food. Agric*, Vol 66, pp 563-571.
- RIOS, G.M., RAKOTOARISOA, H., TARODOPE LA FUENTE, B., 1988.** Basic transport mechanisms of ultrafiltration in the presence of an electric field, *J. membrane. Sci*, Vol 38, pp 147-159.
- RODIER, J., 1984.** Analyse de l'eau, 7^{ème} ed.
- SATO, Y., HAYAKAWA, S., HAYAKAWA, M., 1981.** Preparation of blood globin through carboxy methyl cellulose, *J. Food. Technol*, Vol 19, pp 81.
- SCRIBAN, R., 1988.** Biotechnologie, 3^{ème} ed Technique et documentation.

- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M., 1994.** Analysis of protein hydrolysates: 1- Use of poly (2- hydroxyethylas partamide)- Silica Column in size exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates, *J., Agric. Food. Chem.*, Vol 42, pp 2778-2782.
- SILVESTRE, M.P.C., HAMON, M., YVON, M., 1994.** Analysis of protein hydrolysates: 2- Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method, *J., Agric. Food. Chem.*, Vol 42, pp 2783-2789.
- SLINDE, E., 1987.** Color of back salami sausage: Dissociation of heme from myoglobin and hemoglobin, *J. Food. Sci.*, Vol 52, N 5, pp 1152-1153.
- STACHOWICZ, K.J., ERIKSSON, C.E., TJELLE, S., 1977.** Enzymic hydrolysis of ox- blood hemoglobin, *enzymes in food and beverage processing*, Vol 47, pp 295-303.
- SUROWKA, K., FIK, M., 1992.** Studies of the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: 1- An application of neutrase to the production of protein hydrolysate, *Intern. J. Food. Sci. Technol.*, Vol 27, pp 9-20.
- TODISCO, S., CALABRO, V., IORIO, G., 1992.** Pectin hydrolysis in an enzyme membrane reactor a theoretical and experimental analysis, Vol 6, N°22, pp 411-417.
- TSANGARIS, D.M., BALTZIS, B.C., 1996.** Evaluation of batch and semi-batch reactor operation for enzymatic reactions with inhibitory kinetics, *Chem. engin. Sci.*, Vol 51, N°11, pp 2757-2762.
- TYBOR, P.T., DILL, C.W., LANDMANN, W.A., 1973.** Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray dried blood protein concentrates, *J. Food. Sci.*, Vol 38, pp 4-6.
- TYBOR, P.T., DILL, C.W., LANDMANN, W.A., 1975.** Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process, *J. Food. Sci.*, Vol 40, pp 155-159.
- VAN DER HORST, H.C., 1995.** Fouling of organic membranes during processing of dairy liquids, *Fouling and cleaning in pressure driven membrane process*, *Int. dairy. fed.*, pp 36-52.
- WATERS ACCQ. TAG, 1993.** Amino acid analysis system, N°154.

- WISMER- PEDERSEN, J., 1988.** Use of haemoglobin in foods - A review, *Meat science*, Vol 24, pp 31-45.
- YON, J., 1969.** *Structure et dynamique conformationnelle des protéines*, ed Hermann, Paris.
- ZARKADAS, C.G., YU, Z., ZARKADAS, G.C., MINERO- AMADOR, 1995.** Assessment of the protein quality of beef stock bone isolates for use as an ingredient in meat and poultry products, *J. Agric. Food. Chem*, Vol 43, pp 77-83.
- ZAYAS, Y., ZYRINA, L., SOLOKOV, S., 1975.** A physical method of imparting lighter colour to blood using thin layer emulsification with fat and milk protein plant protein, *Myasnaya Industriya*, N°1, pp 20-25.

ANNEXES

ANNEXE 1

Méthode de KJELDAHL pour le dosage des protéines :

La méthode de Kjeldahl permet de doser le pourcentage d'azote total. Elle s'effectue en trois étapes :

1) - Une Minéralisation : A la prise d'essai de masse m_e est ajouté un catalyseur de minéralisation avec 10 ml d'acide sulfurique concentré, le mélange est chauffé d'abord doucement puis plus fortement avec agitation.

Le chauffage est arrêté quand le mélange devient limpide.

2) - Une Distillation : L'extrémité du condenseur est placée dans un erlenmeyer de 150 ml contenant 25 ml d'acide borique.

Le contenu du matras est versé dans le réservoir de distillation avec quelques gouttes de phénolphtaleine, le robinet ouvert, le réservoir est rincé.

On ajoute 23 ml de lessive de soude (15N), la distillation est effectuée pendant 5 minutes.

3) - Le titrage : L'extrémité du réfrigérant est rincé, le mélange échantillon et réactifs est titré à l'acide sulfurique (N/50) jusqu'à coloration rose mauve.

Le pourcentage d'azote total est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'azote total} = (d \cdot V_a \cdot 0,28 / m_e \cdot 1000) \cdot 100$$

Où d est la densité de l'échantillon à doser
 m_e est la masse de la prise d'essai en g
 V_a est le volume d'acide sulfurique (ml).

ANNEXE 2

Méthode de dosage spectrophotométrique des protéines à 280 nm :

La protéine standard utilisée est la bovine sérum albumine (BSA), une gamme de concentration de 0,1 à 1 g/l est utilisée pour le tracé de la courbe d'étalonnage (figure 88).

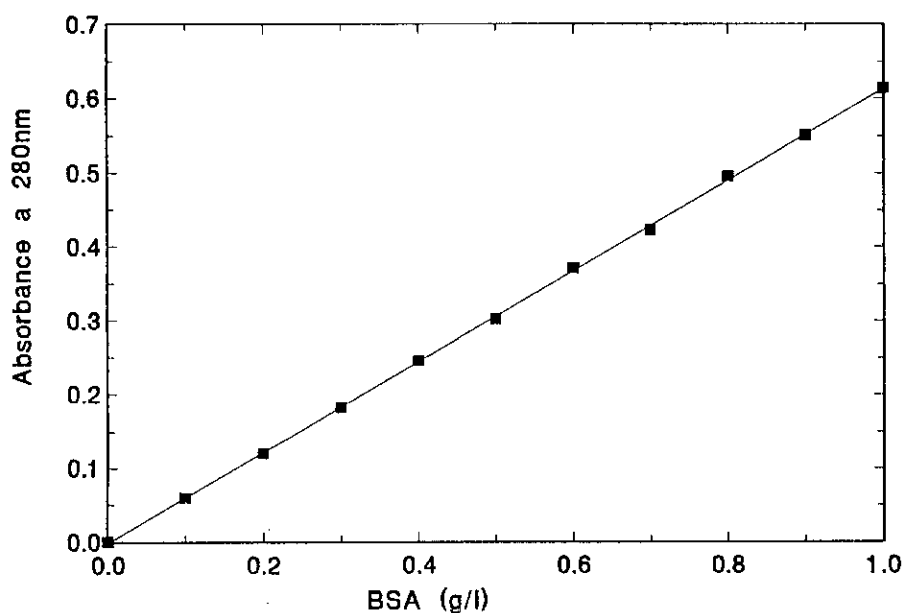


Figure 88 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines (280nm)

ANNEXE 3

Électrophorèse :

L'électrophorèse est effectuée en trois étapes :

1. Le choix du gel utilisée : Le gel de polyacrylamide à concentration variable de 10 à 15% a été sélectionné.
2. La révélation utilisée : La coloration par le nitrate d'argent permet la détection de faibles quantités de protéines.
3. Le conditionnement de l'échantillon : Les échantillons sont dilués volume à volume avec du tampon de Laemmli composé de SDS (5 μ l d'extrait pur + 10 μ l d' H_2O + 15 μ l de tampon de Laemmli) sans β - mercaptoéthanol, les protéines sont ainsi partiellement dénaturées.

Les échantillons sont portés à ébullition puis déposés sur le gel.

Le tampon de migration est un tampon SDS (0,2 M Tricine, 0,2 M tris HCl, 0,55 M S.D.S, Agarose 3%, pH 8,1).

Les différents échantillons migrent différemment suivant leur composition, les distances de migration d_m sont mesurées en mm et les poids moléculaires déduits en Dalton par l'intermédiaires d'une courbe d'étalonnage.

Cette courbe semi logarithmique représente les poids moléculaires de protéines connues en fonction des distances de migrations correspondantes (figure 89)

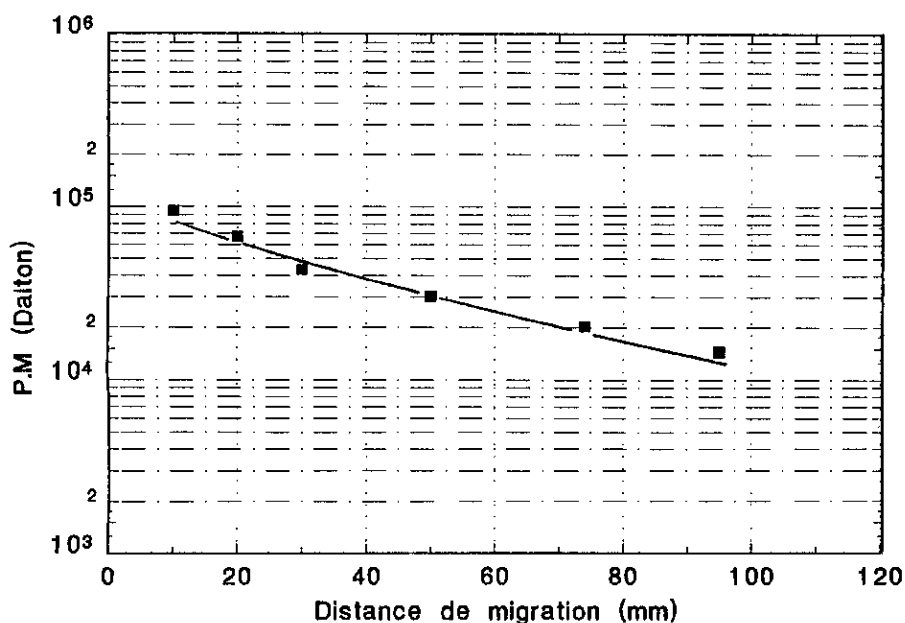


Figure 89 : Courbe d'étalonnage semi-Logarithmique pour la détermination des poids moléculaires des protéines.

LISTE DES SYMBOLES

- E : Concentration en enzyme (g/l).
S : Concentration en substrat (g/l).
S₀ : Concentration initiale en substrat (g/l).
P : Concentration en produit (g/l).
k_{cat}, k₋₁ et k₁ : Constante de vitesse (mn⁻¹).
v : Vitesse d'hydrolyse enzymatique (g/l.mn)
v_{max} : Vitesse maximale d'hydrolyse enzymatique (g/l.mn).
KM : Constante de Michaelis (g/l).
KI : Constante d'Inhibition (g/l).
K_s : Constante d'inhibition par le substrat (g/l).
β : Nombre adimensionnel.
D.H : Degré d'hydrolyse (%)
V_A, V_B : Volume d'acide et de base (l).
N_A, N_B : Normalité de l'acide et de la base (lg/l)
α_A, α_B : Degrés de dissociation moyen des fonctions acides et basiques.
M_p : Masse de protéine (g)
htot : Nombre de liaisons peptidiques dans le substrat protéique (meq/g).
V : Volume du réacteur (l).
t : Temps (h)
x : Taux de conversion.
 $t^* = \frac{V_{max} \cdot t}{K_m}$: Nombre adimensionnel.
θ : Temps de séjour moyen (h).
F : Débit (l/h).
r : Fraction soutirée du réacteur.
R : Taux de rejet (%)
C_p : Concentration en peptides dans le perméat (g/l)
C₀ : Concentration en peptides avant la traversée de la membrane (g/l).
J_v : Flux de perméat (l/h.m²)
r_p : Rayon moyen des pores (m).
e : Epaisseur de la membrane (m).
N : Nombre de pores.
Δp : Pression transmembranaire (bar).
L_p : Perméabilité à l'eau (l/h.m².bar)
D : Coefficient de diffusion (m²/s)
δ : Epaisseur de la couche de polarisation (m)
K_{SBM}, K_{CFM} : Constantes relatives aux modèles SBM et CFM de colmatage.
d : Densité du cruor
DBO₅ : Demande biologique en oxygène (mg d'O₂ / l)
A : Activité enzymatique (mole/g.mn)
A₀ : Activité enzymatique initiale (mole/g.mn)
A_r : Activité enzymatique résiduelle (%).

Rp : Rendement peptidique (%)
Qp : Débit de perméat (l/h).
Sm : Surface d'échange de la membrane (m²)
Rm, Rrev et Rirr : Résistance de la membrane (bar.h.m²/l)
 τ : Temps minimal d'hydrolyse pour atteindre un taux de conversion égal à 1 (h).
Vp : Volume du perméat (l)
Pi : Productivité instantanée en réacteur continu (g/g)
R_D : Rendement de décoloration (%)
 μ : Viscosité dynamique (Pa.s)
 $\Delta\Pi$: Pression osmotique (bar)
 ΔP_f : Pertes de charge (bar)
Qv : Débit de recirculation (l/h).
R_p : Rendement d'élimination des peptides (%)