

وزارة التربية الوطنية  
MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التخصصات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

# PROJET DE FIN D'ETUDES

## SUJET

UTILISATION DE REACTEURS  
DISCONTINUS ENZYMATIQUES  
COMBINEE A L'ULTRAFILTRATION  
LORS DU TRAITEMENT D'UN REJET  
SOLIDE DE POISSONNERIE

Proposé par :

Dr. D. MAMERT

Etudié par :

Wided-Lania Anrouche

Dirigé par

Dr. D. MAMERT

PROMOTION

Juillet 1993

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التربية الوطنية  
MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

# PROJET DE FIN D'ETUDES

## SUJET

UTILISATION DE REACTEURS  
DISCONTINUS ENZYMATIQUES  
COMBINEE A L'ULTRAFILTRATION  
LORS DU TRAITEMENT D'UN REJET  
SOLIDE DE POISSONNERIE

Proposé par :

Etudié par :

Dirigé par

Dr. D. MAMERI

Wided-Lamia Amrouche

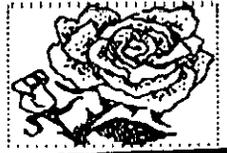
Dr. D. MAMERI

PROMOTION

Juillet 1993



## DEDICACE



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

Je dédie ce modeste travail à :

à mes très chers Déda et Bibi

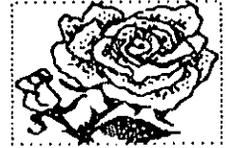
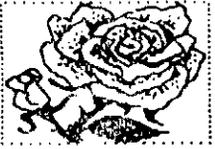
à la mémoire de Sonia

Kenza et Shimsi

ma famille

mes chers amis.

Wided.



## REMERCIEMENTS

Au terme de ce mémoire, je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance et ma sincère gratitude au *D<sup>r</sup> D. MAMERI* pour avoir proposé et dirigé ce travail avec beaucoup d'attention tant sur le plan méthodologique que pratique.

Je remercie également *D<sup>r</sup> N. MAMERI*, directeur du laboratoire de biotechnologie du département du Génie de l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique, où a été réalisé ce travail, pour son aide, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je remercie aussi les membres du jury:

<i>Dr N. MAMERI</i>	<i>Président de jury.</i>
<i>M<sup>me</sup> HELLAL</i>	<i>Examinatrice.</i>
<i>M<sup>r</sup> M.S. BENHABILES</i>	<i>Examineur.</i>
<i>M<sup>r</sup> H. GHRIB</i>	<i>Examineur.</i>

qui ont bien voulu m'honorer de leur présence et apprécier ce modeste travail.

Je tiens encore à remercier vivement:

*M<sup>r</sup> H. GHRIB* qui, malgré ses multiples tâches, a été pour moi d'une aide très précieuse pour l'élaboration de ce travail.

*M<sup>r</sup> D. ABDESSEMED* et *M<sup>r</sup> H. LOUNICI* pour les orientations et les conseils qu'ils m'ont donnés durant cette étude.

Les techniciens *MAHFOUD* et *NOUAR* pour leurs aides désintéressées.

Je renouvele enfin mes remerciements à tous ceux qui de  
prés, et particulièrement à *NADIA*, ou de loin contribué à la  
réalisation de ce mémoire.

*WIDED.*

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.1.Valeur alimentaire des poissons et importance des rejets de poissonnerie.....	4
1.1.1.Valeur alimentaire des poissons.....	4
1.1.2.Importance des rejets de poissonnerie.....	5
1.2.Etudes antérieures.....	6
1.3.Etude biochimique.....	12
1.3.1.Les acides aminés.....	12
1.3.2.Les protéines.....	12
1.3.3.Les enzymes.....	13
1.3.3.1.Généralités.....	13
1.3.3.2.Structure des enzymes.....	13
1.3.3.3.Classification des enzymes.....	14
1.3.4.Les enzymes protéolytiques.....	14
1.3.4.1.Leur origine.....	14
1.3.4.2.Leur classification.....	15
1.3.5.Exemple d'enzymes protéolytiques : "de papaine".....	16
1.3.5.1.Son origine.....	16
1.3.5.2.Sa préparation.....	16
1.3.5.3.Son analyse.....	17
1.3.5.4.Sa structure.....	17
1.3.5.5.Ses caractéristiques.....	18
1.4.Cinétique enzymatique.....	20
1.4.1.Principe de la cinétique enzymatique.....	20
1.4.2.Etablissement de l'équation des vitesses.....	20

1.4.2.1. Hypothèse de l'état stationnaire de <i>BRIGGS et HALDANE</i> .....	20
1.4.2.2. Etablissement de l'équation de MICHAELIS-MENTEN.....	21
1.4.3. Influence de la concentration en enzyme et en substrat sur la cinétique enzymatique.....	22
1.4.3.1. Influence de la concentration en enzyme.....	22
1.4.3.2. Influence de la concentration en substrat.....	22
1.4.4. Influence de divers paramètres sur l'activité enzymatique.....	25
1.4.4.1. pH.....	25
1.4.4.2. Température.....	25
1.4.4.3. Teneur en eau.....	25
1.4.4.4. Rayonnement.....	25
1.4.4.5. Effecteurs.....	25
1.5. Réacteurs enzymatiques.....	27
1.5.1. Généralités.....	27
1.5.2. Réacteurs discontinus parfaitement agités.....	27
1.5.2.1. Définition.....	27
1.5.2.1. Bilan de matière en substrat dans un réacteur discontinu.....	28
1.5.3. Réacteurs continus parfaitement agités à ultrafiltre.....	29
1.5.3.1. Définition.....	29
1.5.3.2. Bilan de matière en substrat dans un réacteur couplé à un ultrafiltre.....	29
1.6. Ultrafiltration.....	31
1.6.1. Généralités.....	31
1.6.2. Définition de l'ultrafiltration.....	32

1.6.3. Définition et caractéristiques d'une membrane d'ultrafiltration.....	33
1.6.4. Différents procédés de l'ultrafiltration.....	33
1.6.5. Principe de l'ultrafiltration.....	33
1.6.6. Mécanisme de l'ultrafiltration.....	34
1.6.7. Principales applications de l'ultrafiltration.....	37
 CHAPITRE II: ETUDE EXPERIMENTALE.....	 38
2.1. Méthode de dosage des protéines.....	38
2.2. Etude expérimentale d'une cinétique enzymatique des rejets solides de poissonnerie.....	38
2.2.1. Description du dispositif expérimental.....	39
2.2.1.1. Sa forme.....	39
2.2.1.2. Son matériau.....	39
2.2.1.3. Son agitation.....	39
2.2.1.4. Son chauffage.....	42
2.2.2. Etude de la cinétique enzymatique.....	42
2.2.2.1. Principe.....	42
2.2.2.2. Préparation des échantillons à analyser.....	43
2.2.2.3. Préparation des solutions de substrat et d'enzyme.....	43
2.2.2.4. Mode opératoire.....	45
2.3. Etude expérimentale d'une hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonnerie.....	46
2.3.1. A l'échelle laboratoire.....	46
2.3.2. A l'échelle semi-pilote.....	46
2.4. Etude du procédé d'ultrafiltration.....	48
2.4.1. Conditions opératoires en ultrafiltration.....	48
2.4.1.1. Pré-traitement de l'hydrolysate brut.....	48

2.4.1.2. Nettoyage des membranes.....	49
2.4.2. Description du dispositif expérimental.....	50
2.4.3. Description de la membrane.....	50
2.4.4. Mode opératoire.....	50
2.4.4.1. Etablissement de la courbe de solvant.....	50
2.4.4.2. Etablissement de la courbe de polarisation.....	51
 CHAPITRE III: RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATION....	52
3.1. Etude de la cinétique enzymatique.....	52
3.1.1. Evolution de la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps de réaction.....	52
3.1.2. Evolution de la vitesse initiale de réaction en fonction de la quantité en enzyme.....	56
3.1.3. Evolution de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration initiale en substrat...	58
3.1.4. Evolution de la vitesse initiale de réaction en fonction de l'inverse de la concentration initiale en substrat.....	61
3.1.5. Evolution de l'inverse de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration initiale en substrat.....	63
3.2. Etude de l'hydrolyse enzymatique.....	65
3.3. Etude économique.....	69
3.4. Etude du procédé d'ultrafiltration.....	72
3.4.1. Tracé de la courbe de solvant.....	72
3.4.2. Tracé de la courbe de polarisation.....	73
3.4.3. Tracé du taux de rejet observé en fonction de la pression transmembranaire.....	75

CONCLUSION .

BIBLIOGRAPHIE .

ANNEXE .

GLOSSAIRE .

## ABBREVIATIONS

ED: Électrodialyse.

D : Dialyse.

OI: Osmose inverse.

UF: ultrafiltration.

MF: microfiltration.

F : filtration.

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Depuis le début des années 70, l'analyse des statistiques de la pêche a laissé apparaître une chute du taux d'expansion de la production mondiale due d'une part à l'effondrement spectaculaire de certaines pêcheries et d'autre part au caractère limite des ressources halieutiques; ainsi, la valorisation des produits de la pêche apparaît comme un moyen efficace et complémentaire pour une meilleure utilisation des ressources marines impliquant une prise de conscience collective face à l'importance du gaspillage actuel [1].

Cette valorisation des déchets des industries de transformation des produits de la pêche consistera en la préparation et en la fabrication de:

- La chair de poisson hachée: "*Minced fish*" destinée à la consommation humaine comme le Surimi: chair de poisson broyée, lavée, conservée et congelée en présence d'agents cryoprotecteurs [2], alors que le produit secondaire composé d'arêtes broyées, d'écailles et d'autres substances non consommables par l'homme constitue un complément protéique pour l'alimentation du bétail et pour la préparation d'engrais de haute qualité.

- Farines de poisson pour l'alimentation du bétail étant donné leur richesse en protéines, par contre la production de farines de poisson destinées à l'alimentation humaine n'a été mise au

point qu'au cours des années 60, ce sont les FPC "*Fish Protein Concentrates*" pour lesquels des essais d'acceptabilité ont été favorables.

- L'huile de poisson, obtenue lors de la préparation de la farine, est utilisée dans la fabrication de la margarine pour l'alimentation humaine et de l'huile de foie de poisson source principale des vitamines A et D.

- Sauce de poisson de type "*Nuoc-mam*" obtenue par autolyse due à l'action conjointe des enzymes de poisson et des bactéries anaérobies contenues dans ses organes digestifs.

- Concentrés protéiques liquides, obtenus par ensilage, sont utilisés pour l'alimentation animale.

- Concentrés protéiques, obtenus par hydrolyse enzymatique, sont destinés à la consommation humaine comme bouillons concentrés; par contre, l'hydrolyse chimique conduit au déclassement des protéines provoquant la destruction de certains acides aminés.

- Molécules bioactives à usage industriel et pharmaceutique comme les enzymes et les antibiotiques [1].

En Algérie, malgré la faiblesse de son industrie halieutique, de grand pas ont été faits dans le domaine de la valorisation des ressources marines permettant d'une part de contribuer à la dépollution du littoral et d'autre part de

produire des substances à haute valeur nutritionnelle pour alléger la dépendance alimentaire et d'économiser par la suite des sommes considérables de devises, c'est pourquoi, l'effort de recherche doit sans cesse continuer afin de pouvoir valoriser certaines potentialités qui sont encore inexploitées.

C'est pourquoi, dans le cadre de ce modeste travail, une approche globale d'un procédé de valorisation des rejets solides de poissonnerie sera réalisée et consistera à:

- Etudier une cinétique enzymatique des rejets solides de poissonnerie pour déterminer les paramètres caractéristiques d'une enzyme commerciale d'origine végétale: la papaïne.
  
- Etudier une hydrolyse enzymatique de ces mêmes substrats et enzymes à l'échelle laboratoire puis à l'échelle semi-piloté: cette étude permet d'une part de couper les longues chaînes protéiques pour récupérer les acides aminés et les petits peptides et d'autre part de comparer entre les deux échelles.
  
- Ultrafiltrer l'hydrolysats obtenu pour séparer les acides aminés et les petits peptides de la biomasse protéique.

CHAPITRE I

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

**CHAPITRE I**  
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

**1.1. VALEUR ALIMENTAIRE DES POISSONS ET IMPORTANCE DES REJETS DE POISSONNERIE.**

**1.1.1. Valeur alimentaire des poissons.**

Les poissons sont des aliments naturels, bâtisseurs et très riches en éléments minéraux comme l'iode, le phosphore; en vitamines comme celles du groupe B, du groupe A et D contenues dans leurs foies et en protides présentant une valeur nutritionnelle qui rivalisera avec celle des viandes; de plus, leur digestibilité est caractérisée par un coefficient d'utilisation digestive dépassant 95% en nutriments absorbables (faible teneur en lipides) à l'exception des poissons dits gras comme le thon et le saumon [3].

**Tableau N°1: Comparaison entre la composition des poissons et celle des viandes maigres [3].**

Aliment	eau(%)	Protides(%)	Lipides(%)
Merlan	81	18	00,62
Sardine	73	23	02,33
Veau	71	20	08,10
Gigot de Mouton	63	17	19,00

### 1.1.2. Importance des rejets de poissonnerie.

Depuis plusieurs années, des chercheurs ont étudié des méthodes d'utilisation des rejets de poissonnerie provenant des processus de transformation ou les espèces marines impropres à la consommation humaine pour minimiser la pollution locale et pour produire des aliments à haute valeur nutritionnelle [4].

**Tableau N°2: Composition approximative caractéristique du poisson pêché au chalut [4].**

Constituants (% en poids)	Poisson entier	Partie comestible	Partie non comestible
Eau	89,9	83,6	81,2
Lipides	03,5	00,8	04,4
Protéines	12,7	15,2	11,7
Cendres	02,7	01,1	03,5

## 1.2. ETUDES ANTERIEURES.

En 1956, *MIYADA* et al [5] ont comparé l'action de neuf (9) préparations d'enzymes protéolytiques sur un muscle de boeuf et ont trouvé que la papaïne, la bromeline, la ficine, la trypsine et la rhozyme P-11 ont une activité protéolytique dans l'attendrissement des viandes.

En 1960, *HALE* [5] a mesuré les activités relatives de plus de 20 enzymes protéolytiques préparées à partir des déchets de traitement de poisson, ainsi, après 1 heure, à pH égal à 7 et à une température de 40°C, le test préliminaire montre que la ficine est la plus active au bout d'une longue période d'hydrolyse alors que dans les conditions optimales de pH et de température, les tests de 24 heures montrent que la pronase produit la plus grande activité par unité de poids et que la pepsine, la papaïne et la pancréatine ont une bonne activité.

En 1976, *YANEZ* et Coll [6]. ont réalisé une hydrolyse enzymatique de colin sous l'action d'une enzyme protéolytique: la bromelaïne afin d'étudier les propriétés chimiques et nutritives d'un concentré de protéines de poisson et ont montré l'habilité de cet hydrolysats à améliorer la qualité des protéines céréalieres comme celle du blé, du maïs et du riz après réalisation d'une série de tests biologiques sur des rats en phase de croissance; pour cela, les analyses obtenue montrent que:

- L'hydrolysats enzymatique contient environ 63% de protéines.

- Tous les acides aminés essentiels; à l'exception de la thréonine qui est en léger déficit; sont présents à des fortes teneurs comparées à celles du modèle de référence élaboré en 1973 par la F.A.O / W.H.O.

**Tableau N°3: Composition en acides aminés d'un hydrolysats enzymatique des protéines de merlu comparée au modèle standard de la FAO / WHO en g/16 g d'azote**  
[6].

Acide aminés	Hydrolysats enzymatique des protéines de poisson.	Modèle de référence de la FAO/WHO
Cystéine + Methionine	4,2	3,5
Isoleucine	4,4	4,0
Leucine	9,5	7,0
Lysine	11,8	5,5
Phenyl alanine +	6,6	6,0
Tyrosine		
Thréonine	3,7	4,0
Tryptophane	1,3	1,0
Valine	5,7	5,0
<b>TOTAL</b>	<b>47,2</b>	<b>36,0</b>

La même année, *BUCOVE et PIGOTT* [4] ont présenté une installation pilote pour la production d'un concentré protéique par hydrolyse enzymatique des rejets de poissonnerie, l'enzyme choisie: la pepsine a un pH optimal bas minimisant les problèmes de contamination bactériennes et permettant l'efficacité du processus pour lequel, l'analyse approximative de l'hydrolysats enzymatique donne: 84,6% en acides aminés; 85% en protéines et 0,8% en lipides.

En 1978, *CARROAD et TOM* [7] ont conçu un processus pour la bioconversion des déchets de chitine des crustacés en un produit protéique utilisé pour l'alimentation animale et l'aquaculture; l'enzyme choisie est la chitinase extracellulaire sécrétée par une culture de micro-organismes sélectionnés. Les résultats expérimentaux indiquent que la souche *Serratia marcescens* est entièrement appropriée, de plus, l'hydrolyse de diverses préparations de déchets de chitine montre que le filtrat de la culture bactérienne est efficace lors de la décomposition du substrat.

En 1981, *LIU et PIGOTT* [8] ont produit de la pepsine brute par autodigestion de la muqueuse stomacale du porc dans le but d'un procédé économique d'hydrolyse enzymatique de protéines de poisson et ont optimisé les conditions de la digestion enzymatique. Les résultats obtenus montrent que:

- La pepsine brute à pH égal à 1 a la plus forte activité et le moins de temps pour atteindre cette activité.

- La pepsine brute et commerciale ont une activité élevée à 62°C.

- La concentration des protéines de l'hydrolysate montre que 9% (poids de la muqueuse / poids de la chair de poisson) de la pepsine brute résulte au même degré de digestion que 1% de la pepsine commerciale.

- La muqueuse complète ou broyée est stable à 20°C pendant cinq (5) mois, alors que la pepsine commerciale se conserve à 4°C durant une dizaine de jours.

La même année, *CIVIT et Coll* [9] ont déterminé les conditions optimales de pH et de température pour une récupération maximale par coagulation de protéines et d'huiles des rejets sanguins de poissonnerie. Les résultats expérimentaux montrent que: l'ajustage du pH à 5,6 - 5,9 et l'augmentation de la température au dessus de 65°C, ne dépassant pas 75 - 80°C, conduisent à une forte réduction de la DCO mais un retard dans le processus de traitement augmente l'azote non protéique et diminue le taux de récupération des protéines et de réduction de la DCO.

En 1985, *ALMAS* [10] a procédé à une hydrolyse enzymatique sans addition d'enzymes ou à une autolyse (système enzymatique contenu dans le poisson) pour produire un concentré de protéines de poisson utilisé comme supplément dans l'alimentation animale pendant leur période de croissance et pour préparer des enzymes protéolytiques comme la pepsine à partir des viscères de morue ainsi qu'un milieu de croissance pour ces bactéries. L'autolyse donne un surnageant riche en protéines et en lipides ainsi qu'un sédiment insoluble composé de protéines non hydrolysées et de lipides, de plus, cette hydrolyse enzymatique n'est pas complète, même après des incubations de quelques mois; par conséquent, son succès est freiné au-delà du laboratoire.

## TRAVAUX DE L'EQUIPE DE BIOTECHNOLOGIE DE L'E.N.P D'ALGER.

La production d'hydrolysats enzymatiques à partir de protéines contenues dans les rejets solides de poissonnerie et l'utilisation d'une enzyme brute: la pepsine obtenue par autodigestion de la muqueuse gastrique du mouton, dans des conditions optimales préalablement déterminées, ont fait l'objet de plusieurs études.

En 1991, *FENNOUH et GAOUAR* [11] ont rapporté les résultats ci-dessous:

- Les conditions optimales de la pepsine brute sont:  
pH = 1, température = 35 à 40°C.
- La concentration finale en protéines hydrolysées au bout de 4 heures d'hydrolyse enzymatique est de 2,20 g/l.
- Les essais d'ultra-filtration ont donné un taux de récupération moyen de 80%.

En 1992, *ANNOU* [12] a montré que l'hydrolyse enzymatique est un procédé très économique et réalisable à l'échelle laboratoire; les résultats obtenus sont:

- Les conditions optimales de la pepsine brute sont:  
pH = 2, température = 50°C.

- Le taux d'hydrolyse, après 4 heures d'hydrolyse enzymatique, est de 70%

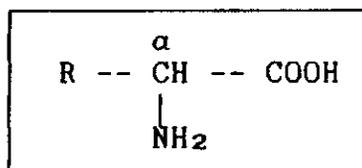
La même année, *BENHABLES* [13] a montré que le changement d'échelle allant du laboratoire au semi-pilote a entraîné une chute du taux d'hydrolyse, variant de 83% à 63% due à la complexité du processus et à la difficulté de la maîtrise des divers paramètres intervenant au cours de l'hydrolyse enzymatique à l'échelle semi-pilote.

En ce qui concerne les analyses bactériologiques des rejets solides de poissonnerie recueillis à la conserverie de *DELLYS* celles-ci ont révélé une très forte contamination d'origine fécale.

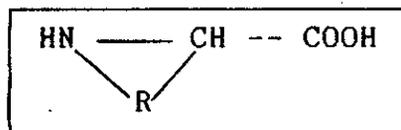
### 1.3. ETUDE BIOCHIMIQUE.

#### 1.3.1. Les acides aminés.

La formule générale des acides aminés est:



à l'exception de la proline qui est un acide iminé ayant la structure suivante:



Ce sont des acides carboxyliques ayant une fonction primaire sur l'atome de C appelé carbone  $\alpha$  porteur du groupement carboxylique, ces composés organiques se distinguent entre eux par la nature de R qui représente un groupement varié de nature cyclique ou aliphatique [14]. Les acides aminés indispensables à l'homme ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme lui même mais sont apportés par l'alimentation et sont en nombre de huit (8): l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phenylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine [15].

#### 1.3.2. Les protéines.

Une protéine est un édifice compact, de structure tridimensionnelle définie et constituée fondamentalement d'acides aminés [16].



partie non protéique qui est une molécule organique relativement petite: la coenzyme, ce cofacteur nécessaire à l'activité catalytique est lié fortement à la protéine [16].

### 1.3.3.3. Classification des enzymes:

Leur classification a été proposée par la commission de l'Union Internationale de Biochimie en 1961; ainsi, les enzymes ont été classées selon le type de réaction catalysée comme suit [15]:

Tableau N°4: Classification des enzymes [15].

Enzymes	Réactions catalysées
Oxydoréductases	Catalysent les réactions d'oxydo-réduction.
Transférases	Catalysent les réactions des radicaux ou des groupements.
Isomérases	Catalysent les réactions d'isomérisation.
Hydrolases	Catalysent la rupture des liaisons avec fixation de molécules d'eau.
Lyases	Catalysent la rupture des liaisons C-C, C-N C-O, C-S avec formation de doubles liaisons
Ligases ou Synthétases	Catalysent la condensation de 2 molécules couplées avec rupture d'une liaison pyrophosphate de l'ATP.

### 1.3.4. Les enzymes protéolytiques:

#### 1.3.4.1. Leur origine:

Les enzymes protéolytiques ont une origine:

- végétale: comme la papaïne en provenance d'une plante équatoriale et tropicale: *Carica papaya*; la ficine issue de la figue: *Ficus carica*; la broméline extraite de l'ananas: *Ananas comosus merr* [17].

- Animale: comme la chymosine ou la presure qui est une enzyme du suc gastrique extraite de l'estomac des ruminants; la pepsine obtenue par autodigestion de la muqueuse stomacale du mouton ou extraite de l'estomac du porc et plus récemment du boeuf; la pancréatine qui est un mélange de protéases du pancréas animal [18].

- Microbienne: les enzymes se préparent au stade de l'industrie des fermentations; il en découle: les protéases neutres utilisées en tannerie, en brasserie et en boulangerie; les protéases alcalines employées dans l'industrie des lessives; les protéases acides succédanées de la presure qui provoque la coagulation du lait [18].

#### **1.3.4.2. Leur classification:**

Les protéases sont des catalyseurs qui dégradent les protéines en acides aminés en détruisant les liaisons peptidiques des protéines, elles se distinguent suivant:

\* **Le critère de localisation des enzymes:** Les enzymes extracellulaires sont directement sécrétées à l'extérieur de la cellule dans le milieu de culture comme la pepsine, la trypsine; les enzymes intracellulaires restent confinées à l'intérieur de la cellule comme les cathepsines [19].

\* **Le critère de substrat:** Les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques situées au bout des chaînes peptidiques; les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques situées

à l'intérieur des chaînes polypeptidiques comme la pepsine, la papaïne [19].

### 1.3.5. Exemples d'enzymes protéolytiques:

" La papaïne (E.C. 3.4.22.2)":

#### 1.3.5.1. Son origine:

Le papayer ou l'arbre à melons est une culture répandue dans les régions équatoriales et tropicales et toutes ses parties comme la tige, les feuilles, les fruits produisent du latex riche en papaïne brute qui est un mélange de 3 enzymes protéolytiques: la papaïne, la chymopapaïne et le lysozyme dont les concentrations respectives sont de 10%, 45% et 20% [17].

#### 1.3.5.2. Sa préparation:

Le latex, obtenu en incisant les fruits ou les papayer avant maturité, est recueilli et transporté au lieu de stockage et de séchage sur des tamis à l'air libre donnant des produits purifiés obtenus par précipitation de l'enzyme à partir de la solution aqueuse préalablement clarifiée mais entraînant une forte perte de l'activité enzymatique due à son oxydation au cours de l'opération de séchage [17].

En ce qui concerne, la préparation de la papaïne industrielle pure et raffinée, elle a été mise au point en 1969-1970 par *BOUDART* au Zaïre puis en 1974 par *JONES* et *MERCIER* et en 1979 par *CAY GILLE*, dans ce cas, le latex frais contenant 12% en poids de papaïne, est stocké à froid, agité, dilué, centrifugé, filtré sur du *Kiesselguhr* et des plaques stérilisantes pour

l'élimination des impuretés puis atomisé sous vide à 50°C donnant ainsi une poudre de couleur blanche [17].

De nos jours, des préparations standardisées de papaïne sont utilisées soit sous forme solide, soit sous forme liquide: le pasol où l'agent diluant et stabilisant est le sorbitol [20].

#### 1.3.5.3. Son analyse:

La constitution de la papaïne industrielle peut être déterminée au moyen de:

- L'électrophorèse sur l'acétate de cellulose qui met en évidence la chymopapaïne: la plus abondante et la papaïne stricto sensu: une protéine à groupe sulfhydryle à 211 résidus d'acides aminés et à poids moléculaire de 23.000 Daltons.

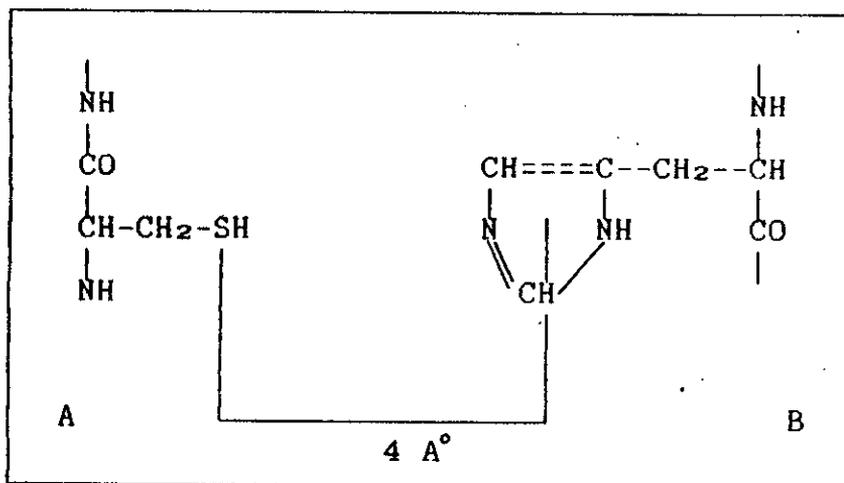
- La chromatographie qui met en évidence la papaïne stricto sensu, la chymopapaïne A, la chymopapaïne B, une peptidase et un lysozyme: une enzyme bactéricide [17].

#### 1.3.5.4. Sa structure:

Dans cette enzyme végétale, la chaîne polypeptidique est repliée en deux parties distinctes A et B séparées par une cavité; la partie B comporte une région centrale fortement hydrophobe constituée par un rassemblement de 12 à 14 chaînes latérales comportant des résidus d'acides aminés comme la leucine, l'isoleucine, la valine et la phenylalanine; par contre, la partie A contient quelques liaisons salines

intramoléculaires, notamment entre  $\text{-COO}^-$  et  $\text{-NH}_3^+$  du groupement guanidique des résidus arginyles.

Sur les bords de la cavité, la cystéine en position 25 sur la partie A de la molécule est en regard de l'histidine en position 158 sur la partie B à une distance de  $4\text{Å}$  qui est mesurée entre l'atome de S et le noyau imidazole de l'histidine; de plus, cette zone de la molécule représente la partie active lors de la catalyse enzymatique [21]:



#### 1.3.5.5. Ses caractéristiques:

- La papaïne est une protéase à cystéine, qui est un acide aminé à groupement  $\text{-SH}$  contenu dans son site actif, nécessite une utilisation et une analyse dans un milieu essentiellement réducteur sulfhydryl pour protéger son groupement  $\text{-SH}$  et exige la présence du groupe  $\text{-SH}$  pour exercer son activité protéolytique [20] mais elle est facilement inhibée par les thiols, les oxydants y compris l'oxygène atmosphérique et les métaux lourds entraînant la destruction des radicaux  $\text{-SH}$  et l'apparition de salissures comme les poussières, les bactéries [17].

- La papaïne est une endopeptidase qui hydrolyse les liaisons peptidiques donnant les résidus suivants:

l'arginine et la lysine qui sont des acides aminés possédant deux groupements basiques; de plus, elle reconnaît son substrat peptidique sur une longueur de sept (7) acides aminés et intervient de préférence au voisinage d'une chaîne de phenylalanine pour la coupure [22].

- La papaïne est une protéine très stable, à large spécificité et résistante à la dénaturation par les solvants organiques [22].

- La papaïne industrielle se caractérise par un optimum de température de 50 à 65°C, par une bonne thermostabilité et une fourchette de pH de 5 à 7, ce qui facilitera sa grande utilisation en technologie comme en brasserie en tant que stabilisant de la bière; dans les industries de la viande: l'attendrissement de la viande de boucherie se fait soit par immersion dans un bain de papaïne avant la surgélation, soit par injection d'une solution de papaïne au moment de l'abattage; dans la fabrication d'hydrolysats de poisson et dans l'industrie pharmaceutique [17].

## 1.4. CINÉTIQUE ENZYMATIQUE.

### 1.4.1. Principe de la cinétique enzymatique:

La cinétique enzymatique est basée sur trois (3) principes:

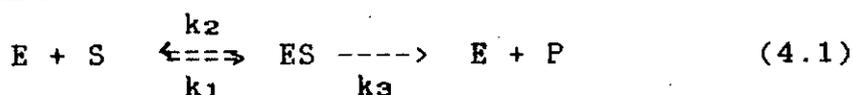
- Le substrat S forme avec l'enzyme E un complexe intermédiaire transitoire ES qui résulte d'une complémentarité de structure entre le site actif de l'enzyme et la molécule de substrat.

- La vitesse de la réaction est représentée par le pente de la tangente à la courbe: apparition du produit ou disparition du substrat en fonction du temps.

- La quantité d'enzyme doit être de faible concentration comparée à la concentration du substrat pour que la formation du complexe enzyme-substrat ES ne modifie pas la concentration du substrat [17].

### 1.4.2. Etablissement de l'équation des vitesses:

La catalyse enzymatique peut être décrite comme suite:



où  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_3$  sont les constantes de vitesse.

#### 1.4.2.1. Hypothèse de l'état stationnaire de *BRIGGS et HALDANE*:

Ils ont postulé un état stationnaire pour lequel la vitesse de formation du complexe ES est égale à sa vitesse de décomposition:

$$k_1 [E] [S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad (4.2)$$

De plus la quantité totale d'enzyme  $E_T$  mise dans le milieu réactionnel se répartit en une fraction libre  $E$  et une fraction complexe  $ES$ :

$$[E_T] = [E] + [ES] \quad (4.3)$$

et la vitesse de formation des produits est donnée par:

$$v = k_3 [ES] \quad (4.4)$$

#### 1.4.2.2. Etablissement de l'équation de *MICHAELIS* et *MENTEN*:

Lorsque la concentration en substrat devient faible, la vitesse initiale tend vers la vitesse maximale égale à:

$k_3 [E_T]$ , l'enzyme se trouve entièrement sous forme  $ES$  et l'équation de *MICHAELIS* - *MENTEN* est:

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{k_m + [S]} \quad (4.5)$$

avec  $k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$

Lorsque  $v = 1/2 v_{\max}$  alors  $k_m = [S]$ .

De plus, *LINEWEAVER* et *BURK* ont proposé une représentation linéaire de l'équation:

$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (4.6)$$

La représentation graphique de  $1/v = f(1/S)$  (voir figure N°1) est une droite de pente  $k_m/V_m$ , d'ordonnée à l'origine  $1/V_m$  et coupant l'axe des abscisses au point  $-1/K_m$  [17].

#### 1.4.3. Influence de la concentration en enzyme et en substrat sur la cinétique enzymatique:

##### 1.4.3.1. Influence de la concentration en enzyme:

L'évolution de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en enzyme montre une linéarité aux faibles concentrations en enzymes mais au-delà d'une certaine concentration en enzyme, la totalité du substrat se trouvera sous forme de complexe et la vitesse de réaction deviendra constante (voir figure N°2) [23].

##### 1.4.3.2. Influence de la concentration en substrat:

L'évolution de la vitesse en fonction de la concentration en substrat montre une augmentation rapide de la vitesse de réaction mais si la concentration en substrat continue à croître, la courbe s'infléchit et pour des valeurs élevées en substrat, la vitesse de réaction tendra asymptotiquement vers une valeur maximale (voir figure N°3) [23].

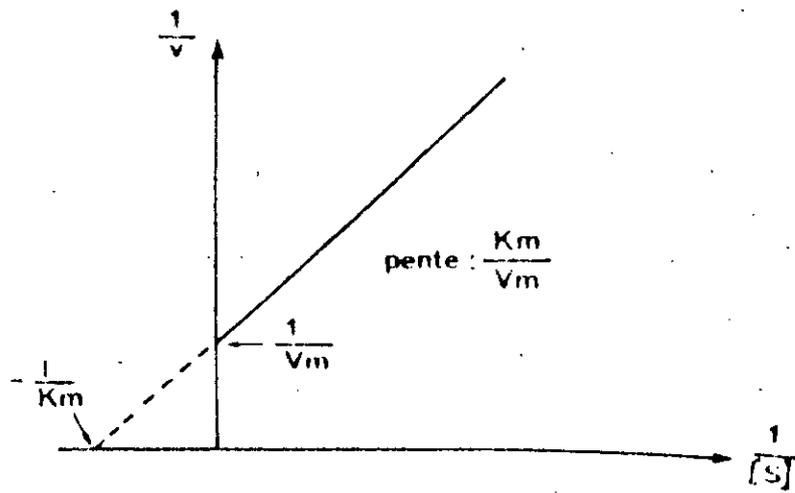


Figure N°1: Représentation de LINEWEAVER et BURK.

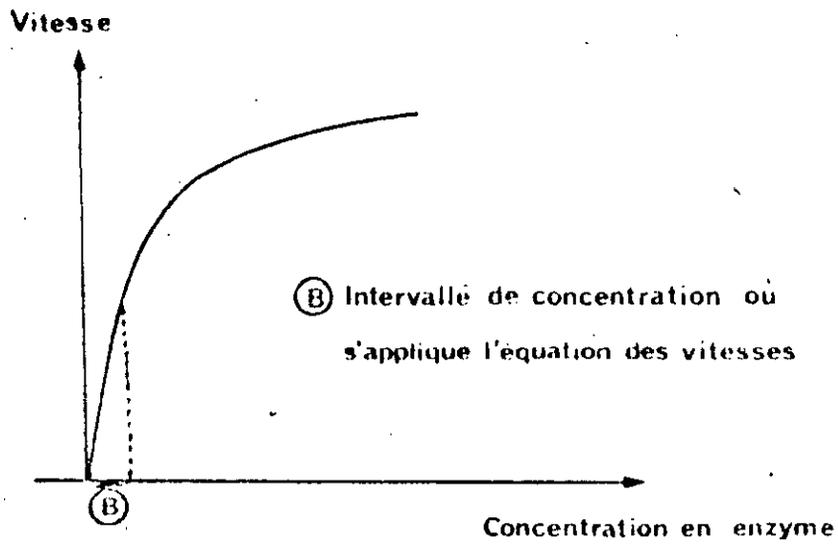


Figure N°2: Influence de la concentration en enzyme sur la réaction enzymatique [17].

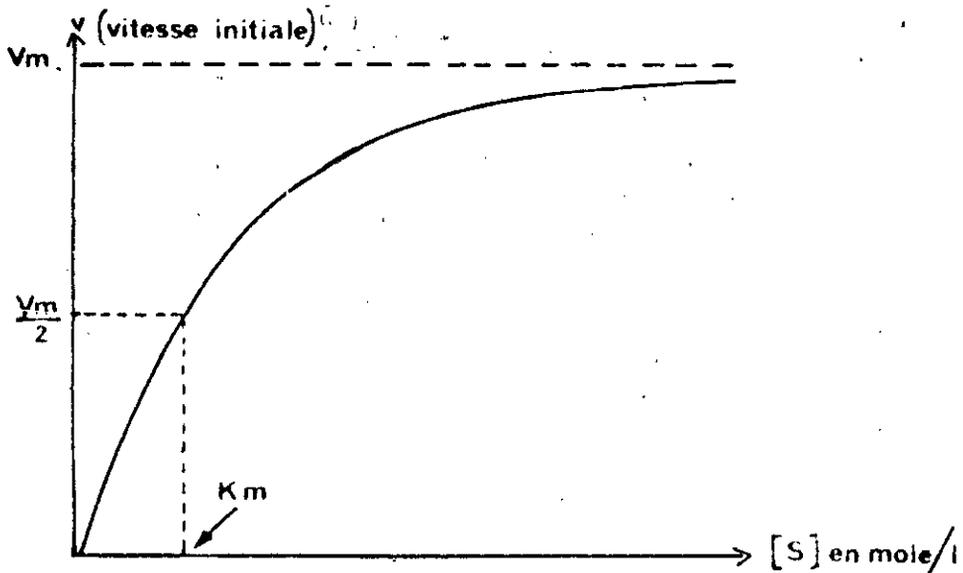


Figure N°3: Influence de la concentration en substrat sur la réaction enzymatique [17].

#### 1.4.4. Influence de divers paramètres sur l'activité enzymatique:

1.4.4.1. pH: Une variation importante du pH entraînera une altération dans la conformation de la structure de la protéine et une ionisation des sites actifs [17].

1.4.4.2. Température: L'activité enzymatique augmentant avec la température entraînera l'accroissement de la vitesse de la réaction enzymatique ainsi que celle de la dénaturation thermique de l'enzyme [17].

1.4.4.3. Teneur en eau: Il a été observé, malgré les faibles teneurs en eau, des dégradations enzymatiques conduisant à l'apparition d'odeur ou de goût désagréables [17].

1.4.4.4. Rayonnement: Les rayonnements ont une action dénaturante provoquant des ruptures de liaisons comme la rupture des liaisons peptidiques ou modifiant les caractéristiques physiques du milieu [17].

1.4.4.5. Effecteurs: L'activité enzymatique peut être modifiée par des constituants appelés effecteurs: - les activateurs conduisent à un accroissement de l'activité enzymatique - les inhibiteurs diminuent la vitesse de la transformation enzymatique et les types d'inhibitions rencontrés sont [17]:

- i) Inhibition compétitive: L'inhibiteur de structure chimique et spatiale analogue au substrat vient se loger sur le site actif de l'enzyme empêchant la fixation du substrat et

entraînant une association: enzyme-inhibiteur exclusive [17];  
la vitesse de réaction est donnée par:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_m} + \frac{k_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{1}{[S]} \quad (4.7)$$

où:  $K_I$  est la constante de dissociation.

- ii) **Inhibition incompétitive**: C'est une inhibition par blocage du complexe ES en supposant l'existence de deux sites de fixation sur l'enzyme, l'un pour le substrat et l'autre pour l'inhibiteur [17]; la vitesse de réaction est donnée par:

$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \quad (4.8)$$

- iii) **Inhibition non compétitive**: L'inhibiteur se lie indifféremment à l'enzyme libre ou au complexe enzyme-substrat sur un site lui étant propre [17]; la vitesse de réaction est donnée par:

$$\frac{1}{V} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \left(\frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]}\right) \quad (4.9)$$

- iiiii) **Inhibition par le substrat**: Lorsque le substrat est présent en forte concentration, la vitesse de la réaction enzymatique peut diminuer par suite de l'interaction entre le substrat et le complexe ES [17], la vitesse de réaction est donnée par:

$$\frac{1}{V} = \frac{k_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} + \frac{1}{K_I \cdot V_m} \cdot [S] \quad (4.10)$$

## 1.5. REACTEURS ENZYMATIQUES:

### 1.5.1. Généralités:

Un grand nombre de procédés industriels, essentiellement dans le domaine agro-alimentaire, utilisant des enzymes en solution, grossièrement purifiées et assurant la conversion enzymatique dans un réacteur parfaitement agité dans lequel le substrat et la préparation enzymatique sont initialement introduits [24].

De plus, la formule globale de la conservation de la matière dans un réacteur est définie par:

flux d'entrée + flux de création = flux de sortie + flux d'accumulation + flux de disparition.

Ou en général, le flux de création est supposé être égal à 0, donc:

flux d'entrée = flux de sortie + flux d'accumulation + flux de disparition.

### 1.5.2. Réacteurs discontinus parfaitement agités:

#### 1.5.2.1. Définition:

Dans un réacteur fermé (*Batch*), les substrats et les biocatalyseurs sont initialement introduits dans le réacteur; au cours de la réaction, il n'y a ni ajout des substrats, ni soutirage des produits [17].

### 1.5.2.2. Bilan de matière en substrat dans un réacteur

discontinu:

Flux d'entrée = 0 (pas d'alimentation).

Flux de sortie = 0 (pas de soutirage).

Flux d'accumulation =  $V \cdot dS$

où  $V$  est le volume du réacteur supposé constant;  $dS$  est la variation de la concentration du substrat.

Flux de disparition =  $v \cdot dt \cdot V$

où  $v$  est la vitesse de la consommation du substrat;  $dt$  est la variation du temps.

Dans le cas où la transformation est régie par une loi cinétique de *MICHAELIS-MENTEN*, l'équation caractéristique obtenue après intégration est:

$$v_{\max} \cdot t = x S_0 + k_m \text{Log} \left( \frac{1}{1-x} \right) \quad (5.1)$$

où:

$x$  est le taux de conversion instantané du substrat égal à:

$$x = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (5.2)$$

### 1.5.3. Réacteurs continus parfaitement agités à ultrafiltre:

#### 1.5.3.1. Définition:

Dans cette configuration, les enzymes et les substrats sont continuellement recyclés dans le bioréacteur avec un soutirage en continu d'un perméat ne contenant que les produits de réaction [17].

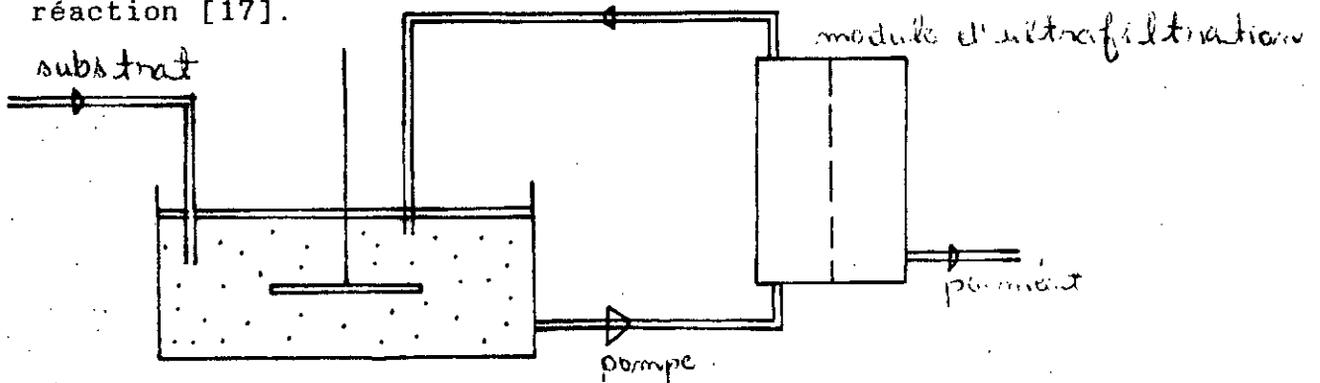


Figure N°4: Réacteur continu avec recyclage [24]:

#### 1.5.3.2. Bilan de matière en substrat dans un réacteur couplé à un ultrafiltre:

$$\text{Flux d'entrée} = F_e \cdot S_0 \cdot dt + a \cdot F_s \cdot S \cdot dt \quad \text{où}$$

$F_e$  est le débit d'entrée.

$S_0$  est la concentration initiale du substrat.

$a$  est la fraction de  $F_s$  recyclée.

$F_s$  est le débit de sortie.

$S$  est la concentration du substrat.

$$\text{Flux de sortie} = F_s \cdot S \cdot dt$$

$$\text{Flux de disparition} = v \cdot dt \cdot V$$

$$\text{Flux d'accumulation} = V \cdot dS$$

De plus, le débit d'entrée dans le réacteur est égal au débit de sortie du réacteur:  $a.F_s + F_e = F_s$  (5.3).

Pour une loi cinétique de type *MICHAELIS-MENTEN* et en régime permanent, l'équation caractéristique est:

$$v_{\max} \cdot \theta = x \cdot S_0 + k_m \cdot \frac{x}{1-x} \quad (5.4)$$

$\theta$  est le temps de séjour moyen dans le réacteur égal à:

$$\theta = \frac{V}{F_e} \quad (5.5)$$

## 1.6. ULTRA FILTRATION.

### 1.6.1. Généralités:

Les techniques à membrane sont des opérations de base pour lesquelles diverses industries peuvent avoir recours dans le but de concentrer, de séparer, de purifier et même de stériliser [25].

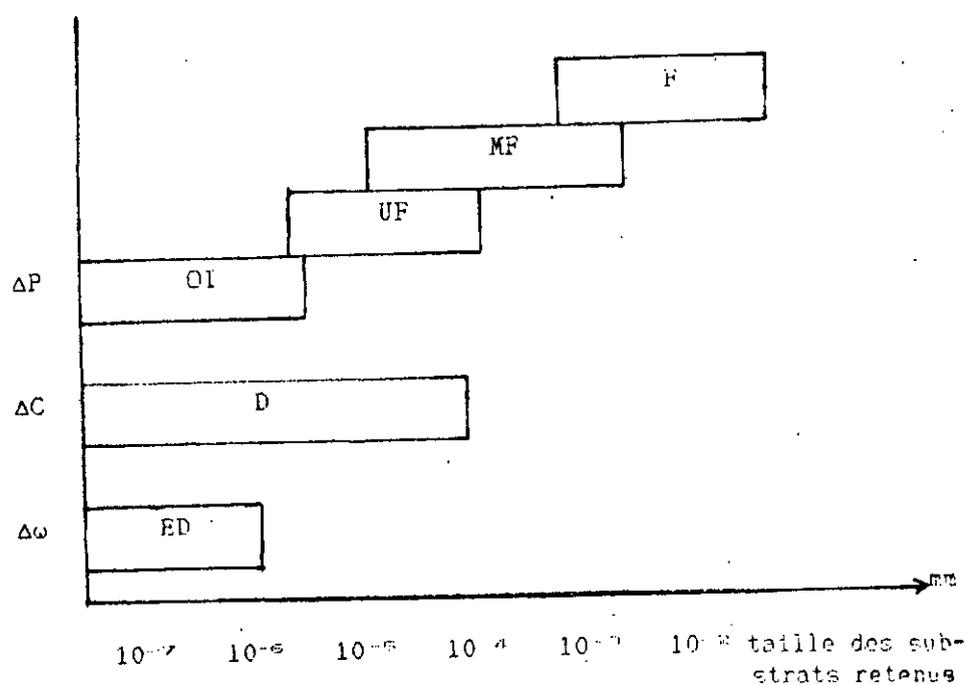


Figure N°5: Techniques à membrane en fonction de la taille des substrats retenus [25].

### 1.6.2. Définition de l'ultrafiltration:

L'ultrafiltration est un procédé physique de séparation mécanique qui utilise à basse pression (ne dépassant pas 10 Bars) les propriétés de tamisage moléculaire d'une membrane poreuse [26].

Après le passage à travers la membrane d'ultrafiltration, deux solutions sont obtenues:

- l'une passée au travers de la membrane est appelée le perméat ou l'ultrafiltrat qui en plus du solvant (eau) contient les éléments dissous ayant un diamètre moléculaire inférieur au diamètre des pores de la membrane.

- l'autre retenue par la membrane est appelée le retentat qui est enrichi par rapport à la solution initiale en constituants ayant un diamètre moléculaire supérieur au diamètre des pores de la membrane [26].

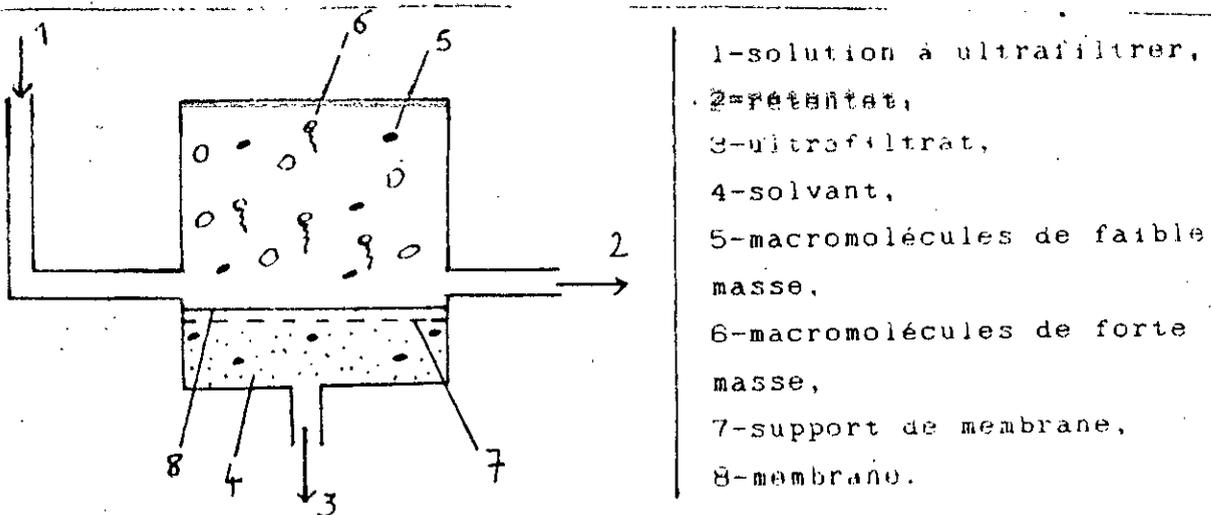


Figure N°6: Principe de l'ultrafiltration [26]:

### 1.6.3. Définition et caractéristiques d'une membrane

#### d'ultrafiltration:

Une membrane d'ultrafiltration est l'élément essentiel de la technique d'ultrafiltration, elle présente une structure asymétrique constituée de deux couches superposées: l'une de 0,1 à 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur représentant une pellicule semi-perméable et l'autre plus poreuse de 100 à 200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur représentant le support de cette pellicule; ainsi, l'avantage de cette structure réside dans la rétention des particules à séparer à la surface de la membrane et dans l'isotropie de cette surface [25].

### 1.6.4. Différents procédés de l'ultrafiltration:

Le procédé de l'ultrafiltration peut se faire suivant:

- **Le mode continu:** utilisé dans les grandes unités dans le but d'éviter les stockages importants, dans ce cas, la charge doit être introduite dans la boucle de recirculation à un débit égal à la somme des débits du perméat et du retentat et à une concentration constante dans la boucle [27].

- **Le mode discontinu:** utilisé dans les petites unités pour le traitement des solutions diluées ou concentrées [27].

### 1.6.5. Principe de l'ultrafiltration:

Les techniques à membrane sont établies sur le transfert partiel d'une solution à travers une membrane qui s'oppose au passage des constituants dont la taille est supérieure à celle de ses pores; pour cela, une membrane est caractérisée par son seuil de coupure ou son "cut off" défini comme étant la masse

molaire en Daltons correspondant à une rétention pratiquement totale comprise généralement entre 0,9 et 1 [28]; en ultrafiltration, le seuil de coupure des membranes varie de 1.000 à 500.000 en masse moléculaire des substances retenues

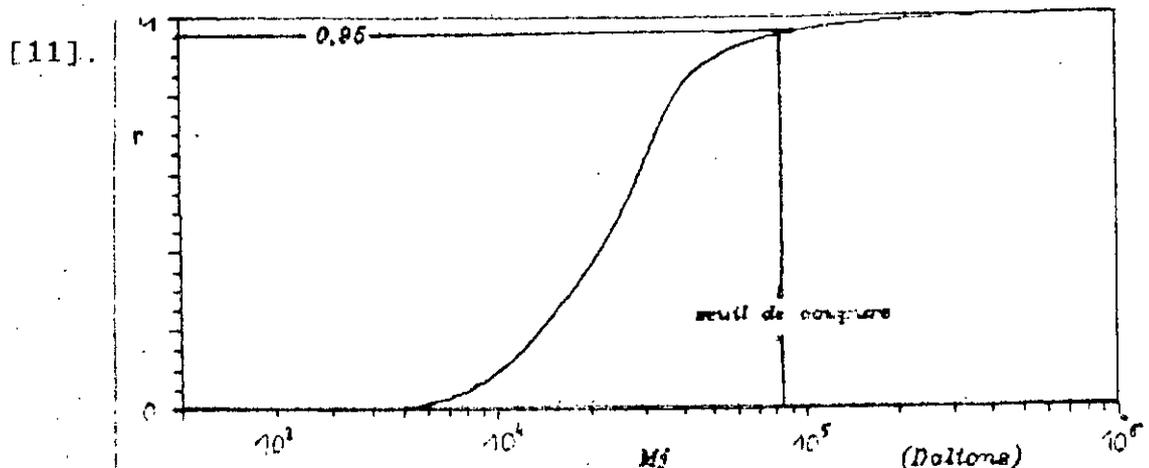


Figure N°7: Taux de rétention en fonction de la masse moléculaire des substances retenues [28].

#### 1.6.6. Mécanisme de l'ultrafiltration:

En absence de soluté, le solvant suit la loi de *DARCY* qui ne nécessite pas des hypothèses concernant la géométrie des pores [27]; d'où:  $J_v = L_p \cdot \Delta P$  (6.1)

avec:  $J_v$ : débit du solvant par unité de surface ( $\text{ms}^{-1}$ )

$L_p$ : perméabilité hydraulique de la membrane ( $\text{ms}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ ).

$P$ : pression transmembranaire appliquée (Pa).

Par contre, en présence de solutés, plusieurs phénomènes prennent naissance au niveau de la membrane entraînant une diminution du flux du perméat par rapport au flux du solvant qui tendra, au-delà d'une certaine pression transmembranaire à devenir indépendant de celle-ci (Voir figure N°8) et qui s'expliquera par des phénomènes comme:

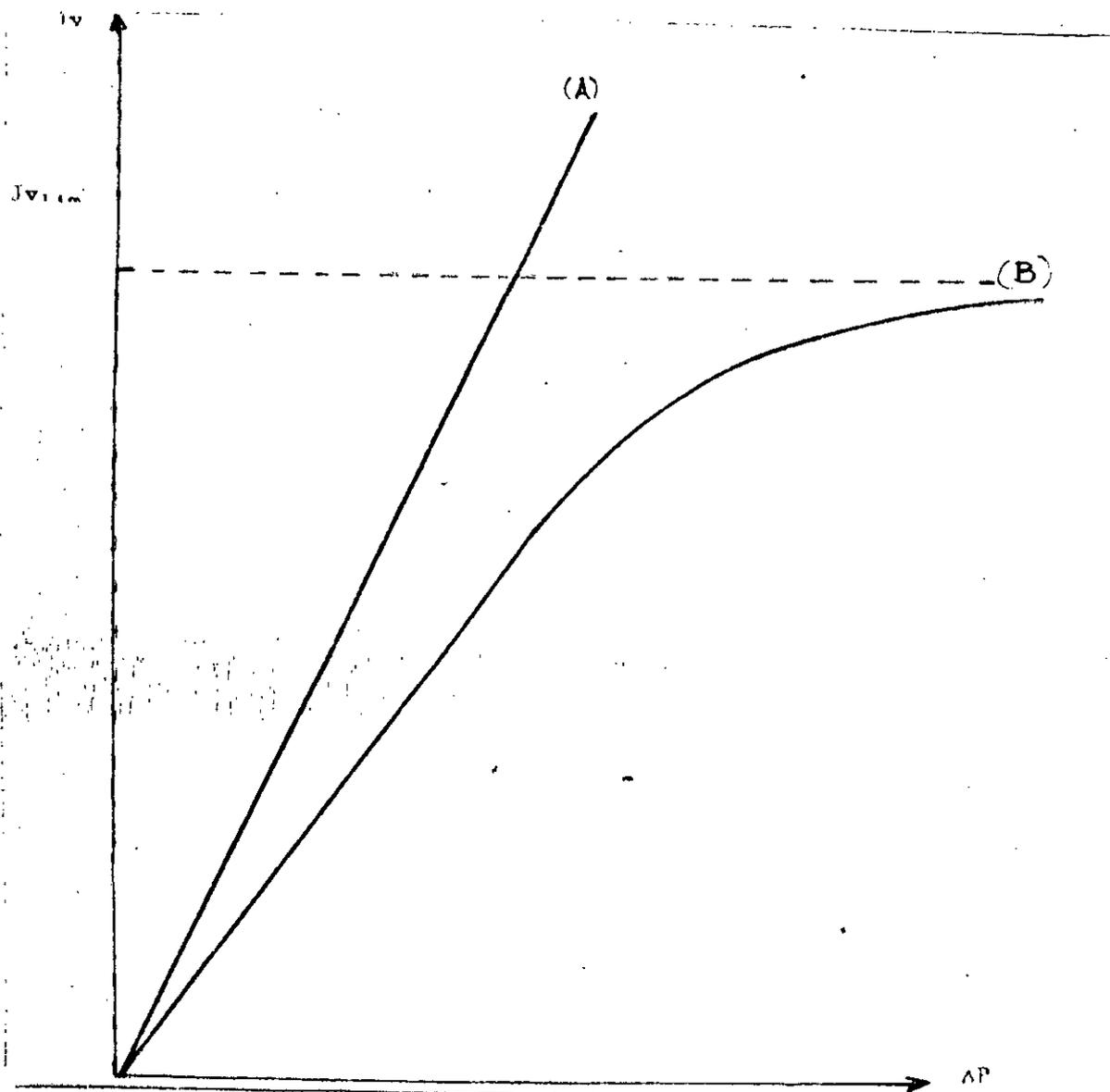


Figure N°8: Variation du flux du perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la vitesse de recirculation

[11]:

**Courbe A:** représente le flux de perméation d'un solvant pur suivant la loi de *DARCY*.

**Courbe B:** représente le flux de perméation d'une solution de macromolécules qui d'une part ne suit pas la loi de *DARCY* et qui d'une autre part atteint une valeur limite pour une certaine pression.

- l'effet de la polarisation de concentration qui est un phénomène réversible du fait qu'au cours du procédé de l'ultrafiltration, les solutés retenus vont s'entasser au niveau de l'interface solution - membrane en créant au fur et à mesure une couche de polarisation [11].

- l'effet du colmatage qui est un phénomène irréversible; dans ce cas, le retentat entraînera des précipitations et formera une couche solide à la surface de la membrane; c'est pourquoi, cette mauvaise séparation conduira à une diminution du débit du perméat [11].

Dans ce cas, l'écoulement à travers la membrane est régi par la relation de *KEDEM et Coll* comme suit [27]:

$$J_v = L_p \cdot (\Delta P - \sigma \Delta \Pi) \quad (6.2)$$

avec  $L_p$ : perméabilité hydraulique ( $\text{ms}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ )

$\Delta P$ : pression transmembranaire (Pa)

$\sigma$ : coefficient de *KEDEM* (adim)

$\Delta \Pi$ : pression osmotique (Pa).

En définitive, il y a lieu de remarquer que ces deux phénomènes sont inhérents à l'ultrafiltration: ils apparaissent simultanément et sont indissociables l'un de l'autre.

En outre, le taux de rejet observé  $R_o$  est défini comme étant la fraction de soluté retenue par la membrane [25] d'où:

$$R_o = 1 - \frac{C_p}{C_o} \quad (6.3)$$

avec :

$C_p$ : concentration du soluté dans le perméat

$C_o$ : concentration du soluté dans la solution.

### 1.6.7. Principales applications de l'ultrafiltration:

Les applications sont diverses:

- dans les industries agro-alimentaires: récupération et valorisation du lacto sérum (petit lait).

- dans les industries automobiles: recyclage des peintures et régénération des huiles de moteurs.

- dans les industries biologiques et pharmaceutiques: purification et concentration des antibiotiques, des acides aminés, des protéines.

- dans les industries de boissons alcoolisées: remplacement par l'ultrafiltration de l'étape de collage qui consiste à éliminer les protéines.

- dans l'environnement: traitement et valorisation des effluents provenant des industries textiles, des tanneries, des papeteries [25].

CHAPITRE II

ETUDE

EXPERIMENTALE

## CHAPITRE II

### ETUDE EXPERIMENTALE

#### 2.1. METHODES DE DOSAGE DES PROTEINES.

Le dosage des protéines se fait:

- soit directement en utilisant les propriétés physiques ou chimiques des protéines.
- soit par le dosage de l'azote total après destruction de la matière organique.

Pour cela, le choix de la méthode de dosage dépendra de la nature du produit, de l'utilisation des résultats, des moyens disponibles d'analyse et du nombre d'échantillons à traiter [29]; dans notre cas, on a opté pour la méthode de *FOLIN-LOWRY* (voir annexe).

#### 2.2. ETUDE EXPERIMENTALE D'UNE CINETIQUE ENZYMATIQUE DES REJETS SOLIDES DE POISSONNERIE.

Les rejets solides de poissonnerie sont formés d'un mélange complexe de déchets issus des opérations d'évidage et de nettoyage de poissons comestibles comme les têtes, les viscères, les arêtes et les espèces pélagiques présentant par la suite une valeur nutritionnelle très importante.

Pour cela, notre étude consistera dans la production d'acides aminés et de peptides à partir d'un rejet solide de poissonnerie hydrolysé par une enzyme protéolytique commerciale

d'origine végétale: la papaïne extraite du *Carica papaya*, dans un bioréacteur d'une capacité de deux (2) litres (voir planche 1 et 2).

### 2.2.1. Description du dispositif expérimental:

2.2.1.1. Sa forme: Le bioréacteur est une cuve cylindrique munie de deux platines horizontales:

- la partie supérieure porte des tuyauteries destinées à l'arrivée de l'air, à l'addition des réactifs, à l'entrée des appareils de contrôle.

- la partie inférieure porte une tuyauterie de vidange [30]

2.2.1.2. Son matériau: Le bioréacteur est réalisé avec de l'acier inoxydable désigné sous l'appellation 18-8: 18% de chrome et 8% de nickel, et caractérisé par une faible teneur en carbone et par l'addition de petites quantités de molybdène: 2 à 3% de manganèse, de silice et de soufre destinées à améliorer sa qualité [30].

2.2.1.3. Son agitation: L'agitation mécanique a pour but d'assurer l'uniformité du milieu réactionnel en accélérant la vitesse d'échange entre le substrat et l'enzyme; ainsi, le moteur d'entraînement est un moteur électrique de marque *IKA-Werk* qui présente une gamme de vitesse d'agitation de 60 à 2.000 tours/mn.

Dans notre cas, l'agitation du mélange réactionnel lors de l'hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonnerie est

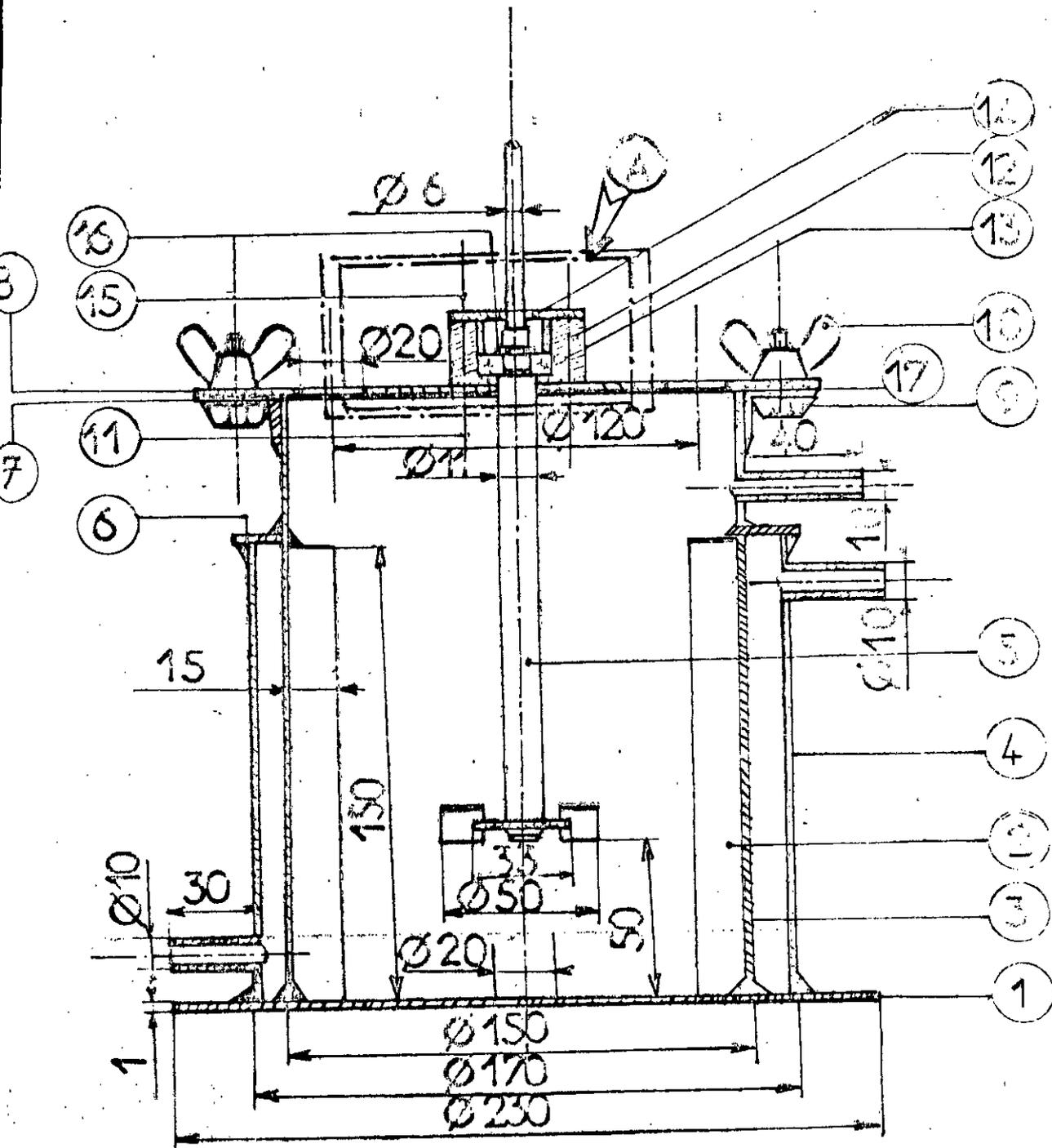


Schéma d'un réacteur biologique [30]:

17	1	Joint d'étanchéité
16	1	Anneau élastique
15	2	Vis de fixation
14	1	Couvercle
13	1	Roulement étanche
12	1	Mécanisme de guidage
11	3	Vis de fixation
10	4	Écrous à oreilles
9	4	Vis
8	1	Bride supérieure
7	4	Coudes
6	1	Couvercle d'échangeur thermique
5	1	Agitateur à 8 pales
4	1	Echangeur thermique
3	1	Cylindre
2	4	Contrepales
1	1	Bride inférieure
Rep	N <sup>bre</sup>	DESIGNATION

fixée à une vitesse d'agitation modérée de 300 à 400 tours/mn car une faible agitation entraînerait au cours du procédé enzymatique un taux d'hydrolyse bas, de même, une forte agitation entraînerait une importante oxydation qui conduirait à la formation de produits toxiques et à l'abaissement de la concentration de certains acides aminés particulièrement ceux qui contiennent du soufre comme la cystéine, la méthionine [13].

**2.2.1.4. Son chauffage:** L'appareil est muni d'un dispositif d'échangeur de chaleur de type double enveloppe permettant d'augmenter la surface des échanges thermiques et d'évacuer les calories libérées dans le bioréacteur [30].

#### 2.2.2. Etude de la cinétique enzymatique:

L'étude expérimentale de la cinétique enzymatique est réalisée par quantification des acides aminés et des peptides contenus dans le mélange réactionnel en fonction du temps dans le but de déterminer les constantes caractéristiques:  $v_{max}$  et  $k_m$  de cette enzyme protéolytique.

##### 2.2.2.1. Principe:

Sachant que: la plupart des protéines sont insolubles dans les solutions d'acide trichloroacétique et les peptides, relativement courts, sont solubles dans cette solution, la progression d'une protéolyse sera évaluée par: l'azote "protéique" c'est-à-dire les protéines non hydrolysées ou par l'azote "non protéique" ou "peptidique" c'est-à-dire les peptides libérés par hydrolyse enzymatique; ainsi, la

dans le substrat en considérant que 14% en poids de la masse du substrat est sous forme de protéines puis on calculera en

second lieu la quantité nécessaire d'enzymes à utiliser lors de la cinétique d'hydrolyse enzymatique.

Lorsque les solutions de substrat et d'enzyme sont préparées, le pH des solutions soumises à l'hydrolyse enzymatique est ramené à 6 (le pH-METRE et l'électrode utilisés sont de marque *PROMINENT*), l'ajustement se fait soit par ajout d'acide HCl 4N, soit de base NaOH 2N et la température du milieu réactionnel est maintenue à 55°C durant le procédé enzymatique.

Pour cela, des conditions opératoires optimales d'activité de la papaïne au cours de l'hydrolyse enzymatique des rejets de poissonnerie ont été rapportées par différents auteurs dans un article publié par *VEGA et BRENNAN* [31] ainsi, un tableau récapitulatif donnera comme suit les conditions optimales d'activité de cette enzyme protéolytique:

**Tableau N°5: Détermination des conditions opératoires optimales d'activité de la papaïne rapportées par différents auteurs [31].**

Référence	Proportion(%) eau/poisson	Enzyme	t°(°C)	pH
Sen et al (1962)	1	Papaïne	40-55	7
Lopez-Benito (1978)	4	Papaïne	65	7
Pastoriza et al (1982)	4	Papaïne	65	6,5
Ritchie et Mackie (1982)	1	Papaïne	65	7

**2.2.2.4. Mode opératoire:**

- verser la quantité d'enzyme nécessaire à la réaction enzymatique, à un instant initial choisi, dans les conditions opératoires optimales.
  
- prélever 2 ml de ce milieu homogène à  $t = 30$  puis transvaser dans un tube contenant 5 ml d'acide trichloroacétique:  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  à 5% dans le but d'arrêter la réaction enzymatique.
  
- refaire de la même manière un prélèvement de 2 ml à ce milieu homogène à des intervalles de temps fixés en minutes puis les transvaser respectivement dans des tubes contenant du  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  à 5%
  
- attendre 20 minutes pour la coagulation des protéines puis à l'aide des entonnoirs, filtrer le contenu dans des tubes vides à travers un filtre en papier *WHATMAN* N°3.
  
- prélever 1 ml du filtrat de chaque tube obtenu.
  
- quantifier les acides aminés et les peptides du filtrat par la méthode de *FOLIN-LOWRY* contre une courbe d'étalonnage. (Voir annexe)

## 2.3. ETUDE EXPERIMENTALE D'UNE HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES REJETS DE POISSONNERIE.

### 2.3.1.A l'échelle laboratoire:

Dans ce cas, l'hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonnerie est suivie en fonction du temps de réaction dans un réacteur biologique d'une capacité de deux litres décrit ci-dessus dans le chapitre (2.2.1).

L'étude expérimentale de l'hydrolyse enzymatique des rejets de poissonnerie consiste à suivre l'évolution du mélange réactionnel en fonction du temps; ainsi, le taux de protéines hydrolysées est évalué par quantification des acides aminés et des peptides solubles dans la solution d'acide trichloroacétique. Pour cela on procédera de la même manière que dans l'étude de la cinétique enzymatique mais dans ce cas, on étudiera l'évolution de l'hydrolyse enzymatique, pendant 4 heures durant lesquelles des prélèvements d'échantillon seront effectués en considérant la concentration initiale optimale en substrat de 150 g/l.

Il est très important de contrôler le pH en l'ajustant à la valeur optimale par ajout d'acide ou de base et la température tout au long de la réaction enzymatique.

### 2.3.2.A l'échelle semi pilote:

Dans ce cas, l'hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonnerie est réalisée dans un réacteur d'une capacité de vingt litres décrit ci-dessous:

Le réacteur enzymatique est une cuve en verre rigide de forme cylindrique à fond plat qui comporte les équipements:

- de régulation de température composés de résistances de chauffage et d'un thermomètre à contact sur lequel la température voulue est mentionnée par l'opérateur.

- de mélange composés d'un agitateur électrique et d'une tige à pâles (en forme d'hélice) pour une parfaite homogénéisation du milieu réactionnel.

- de chauffage d'arrêt du procédé enzymatique composés de résistances de chauffage de puissance très élevée (de l'ordre de 1000 W) pour que l'enzyme soit désactivée [13].

L'étude expérimentale de l'hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonnerie consiste à suivre l'évolution du mélange réactionnel en fonction du temps; pour cela, trois kilogrammes de rejets solides de poissonnerie sont broyés, dilués dans une quantité d'eau déterminée puis homogénéiser durant un intervalle de temps de 5 minutes mais il y a lieu de remarquer qu'une importante homogénéisation du mélange réactionnel accroîtra d'une part la formation d'une émulsion protéines-lipides et d'une autre part freinera l'activité enzymatique en abaissant le rendement de l'hydrolyse enzymatique; ensuite une quantité définie de papaïne est versée dans le réacteur enzymatique dans lequel le pH et la température sont respectivement ajusté et ramenée à leurs valeurs opératoires optimales; ainsi, la teneur en protéines hydrolysées est suivie en fonction du temps en quantifiant les

acides aminés et les peptides libérés au cours de l'hydrolyse enzymatique en utilisant la méthode de dosage des protéines de *FOLIN-LOWRY*.

A la fin de la réaction enzymatique, les résistances de chauffage d'arrêt sont mises en marche à la température de 100°C au bout de quelques minutes dans le but d'une part de désactiver l'enzyme et d'autre part d'éliminer les micro-organismes contenus dans l'hydrolysate enzymatique.

## 2.4. ETUDE DU PROCÉDE D'ULTRAFILTRATION.

### 2.4.1. Conditions opératoires en ultrafiltration:

Des conditions opératoires adéquates doivent être prises dans le but de réduire certains paramètres pouvant influencer sur le procédé de l'ultrafiltration comme:

#### 2.4.1.1. Pré-traitement de l'hydrolysate brut:

L'hydrolysate brut, obtenu par l'action de la papaïne sur les rejets solides de poissonnerie, doit subir avant ultrafiltration un pré-traitement qui consiste à: après son refroidissement, l'hydrolysate est soutiré du réacteur enzymatique pour une opération de tamisage à travers un tamis de 150 µm de diamètre afin de retenir les grosses fractions telles que: les arêtes, les écailles..... puis par une opération de centrifugation dans une centrifugeuse *EBA III HETTICH* à température ambiante et à une vitesse de 10 tours/s durant au moins 15 minutes afin de séparer les protéines des lipides qui sont contenus en quantité importante dans l'hydrolysate mais, comme l'hydrolysate pré-traité obtenu est

encore chargé, il devra donc subir une dilution de 1/3 afin de faciliter le procédé étant donné les risques de colmatage de la membrane d'ultrafiltration.

#### 2.4.1.2. Nettoyage des membranes:

C'est une étape très importante pour l'optimisation d'un procédé d'ultrafiltration ou pour toute autre opération; pour cela la procédure de nettoyage est la suivante:

- préparer une solution d'ultrasil 10 de HENKEL à 10g/l.
- afficher la température de 70°C nécessaire pour un bon nettoyage.
- introduire la solution d'ultrasil dans le bac d'alimentation.
- laisser tourner l'installation pendant 30 minutes.
- ajouter 400 ml d'eau de javel à 12° chlorométrique et laisser fonctionner l'installation pendant 15 minutes puis arrêter l'opération.
- vidanger l'installation puis rincer à l'eau.

Ce procédé de nettoyage est très efficace et permet la restauration de la perméabilité hydraulique de la membrane jusqu'à 98 à 100% [32] mais des nettoyages trop fréquents peuvent créer certains problèmes comme:

une durée de vie restreinte des membranes, un coût élevé des réactifs de nettoyage, une perte de temps pour une maintenance continue [25].

#### 2.4.2. Description du dispositif expérimental:

Le dispositif: microlab 130 S est un pilote mixte de microfiltration et d'ultrafiltration miniaturisé à partir d'installations industrielles [32].

L'installation comporte une pompe d'alimentation à débit réglable s'échelonnant de 200 à 800 l/h et alimentant une boucle dans laquelle se trouvent une pompe de recirculation, un débitmètre électromagnétique à débit réglable allant de 0 à 5 m<sup>3</sup>/h et un échangeur de chaleur. De plus, deux transmetteurs de pression sont placés à l'entrée et à la sortie des modules permettant de mesurer, à chaque instant, la valeur de la pression transmembranaire et une sonde de température permettant de connaître la température du fluide au voisinage de la membrane [32].

#### 2.4.3. Description de la membrane:

La membrane utilisée est une membrane minérale: CERAVER constituée de plusieurs canaux et d'une couche de céramique à porosité finement calibrée; ses caractéristiques sont:

- composition:  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- diamètre des pores: 500 Å
- résistance à la corrosion: limitée

#### 2.4.4. Mode opératoire:

##### 2.4.4.1. Etablissement de la courbe de solvant:

Comme la courbe de solvant est indépendante de la vitesse de recirculation alors on opérera comme suit. Lorsque la pompe de recirculation ne fonctionne pas (en statique):

- remplir le bac d'alimentation de solvant (eau de robinet).

- ouvrir les vannes d'alimentation et de pression.
- faire des empotages, c'est-à-dire, pour un certain volume du perméat, le temps correspondant est noté à l'aide d'une éprouvette graduée, pour différentes pressions transmembranaires.

#### 2.4.4.2. Etablissement de la courbe de polarisation:

Cette opération a pour but d'étudier l'influence de la pression transmembranaire et de la vitesse de recirculation sur le flux de l'ultrafiltrat pour le tracé des courbes de polarisation mais, comme le temps rapporté ne nous permet pas d'étudier l'influence de la vitesse de recirculation, celle-ci sera fixée au début de l'expérimentation en sachant que, pour une vitesse de recirculation élevée, une grande turbulence sera observée au niveau de la membrane en entraînant d'une part une diminution de la couche de polarisation et d'autre part une augmentation du flux de perméation.

Pour cela, on opère comme suit:

- remplir le bac d'alimentation par la solution à traiter.
- ouvrir les vannes d'alimentation et de pression
- démarrer la pompe d'alimentation lorsque le débit du retentat est fixé à 500 l/h.
- fixer la vitesse de recirculation à l'aide d'une pompe de recirculation.
- faire des empotages pour différentes pressions transmembranaire.
- recirculer le perméat et le concentrat dans le bac d'alimentation afin de travailler à concentration initiale constante.

# CHAPITRE III

## RESULTATS EXPERIMENTAUX

ET

INTERPRETATIONS

### CHAPITRE III

#### RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATION

##### 3.1. ETUDE DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE:

##### 3.1.1. Evolution de la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps de réaction:

En traçant d'une part les graphes donnant la concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps, on remarque que la courbe comporte au départ une partie rectiligne où la pente est constante puis la courbe s'infléchit entraînant une diminution de la vitesse de réaction qui s'annulera par la suite; pour cela, la vitesse de réaction doit être mesurée au début de la cinétique enzymatique lorsque peu de substrat a été transformé et peu de produit a été formé; ainsi, la pente est maximale, la vitesse initiale  $v_0$  de la réaction est obtenue et sa détermination se fait par la mesure de l'angle que fait la tangente à la courbe à l'origine correspondant au temps initial.

D'autre part, on considérera un tableau récapitulatif exprimant les teneurs en protéines hydrolysées calculées par rapport à toute la masse initiale en substrat contenue dans les rejets de poissonnerie et obtenues à la fin de l'hydrolyse enzymatique au bout de 1 heure lorsque les paliers ont été observés.

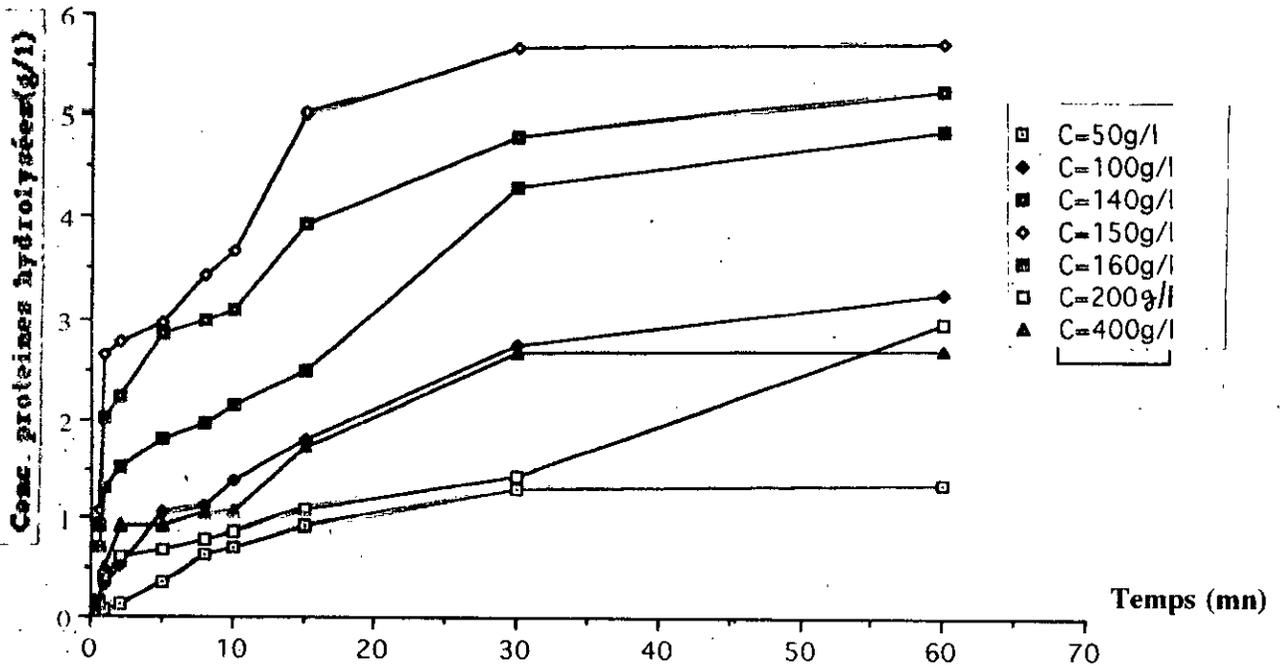
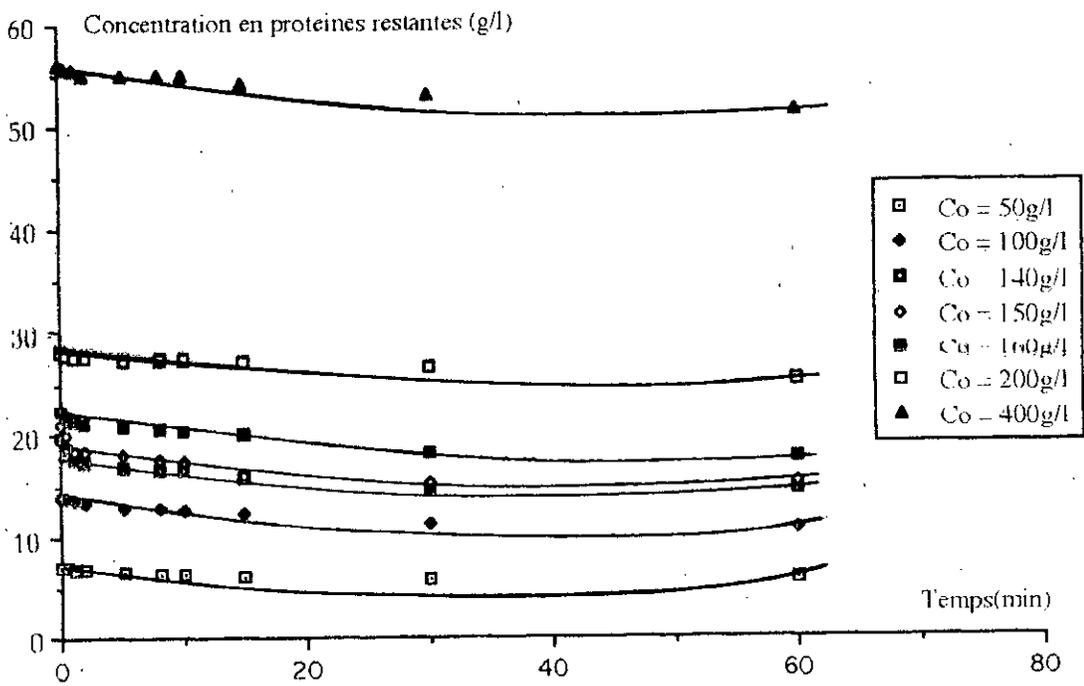


Fig. N°9: Concentration en protéines hydrolysées en fonction du temps



Concentration en protéines restantes en fonction du temps

**Tableau N°6: Concentration initiale en substrat et quantité de papaïne en fonction du taux de protéines hydrolysées:**

Concentration initiale en substrat	Quantité de papaïne (g)	Taux de protéines hydrolysées à la fin de la réaction enzymatique (%)
50	0,47	19,43
100	0,93	23,14
140	1,31	26,84
150	1,33	27,33
160	1,49	21,65
200	1,87	10,53
400	3,73	4,82

On remarque que les teneurs en protéines hydrolysées ne sont pas élevés au bout de 1 heure d'hydrolyse enzymatique; ceci peut être dû d'une part aux erreurs commises lors de l'expérimentation et d'autre part par la complexité du milieu biologique mais toute fois, les teneurs en protéines hydrolysées auraient été plus intéressantes et plus élevées si les teneurs en azote protéique contenues initialement dans les rejets de poissonnerie avaient été déterminées par dosage de l'azote total (Azote Kjeldahl) qui s'exprime par la relation suivante:

$Q_p = 6,25 \cdot Q_n$  [13] avec:

$Q_p$ : Quantité en protéines de l'échantillon.

$Q_n$ : Teneur en azote Kjeldahl de l'échantillon.

6,25: Coefficient spécifique aux protéines d'origine animale.

En conséquence, on pourra dire que pour une concentration initiale en substrat égale à 150 g/l, la teneur en protéines hydrolysées est élevée donnant ainsi un rendement d'hydrolyse enzymatique meilleur donc la concentration initiale optimale en substrat est de 150 g/l qui correspondra à une quantité d'enzyme de 1,33g.

### 3.1.2. Evolution de la vitesse initiale de réaction en fonction de la quantité en enzyme:

En portant sur un graphique la variation de la vitesse initiale en fonction de la quantité en enzyme, on remarque au départ que la vitesse initiale est proportionnelle à la quantité en enzyme: il y a autant de substrat transformé que d'enzyme présente dans le réacteur enzymatique puis pour des quantités élevées en enzyme, la courbe s'infléchit: il n'y a plus de proportionnalité puis décroît en fonction de la quantité en enzyme.

Ainsi, pour des quantités en enzyme faibles, la vitesse initiale en fonction de la quantité en enzyme est une droite passant par l'origine d'équation:  $v_i = a \cdot E_t$  où  $a$  représente la pente de la droite.

D'après le graphe:  $v_i = f(E_t)$ , on obtient

$$a = 6,13 \text{ g/l. mn. g d'enzyme.}$$

Or, théoriquement, on sait que:  $v_i = k_3 \cdot E_t$  où  $k_3$  représente la constante de vitesse; donc, par identification, on obtient.

$$k_3 = 6,13 \text{ g/l. mn. g d'enzyme.}$$

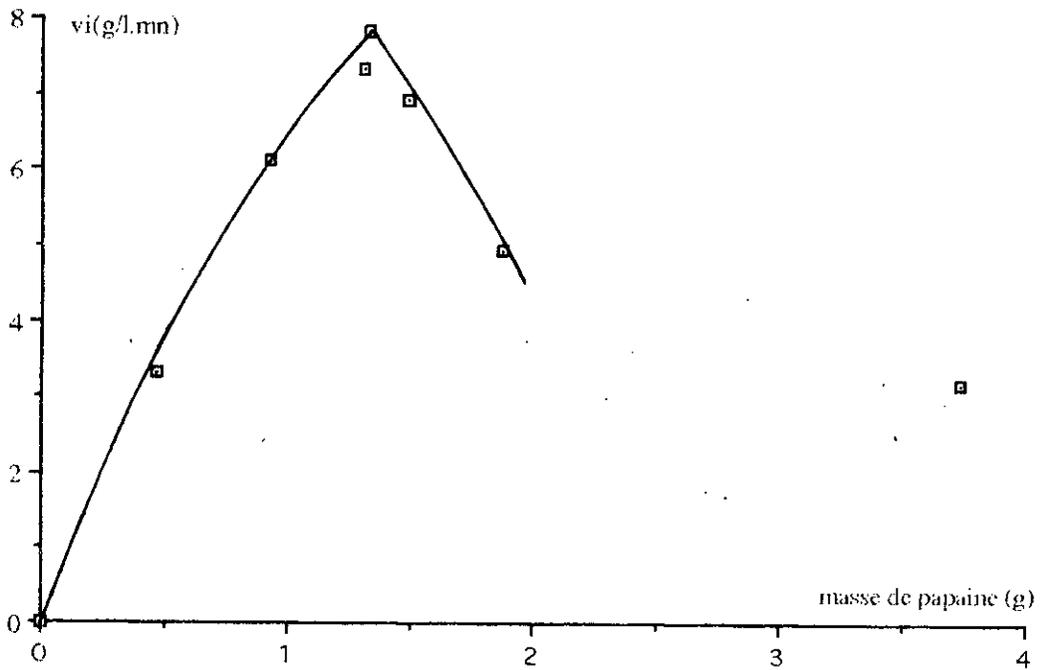
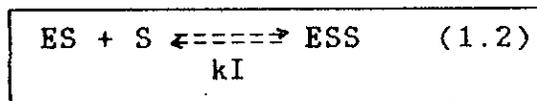
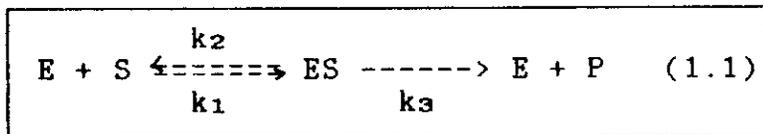


Fig. N°10: Evolution de la vitesse initiale en fonction de la masse en substrat

### 3.1.3. Evolution de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration initiale en substrat:

Le graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en substrat montre que pour une concentration en substrat approximativement supérieure à 150 g/l, la vitesse de la réaction enzymatique diminue du fait de l'inhibition de la réaction enzymatique par un excès de substrat; dans ce cas, les molécules de substrat n'ayant pas suffisamment de sites actifs vont interagir avec le complexe enzyme-substrat produit au cours du procédé entraînant ainsi un ralentissement de la réaction enzymatique.

L'inhibition due à un excès de substrat peut être définie comme suite [17]:



En supposant la réaction de ESS à l'équilibre et l'état stationnaire pour ES:

$$K_I [E] [S] = (K_2 + K_3) [ES] \quad (1.3)$$

$$K_I = \frac{[ES] [S]}{[ESS]} \quad (1.4)$$

$$\text{de plus: } [E] = [E] + [ES] + [ESS] \quad (1.5)$$

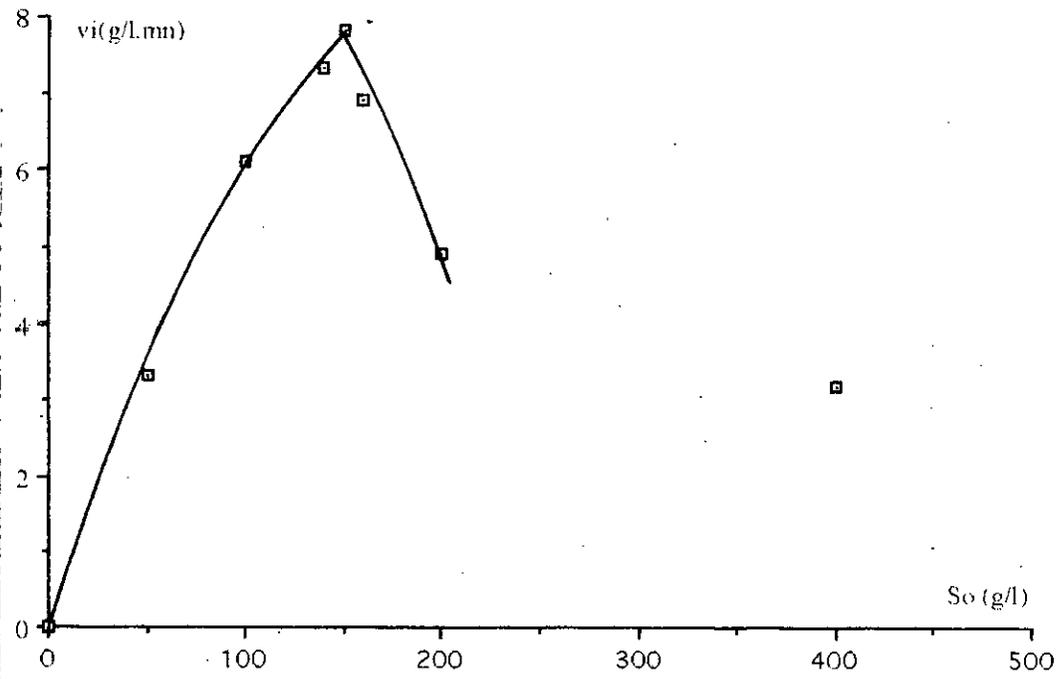


Fig. N°113 Evolution de  $v_i$  en fonction de  $S_o$

or, la vitesse de réaction est donnée par:

$$v = K_3 [ES] \quad (1.6) \quad \implies \quad v_{\max} = K_3 [E_T] \quad (1.7)$$

Donc:

$$v = v_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (1.8)$$

D'autre part, le bilan de matière en substrat dans un réacteur discontinu donne l'équation suivante:

$$v = - \frac{dS}{dt} \quad (1.9)$$

D'après l'équation (1.8):

$$v_{\max} \int_0^t dt = - \int_{S_0}^S \left( \frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_I} \right) dS \quad (1.10)$$

Après intégration, on obtient:

$$v_{\max} \cdot t = - K_m \log \frac{S}{S_0} - (S - S_0) - \frac{1}{2 K_I} (S^2 - S_0^2) \quad (1.11)$$

Soit  $x$  le taux de conversion instantané du substrat égal à:

$$x = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (1.12)$$

Donc:

$$v_{\max} \cdot t = x S_0 + K_m \operatorname{Log} \frac{1}{1-x} + \frac{x S_0^2}{2 K_I} (2 - x) \quad (1.13)$$

### 3.1.4. Evolution de l'inverse de la vitesse initiale de réaction en fonction de l'inverse de la concentration initiale en substrat:

De même, le groupe représentant l'inverse de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la concentration initiale en substrat montre que la courbe obtenue est une hyperbole qui n'obéit pas à la loi de *MICHAELIS-MENTEN* indiquant ainsi une inhibition par le substrat mais pour des faibles concentrations initiales en substrat, l'inhibition par le substrat n'est pas observée et les constantes cinétiques  $v_{\max}$  et  $K_m$  seront déterminées par l'intersection de l'asymptote oblique à la courbe avec l'axe des ordonnées et des abscisses donnant respectivement les valeurs de  $1/v_{\max}$  et de  $-1/K_m$ .

Les constantes cinétiques obtenues sont:

$$v_{\max} = 35,4 \text{ g/l.mn}$$

$$K_m = 454,5 \text{ g/l}$$

Or, théoriquement, on sait que: plus l'interaction enzyme-substrat est forte et plus il y aura d'enzyme combinée au substrat sous forme complexe, ainsi, la valeur de  $K_m$  sera petite pour une affinité élevée égale à  $1/K_m$ .

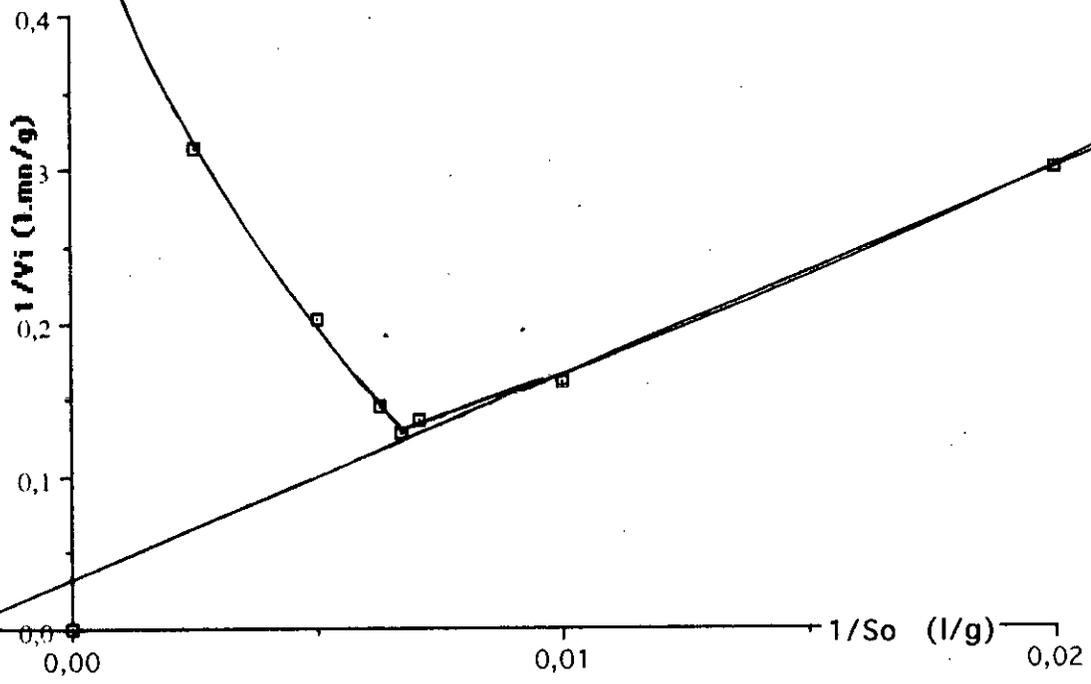


Fig. N°12 : Evaluation de  $1/v_i$  en fonction de  $1/S_o$

Dans notre cas, la valeur expérimentale de  $K_m$  est élevée désignant une affinité très faible entre enzyme et substrat qui s'expliquera par un blocage de l'action enzymatique du à l'existence de particules grossières comme les restes d'arêtes, les écailles en dépit du broyage et de la dilution des rejets de poissonnerie.

### 3.1.5. Evolution de l'inverse de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration initiale en substrat:

La présence de l'inhibition par le substrat a conduit au tracé du graphe représentant l'inverse de la vitesse initiale en fonction de la concentration initiale en substrat pour la détermination de la constante d'inhibition  $K_I$  en considérant l'intersection de l'asymptote oblique à la courbe avec l'axe des abscisses. La constante cinétique obtenue est:  $K_I = 20 \text{ g/l}$ .

Cependant, il y a lieu de remarquer que les valeurs des constantes cinétiques obtenues ne peuvent pas être comparées et interprétées: en bibliographie, ces paramètres, dans le cas de la papaïne, sont en général cités pour des substrats définis autres que la sardine.

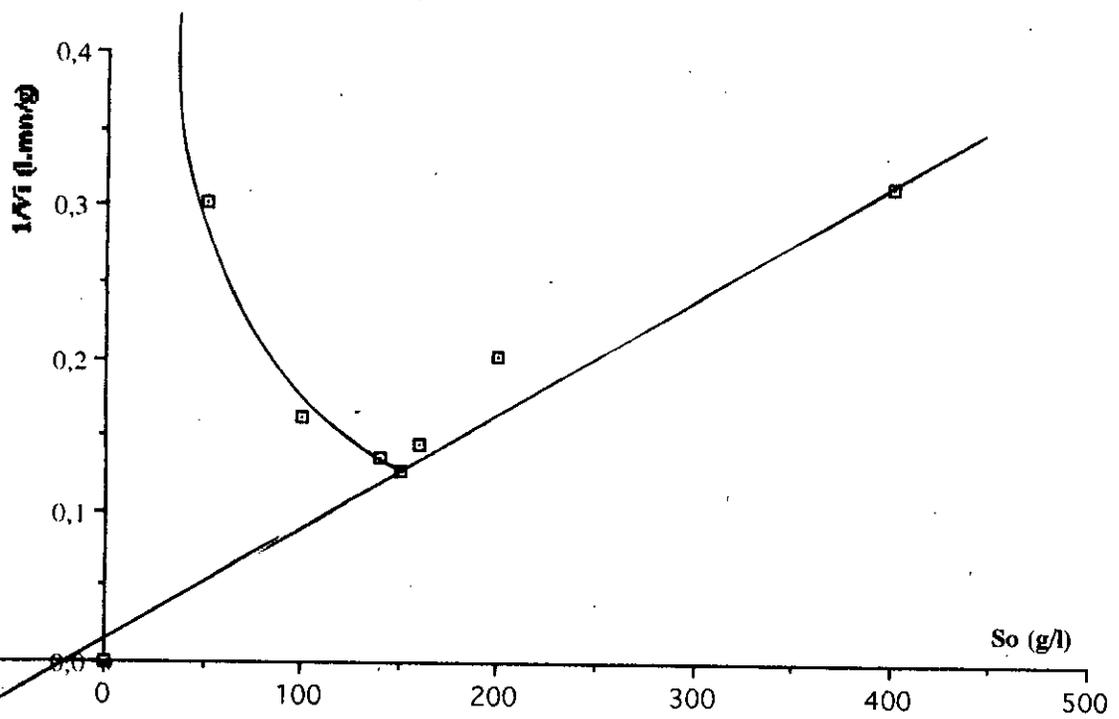


Fig. N°13: *Evalu Non de  $l/v_i$  en fonction de  $S_o$*

### 3.2. ETUDE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE:

A l'échelle semi pilote, on remarque au début de la réaction enzymatique que le mélange réactionnel est sous forme d'une pâte épaisse; mais l'agitation, au bout de quelques minutes, entraînera une parfaite homogénéisation du mélange réactionnel et une bonne distribution de l'enzyme à travers l'ensemble du volume réactionnel.

Les représentations graphiques donnant l'évolution du taux de protéines hydrolysées en fonction du temps de réaction sont de même type: elles passent par l'origine et présentent une augmentation qui disparaît au cours du temps pour faire place à un palier; mais les teneurs en protéines hydrolysées obtenues à l'échelle semi-pilote sont plus faibles que celles obtenues à l'échelle laboratoire: les teneurs en protéines hydrolysées augmentent au cours du procédé enzymatique pour atteindre au bout de 4 heures de réaction les valeurs maximales de 30,71% et de 17,73% respectivement à l'échelle laboratoire et à l'échelle semi-pilote; ainsi, cette diminution observée du rendement enzymatique est une conséquence qui montre la difficulté de contrôler et de maîtriser l'évolution du procédé enzymatique à l'échelle semi-pilote.

En définitive, on peut dire que les résultats expérimentaux montrent d'une part que les résultats obtenus à l'échelle laboratoire ne permettent pas l'exploitation directe du processus enzymatique à une échelle plus importante; dans le cas contraire, des erreurs d'une certaine gravité peuvent être commises d'une part de vue économique et d'autre part

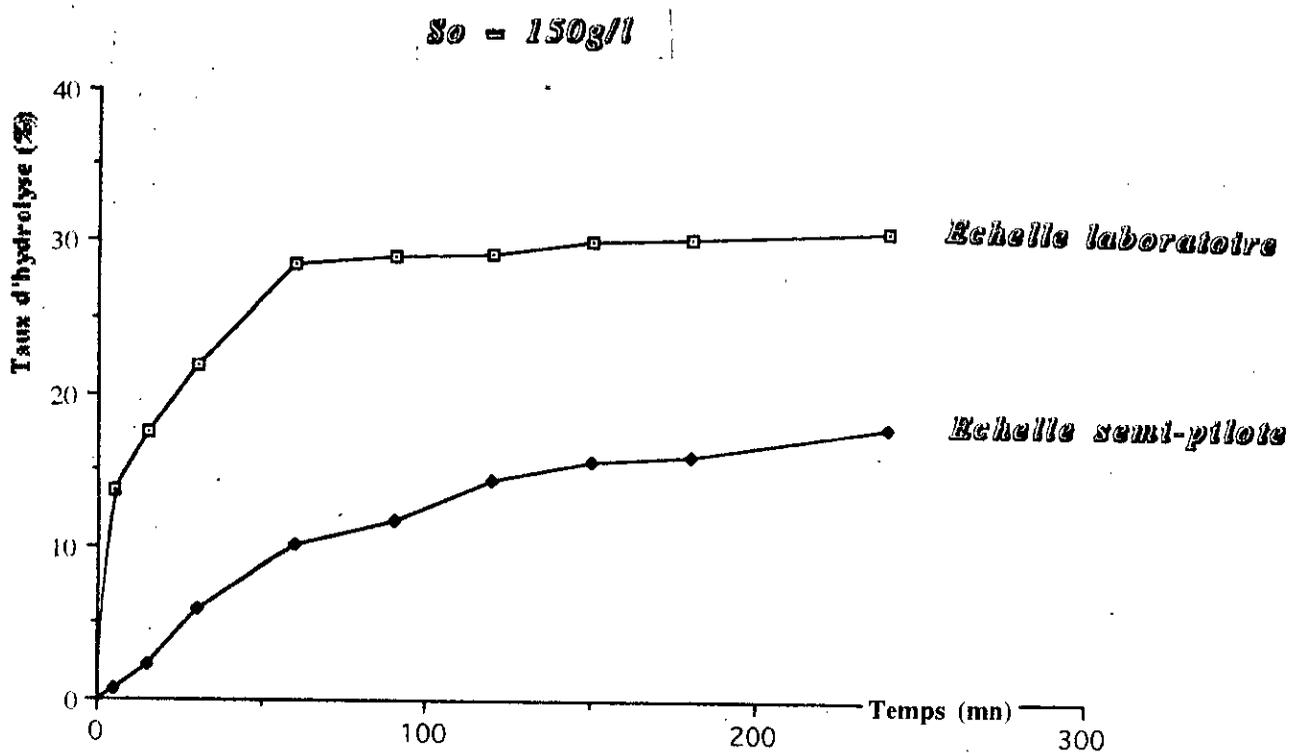


Fig.N°14: Taux d'hydrolyse en fonction du temps

l'importance de l'expérimentation à diverses échelles avant toute exploitation et utilisation d'un procédé enzymatique à l'échelle industrielle.

De plus, indépendamment de l'échelle de travail considérée, il y a lieu de remarquer que le taux de protéines hydrolysées dépend:

- de la qualité du substrat: en effet, le taux de graisse contenue dans les rejets solides de poissonnerie influe sur le taux d'hydrolyse en entraînant une diminution du rendement enzymatique due à la formation de complexes protéines-lipides qui sont difficilement hydrolysables.

- de la température: *CIVIT et Coll* [9] ont constaté que les rejets solides de poissonnerie séjournant à la température ambiante ont des rendements d'hydrolyse beaucoup plus faibles par rapport à des rejets frais.

- de l'agitation: étant indispensable, elle sera fixée au cours du processus enzymatique dans le but d'élever la teneur en protéines hydrolysées.

- du rapport enzyme-substrat: dans le cas général, il influe sur le taux d'hydrolyse; mais dans notre cas, la méthode de calcul de la quantité d'enzyme nécessaire à hydrolyser les rejets solides de poissonnerie dépendra essentiellement de la concentration initiale en substrat, c'est-à-dire pour une concentration initiale en substrat correspondra une quantité

d'enzyme définie nécessaire à l'hydrolyse du substrat protéique.

- du rapport eau-substrat: l'influence est due à la variation de la quantité de substrat et d'enzyme en fonction de la dilution; mais, parfois aux faibles additions d'eau, il est nécessaire d'augmenter la puissance d'agitation pour obtenir un rendement d'hydrolyse plus élevé.

### 3.3. ETUDE ECONOMIQUE.

D'une part: les résultats expérimentaux obtenus, au cours de l'hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonnerie sous l'action de la papaïne, peuvent être comparés à ceux de *BENHABLES* [13], sous l'action de la pepsine obtenue par autodigestion de la muqueuse stomacale du mouton, comme suit:

**Tableau N°7: Comparaison des taux d'hydrolyse obtenus à l'échelle laboratoire et à l'échelle semi-pilote de deux enzymes protéolytiques:**

nature de l'enzyme	pH	t°(°C)	TH(%) à l'échelle laboratoire	TH(%) à l'échelle semi-pilote
papaïne commerciale	6,0	55	30,71	17,33
pepsine brute	1,5	48	83,00	63,00

On remarque que, quelque soit l'échelle considérée, la teneur en protéines hydrolysées sous l'action de la pepsine est supérieure à celle obtenue sous l'action de la papaïne qui aurait dû présenter des taux d'hydrolyse plus élevés, étant donné son raffinement et sa pureté; de plus, la complexité du procédé à l'échelle semi-pilote entraînera une chute de la teneur en protéines hydrolysées qui s'expliquera par le fait qu'à l'échelle laboratoire, les paramètres pouvant influencer sur l'hydrolyse enzymatique, sont plus facilement maîtrisables.

Comme l'hydrolysats enzymatique obtenu est destiné à l'alimentation du bétail en tant qu'additif pour l'enrichissement; l'emploi, dans ce cas, d'une enzyme

commerciale des laboratoires MERCK (: -coûteuse (100 g de papaïne pour 360 FF) -d'une grande pureté mais d'une longue préparation

- de plus, la fabrication d'enzymes d'origine végétale est soumise aux contraintes d'approvisionnement de la matière première comme du caractère aléatoire des récoltes ainsi que des spéculations dues aux incertitudes économiques et politiques des pays producteurs [20],) s'avère inutile. Par contre, l'utilisation et l'optimisation d'une enzyme extraite d'une matière peu coûteuse (100 g de muqueuse de mouton pour 40 DA) et disponible s'avèrent préférables afin d'obtenir d'une part un hydrolysate enzymatique peu coûteux, à haute valeur nutritionnelle et d'autre part des rendements d'hydrolyse très élevés.

L'hydrolysate enzymatique doit présenter une grande stabilité, une agréable saveur, une faible teneur en lipides et une longue conservation.

D'autre part: dans un article publié en 1988, *VEGA et BRENNAN* [31] ont comparé deux procédés d'hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonnerie (morue) sous l'action d'une enzyme protéolytique: la papaïne dans un rapport optimal: enzyme/substrat de 0,05% et à une température optimale d'activité de 65°C.

Le premier procédé a lieu en présence d'eau pour lequel la dilution du substrat broyé mais boueux entraîne une diminution de sa viscosité et le second, en absence d'eau, étant donné la

forte teneur en eau (de l'ordre de 80%) contenue dans la partie non comestible.

Ces auteurs ont constaté d'un part que la viscosité du substrat broyé était considérablement réduite à cette température et d'autre part qu'au bout de 30 minutes de réaction, la limite d'hydrolyse (taux de recouvrement en acides aminés et en peptides) était atteinte dans les deux cas; de plus, l'évolution des teneurs en protéines hydrolysées en fonction du temps étaient identiques; c'est pourquoi, une hydrolyse enzymatique réalisée sans ajout d'eau est préférable car elle présente un grand intérêt économique (faibles capitaux), particulièrement à l'échelle industrielle, par la réduction de la taille des équipements expérimentaux, du coût nécessaire au séchage de l'hydrolysate obtenu et de la puissance utilisée.

### 3.4. ETUDE DU PROCEDE D'ULTRAFILTRATION.

Dans tous les cas, le flux du perméat est calculé suivant la relation suivante:

$$J_v = \frac{V}{A \cdot \Delta t} \quad (3.1)$$

où:

V est le volume prélevé à l'empotage à l'aide d'une éprouvette graduée.

$\Delta t$  est le temps correspondant à l'empotage.

A est la surface active de la membrane égale à:

$$A = 0,2 \text{ m}^2.$$

De plus, pour le calcul du taux de rejet observé, on procédera au dosage des protéines présentes dans la solution et dans le perméat par la méthode de *FOLIN-LOWRY*.

Comme l'efficacité d'une membrane est caractérisée par sa perméabilité et sa sélectivité (ou le taux de rejet par rapport au constituant à séparer), ces deux paramètres seront étudiés dans cette partie expérimentale comme suit:

#### 3.4.1. Tracé de la courbe de solvant:

Le tracé de la courbe de solvant, obtenu en portant le flux du perméat  $J_v$  en fonction de la pression transmembranaire  $P$  est une droite passant par l'origine d'équation:  $J_v = a \cdot \Delta P$  où  $a$  représente la pente de la droite.

D'après le graphe:  $J_v = f(\Delta P)$ , on obtient:

$$a = 797,60 \text{ l/h m}^2 \text{ bar.}$$

Or, théoriquement, la courbe solvant est régie par la loi de Darcy (macromolécules inexistantes dans l'eau) comme suite:

$J_v = L_p \cdot \Delta P$  où  $L_p$ : représente la perméabilité de la membrane: donc, par identification, on obtient:

$$\underline{L_p = 796,60 \text{ l/h m}^2 \text{ bar}}$$

### 3.4.2. Tracé de la courbe de polarisation:

En se basant sur les conditions opératoires optimales obtenues par ABDESSEMED [32] lors de la valorisation et le traitement des eaux de lavage de poissonnerie par ultrafiltration, la vitesse de recirculation sera fixée à 4 m/s pour un débit de recirculation égal à:

$$Q_v = \mu S N \text{ (m}^3\text{/s)} \quad (3.2)$$

où:

$\mu$  est la vitesse de recirculation (m/s).

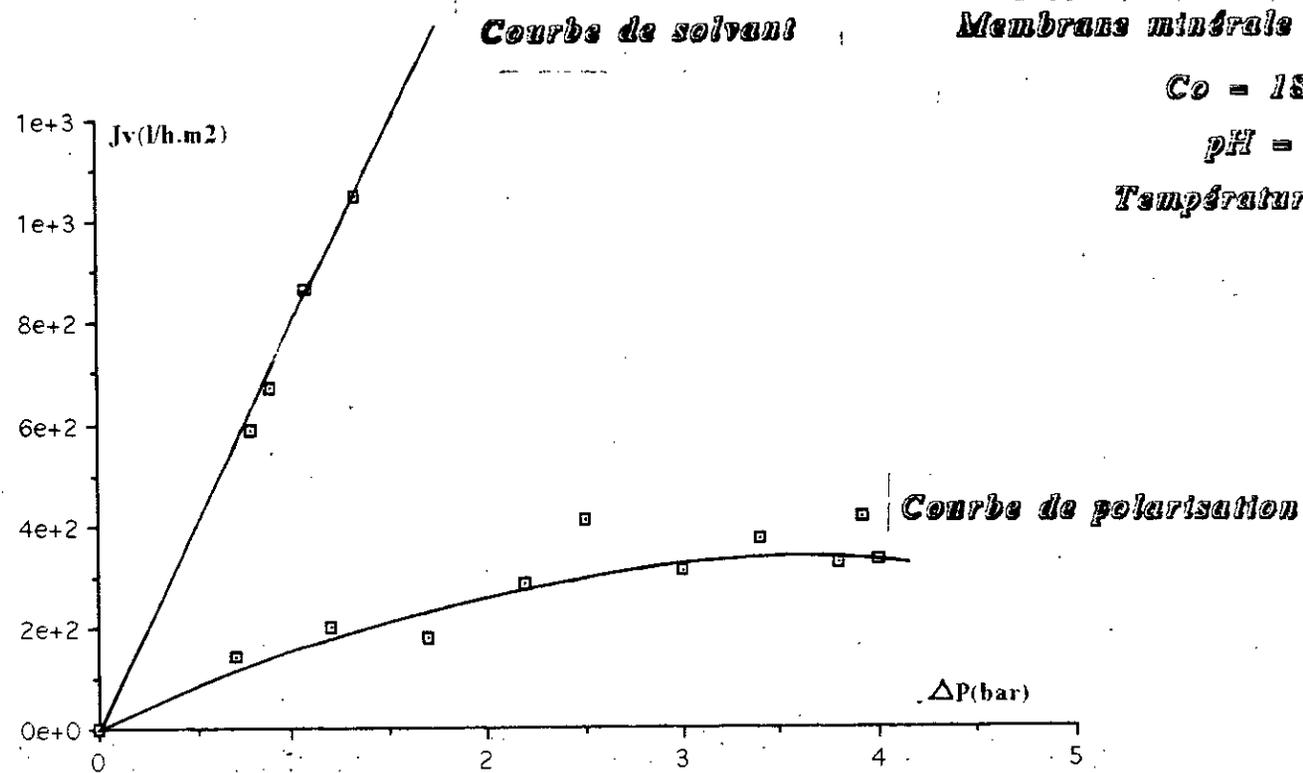
$S$  est la section du canal (m<sup>2</sup>) égale à:

$$S = \pi R^2 \quad \text{avec } R = 2 \text{ mm.}$$

$N$  est le nombre de canaux de la membrane d'ultrafiltration; dans notre cas:  $N = 19$ .

Après calcul, on obtient:  $Q_v = 3,44 \text{ m}^3\text{/h}$ .

En traçant le graphe représentant le flux du perméat  $J_v$  en fonction de la pression transmembranaire  $\Delta P$ , on remarque au début une allure linéaire qui tendra par la suite vers une valeur limite: dans l'intervalle: 3,47 à 4,00 bars, le flux de



**Fig.N°15: Flux du perméat en fonction de la pression transmembranaire**

perméation est constant et indépendant de la pression transmembranaire confirmant ainsi l'existence d'une polarisation secondaire; de plus, on remarque que le flux du perméat est plus faible que le flux du solvant, ceci s'expliquera par le phénomène de polarisation de concentration: une élévation de la pression transmembranaire entraînera l'entassement des petites molécules retenues au niveau de la membrane qui s'exprimera par une diminution du flux de perméation et par conséquent, par une diminution des performances du procédé d'ultrafiltration.

### 3.4.3. Tracé du taux de rejet observé en fonction de la pression transmembranaire:

En traçant le graphe représentant l'évolution du taux de rejet observé  $R_o$  en fonction de la pression transmembranaire, on remarque une augmentation du taux de rejet en fonction de la pression transmembranaire, ceci est dû au phénomène de polarisation de concentration qui se traduira par une augmentation du taux de rétention de la membrane (ou une diminution du taux de récupération en acides aminés et en peptides) en fonction de la pression transmembranaire.

Par conséquent, on peut dire qu'à des faibles pressions transmembranaires, l'opération d'ultrafiltration est très efficace se traduisant ainsi par un taux de récupération en acides aminés et en peptides élevé; donc, on peut dire que le procédé d'ultrafiltration est un procédé performant pour la

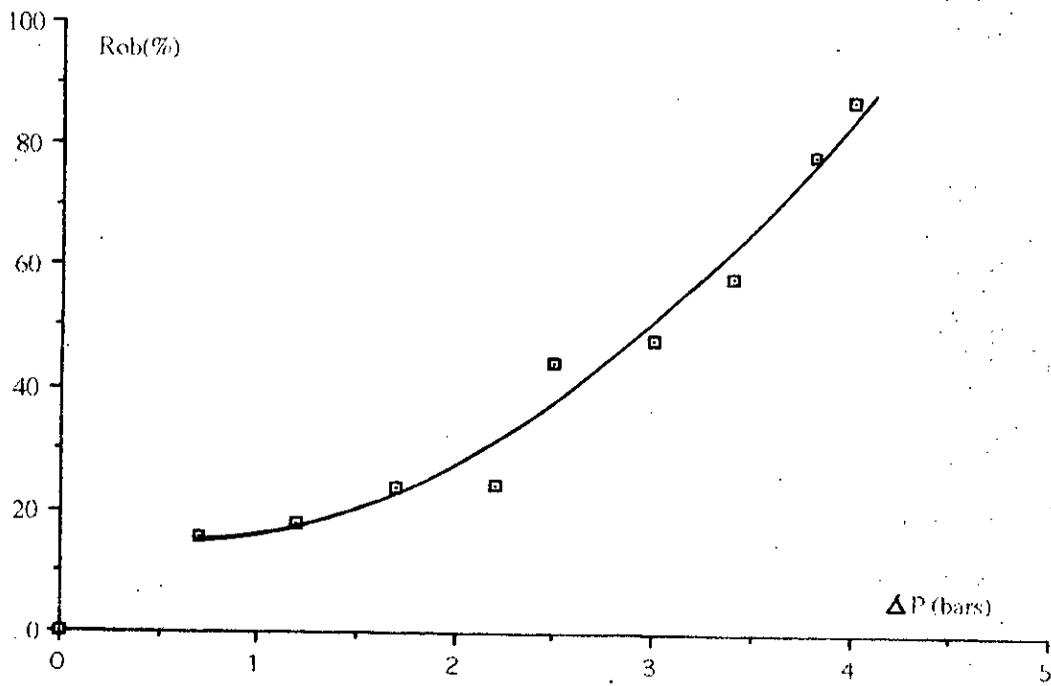


Fig. N°16: Taux de rejet observé en fonction de la pression transmembranaire

récupération des acides aminés et des petits peptides contenus dans l'hydrolysat enzymatique.

# CONCLUSION

## CONCLUSION GENERALE

Compte tenu des résultats expérimentaux obtenus, il nous semble nécessaire d'approfondir et de compléter le procédé enzymatique des rejets solides de poissonnerie; dans cette perspective, il serait très intéressant de procéder dans une première étape: à un pré-traitement efficace et rapide des rejets solides de poissonnerie qui consistera à:

- stériliser, étant donné la forte contamination fécale, le substrat protéique sans détruire les propriétés fonctionnelles des protéines; et pour cela, la tyndallisation peut être recommandée.

- centrifuger sous vide dans le but de faciliter la séparation des protéines et des lipides qui, en inhibant le procédé enzymatique, diminuent la teneur en protéines hydrolysées.

dans une deuxième étape: à des essais d'hydrolyse à l'échelle pilote au sein d'un réacteur enzymatique à membrane dans lequel l'enzyme, dans ses conditions optimales d'activité, est récupérée; de plus, une quantification des hydrolysats peptidiques, obtenus après formation d'une couche de polarisation, serait nécessaire afin d'évaluer l'efficacité du procédé enzymatique.

D'autre part, une analyse chromatographique de l'ultrafiltrat permettra de connaître le profil en acides aminés essentiels utilisés, après séchage (comme la pulvérisation), dans l'enrichissement de l'alimentation animale

(bétail); c'est pourquoi, une pleine valorisation des espèces marines présentera un grand intérêt potentiel, en vue de:

- contribuer à la lutte contre la pollution marine.
- réduire la malnutrition dans certains pays du tiers monde.
- développer l'industrie halieutique en Algérie.
- économiser les devises destinées à l'importation de concentrés protéiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. DURAND; Y. LAGOUIN: "Valorisation des sous produits de la pêche: réalisations et perspectives".  
Science et pêche. pêche marit. N°330; Janvier 1983.
- [2] T. AKAHANE; J.C. CHEFTEL: "Surimi et analogues des produits de la mer". IAA. p. 881-897; Octobre 1989.
- [3] A. WIBOUT: "Le livre des produits alimentaires: commercialisation, valeur, utilisation, consommation" Ed Max Brézol; 1986.
- [4] G.O.BUCOVE; G.M.PIGOTT: "Pilot plant production of a functional protein from fish waste by enzymatic digestion"; 1976.
- [5] M.B. HALE: "Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish protein." Food technology. vol 23, p.107-110; 1969.
- [6] E. YANEZ; D. BALLESTER; F. MONCKBERG: "Enzymatic fish protein hydrolysate: chemical composition, nutritive value and use as a supplement to cereal protein." Journal of food science, vol 41, p.1289-1292; 1976.

[7] P.A. CARROAD; R.A. TOM: "Bioconversion of shellfish chitine wastes: process conception and selection of microorganisms." Journal of food science, vol 43, p.1158-1161; 1978.

[8] L.L. LIU; G.M. PIGOTT: "Preparation and use of inexpensive crude pepsin for enzyme hydrolysis of fish." Journal of food science, vol 46; p.1569-1572; 1981.

[9] E.M. CIVIT; M.A. PARIN; H.M. LUPIN: "Recovery of protein and oil from fishery blood water waste: effect of pH and temperature." Water res, vol 16, p.809-814; 1982.

[10] K.A. ALMAS: "Application of cross flow membrane technology in the fishery industry." Desalination, vol 53, p.28-29; 1985.

[11] S. FENNOUH; O. GAOUAR: "Hydrolyse enzymatique des rejets de poissonnerie et ultrafiltration de la biomasse." PFE, ENP; Juin 1991.

[12] M.I. ANNOU: "Traitement et valorisation des rejets solides de poissonnerie par voie enzymatique." PFE, ENP; Septembre 1992.

[13] M.S. BENHABILES: "Hydrolyse enzymatique des rejets solides de poissonnerie." Thèse de Magister, ENP; 1992.

[14] P. LOUISOT: "Biochimie générale et médicale." Simep SA, vol 2; 1982.

- [15] J. KRUH: "Biochimie: études médicales et biologiques" Hermann; 1982.
- [16] F. CHAPEVILLE; H. CLAUSER: "Biochimie." Hermann; 1974.
- [17] R. SCRIBAN: "Biotechnologie." Ed lavoisier; 1988.
- [18] C. ALAIS; G. LINDEN: "Abrégés de biochimie alimentaire." Masson; 1987.
- [19] J.C. CHEFTEL; D. LORENT: "Protéines alimentaires." Ed Lavoisier; Paris 1985.
- [20] G. DURAND; P. MONSAN: "Les enzymes: production et utilisation industrielles." Gauthier-Villars, Ed Paris; 1982.
- [21] C. COSTES: "Eléments de biochimie structurale." Ed Dunod université; Paris 1978.
- [22] J. PELMONT: "Les enzymes." Presse universitaire de Grenoble; 1989.
- [23] J.H. WEIL: "Biochimie générale." Masson; 1979.
- [24] D. MAMERI: "Cours de biochimie." 4<sup>ème</sup> année, ENP, département du Génie de l'Environnement 1992.

[25] K. DENDENE: "Optimisation du procédé d'ultrafiltration pour la récupération des protéines des eaux de lavage de poissons." PFE, ENP; Juin 1990.

[26] M.L. MAUBOIS: "Séparation par filtration et par échangeur d'ions." Biofutur; Octobre 1983.

[27] K. AIT MOHAMED: "Etude des performances de l'ultrafiltration lors de la concentration des eaux de lavage de poissonnerie." PFE, ENP; Juin 1991.

[28] J.P. BRUN: "Procédés de séparation par membranes." Masson; 1989.

[29] M. DEBATISSE: "Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires." Tome 4, techniques et documentation, Ed Apria; Paris 1981.

[30] R. KAADA: "Conception et optimisation de la structure hydrodynamique d'un bioréacteur." PFE, ENP; Juin 1988.

[31] R.E. VEGA; J.G. BRENNAN: "Enzymic hydrolysis of fish offal without added water." Journal of food engineering, p.201-215; 1988.

[32] D. ABDESSEMED: "Valorisation et traitement des eaux de lavage de poissonnerie par ultrafiltration. Thèse de Magister, ENP; Juillet 1992.

## ANNEXE

### DOSAGE COLORIMETRIQUE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE FOLIN-LOWRY

**Principe:** Cette méthode utilise le fait que le réactif de FOLIN-CIOCALTEAU (mélange d'acides phosphomolybdique et phosphotungstique) mis en présence d'une protéine est réduite en un complexe bleu de molybdène [29].

Cette réaction est due principalement aux groupements phénoliques oxydés de la tyrosine; de plus, elle se produit également avec d'autres acides aminés appelés acides aminés *FOLIN-POSITIFS* comme le tryptophane, l'hydroxyproline et la cystéine [29].

Cette méthode est très sensible: 5 à 100 µg de protéines, l'intensité de la coloration dépend de la quantité d'acides aminés aromatiques présents et sa lecture se fait à 750 nm pour le maximum de sensibilité [29].

#### Mode opératoire:

##### 1. Tracé de la courbe d'étalonnage:

Pour un mélange de protéines, la solution étalon doit avoir une composition chimique qualitativement identique à celle de la solution à doser mais en pratique, la solution étalon doit seulement être de composition voisine à celle de la solution à doser.

Dans notre cas, la solution étalon est un sérum étalon de BSA dont le titre en protéines est connu puis on procède aux dilutions quantitatives suivantes:

Tube	Concentration en BSA (g/l)	solution mère(ml)	eau distillée(ml)
1	0	0	1,0
2	0,1	0,1	0,9
3	0,2	0,2	0,8
4	0,3	0,3	0,7
5	0,4	0,4	0,6
6	0,5	0,5	0,5
7	0,6	0,6	0,4
8	0,7	0,7	0,3

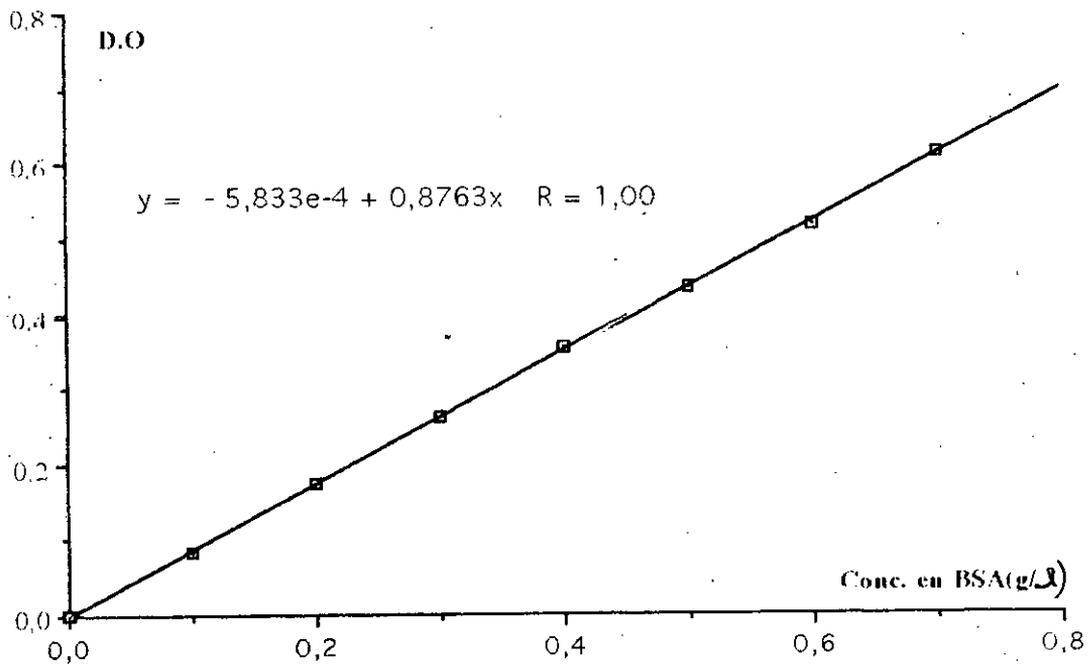
après, on ajoute dans chaque tube 5 ml de la solution C,

**Solution C:** C'est un mélange extemporané contenant 48 ml de la solution A et 2 ml de la solution B.  
**Solution A:** dissoudre 2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans 100 ml de  $\text{NaOH}$  0,1N.  
**Solution B:** -dissoudre 1g de tartrate double de Na et de K dans 100 ml d'eau distillée.  
 -dissoudre 5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans 100 ml d'eau distillée.  
 -prendre 40 ml de tartrate double de Na et K(1) et 40 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .  
 -agiter séparément puis mélanger en ajoutant (2) et (1) pour éviter la précipitation.  
 -compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

on agite puis on attend 10 minutes, on ajoute 0,5 ml du réactif de FOLIN et on agite immédiatement et vigoureusement, on laisse au repos à l'obscurité pendant 30 minutes puis on lit les densités optiques à  $\lambda = 750$  nm contre un témoin blanc.

## 2. Dosage des protéines dans l'échantillon:

Lorsque la densité optique d'un échantillon se trouve en dehors des densités optiques relatives à la courbe d'étalonnage, on procède alors à la dilution de l'échantillon puis on prélève 1 ml de cette dilution et on opère comme précédemment (voir 1); dans ce cas, la teneur en protéines de l'échantillon est obtenue par projection de la valeur de la densité optique mesurée sur la courbe d'étalonnage et multipliée par le facteur de dilution.



*Courbe d'étalonnage pour la méthode de Folin-Lowry*

## GLOSSAIRE

**BSA:** *bovine serum albumine:* est une protéine standard de structure moléculaire sphérique, d'une grande pureté (98 à 99%) et est très soluble dans l'eau. Elle contient 1,3% d'eau et 15,9% d'azote et a un poids moléculaire de 64 000 Daltons [13].

**Caséine:** *matière albuminoïde* du lait obtenue par dissociation, après égouttage et lavage, de la caillebotte (masse de lait caillé) provenant de la coagulation du lait totalement écrémé.

**Chitine:** *substance organique azotée* de la cuticule des arthropodes.

**D.C.O:** *la demande chimique en oxygène* exprime la quantité d'oxygène en mg/l nécessaire pour brûler les matières organiques biodégradables ou non et les matières minérales oxydables.

**Ensilage:** *opération* dans laquelle les viscères du poisson sont broyés puis additionnés à un mélange d'acide formique et propionique [13].

**Osmose inverse:** *l'osmose* se caractérise par la diffusion du soluté vers le compartiment le moins concentré parallèlement à la diffusion du solvant vers le compartiment le plus concentré jusqu'à ce que le système atteigne l'équilibre; par contre, le phénomène d'osmose inverse a lieu si l'on applique une pression supérieure à la pression osmotique du système ci-dessus; dans

ce cas, le solvant circule de la solution concentrée vers la solution diluée [11].

**Sorbitol:** hexitol dérivé du glucose ou du fructose par réduction de la fonction aldehydique en alcool.

**Tyndallisation:** procédé de stérilisation par une série d'échauffements à une température variant entre 60 et 80°C et de refroidissements successifs.