

UNIVERSITE DE NANTES

Ecole Polytechnique de l'Université de Nantes

ECOLE DOCTORALE

Mécanique, Thermique et Génie Civil

DE NANTES

Année 2006

Thèse de **DOCTORAT**

Label Européen

Discipline : Génie des procédés

Spécialité : Bioprocédés et biotechnologies marines

Présentée et soutenue publiquement par

DUMAY Justine

Le 17 Octobre 2006

devant l'Université de Nantes

**EXTRACTION DE LIPIDES EN VOIE AQUEUSE PAR BIOREACTEUR
ENZYMATIQUE COMBINE À L'ULTRAFILTRATION :
APPLICATION A LA VALORISATION DE CO-PRODUITS
DE POISSON (*Sardina pilchardus*)**

Jury

LUTEN J., European Business Developer, Fiskeriforskning, Tromsø, Norvège (Rapporteur)

GUADIX ESCOBAR E.M., Associate professor, University of Granada, Espagne (Rapporteur)

PIOT J.M., Professeur, Université de La Rochelle (Président)

JAOUEN P., Professeur, Université de Nantes

BERGE, J.P., Cadre de recherche, Ifremer, Nantes

BARNATHAN G., Professeur, Université de Nantes

BOURSEAU P., Professeur, Université de Bretagne Sud

Comité de Direction : JAOUEN P. (directeur), BERGE J.P. (co-directeur), BARNATHAN G. (co-directeur)

Ifremer

Département des Sciences et Techniques
Alimentaires Marines
Rue de l'île d'Yeu - BP 21105
44311 Nantes cedex 3

Université de Nantes

Laboratoire GEPEA
UMR CNRS 6144
Centre de Recherches et de Transfert de Technologie
Boulevard de l'Université - BP 406
44602 Saint-Nazaire cedex

A Papili et Quentin,

REMERCIEMENTS

I want to thanks Mr Joop Luten, European Business Developer in the Fiskeriforskning of Tromsø (Norway) and Mrs Emilia Maria Guadix Escobar, Associate professor at the University of Granada (Spain), for having kindly accepted to judge this work and for having taken part in the jury.

Je remercie également M Jean Marie Piot, Professeur à l'université de La Rochelle, et M Patrick Bourseau, Professeur à l'université de Bretagne Sud, pour avoir accepté de participer à ce jury et d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma gratitude à M Pascal Jaouen, Professeur à l'université de Nantes, pour avoir dirigé cette thèse, et pour m'avoir ouverte aux techniques de filtration membranaire. Sa disponibilité et son savoir m'ont permis l'entrée dans le domaine du génie des procédés, et son savoir universitaire m'a permis d'avoir conscience des objectifs à atteindre lors de la réalisation d'un travail de thèse.

Toute ma reconnaissance s'adresse à M Jean-Pascal Bergé, cadre de recherche à l'Ifremer, pour m'avoir confié ce sujet de recherche, ses précieux conseils et sa responsabilité scientifique tout au long de ce travail. Je le remercie également pour les responsabilités qu'il m'a données tout au long de ces années, m'ouvrant ainsi sur le monde professionnel.

J'adresse mes sincères remerciements à M Gilles Barnathan, professeur à l'université de Nantes pour sa place dans l'équipe de direction de ce travail. Son enthousiasme et son infaillible confiance m'ont été d'une grande aide durant ces trois années. Je le remercie également pour les innombrables connaissances lipidiques qu'il a apportées à ce travail et pour sa grande disponibilité.

I want to thank Mrs Turid Rustad, Associate professor at the Trondheim university, in Norway, for having welcomed me during three months in the beginning of this work. Her knowledge in enzymes and protein fields helped me a lot to start. Thanks also to my roomies, especially Lucia, for having taken care on me in loneliness periods, our long talks and the discovery of the Italian, Chinese Hungarian and Equatorian food!

Je souhaite aussi remercier M Jean-Luc Vallet, directeur du département STAM et M Jack Legrand, directeur du laboratoire GEPEA, pour leur accueil au sein de leurs laboratoires et la confiance qu'ils m'ont accordée pour la réalisation de ce projet.

Je remercie vivement M Jean-Vincent Chantreau, directeur scientifique de la société Euro Seafood Trading, pour m'avoir fourni un financement durant ces trois années.

Je tiens aussi à remercier tout le personnel du centre Ifremer de Nantes et celui du centre de recherche et de transfert technologique de Saint Nazaire autant pour leur aide que pour leur accueil.

J'adresse de sincères remerciements à Malou, Piotr, Diane, Lucie, Serge et Nathalie pour leur aide dans l'analyse des lipides, leurs multiples connaissances, et tout simplement leur sympathie.

Je remercie profondément Sylvie, qui, passée avant moi, m'a permis d'avoir un aperçu sur les choses à faire et à ne pas faire. Un grand merci également pour son amitié et sa présence durant mes années « pré-thèse ». Merci également à Céline pour ses conseils toujours avisés et sa position déstressante face à la situation d'un thésard.

Un grand merci également à tous les stagiaires qui ont eu l'amabilité, pendant ces trois ans, de passer un petit moment sur ce sujet, de me donner leur avis et, parfois, leur solutions. Merci également d'avoir accepté d'avancer sur des terrains parfois glissants. Merci à Séverine, David, Marion, Johann, Michael et Julianne.

Trois ans de thèse, c'est également trois ans de travail en équipe, je voudrais tout particulièrement remercier toutes les personnes rencontrées dans les laboratoires et n'ayant jamais cillé pour m'apporter leur aide précieuse : Merci à Claire pour sa présence quotidienne, son amitié et son aide pour la réalisation de nombreuses manipes. Merci à Jojo pour son oreille toujours ouverte et son attention continue envers moi. Merci à Mireille pour ses conseils, son soutien et sa disponibilité permanente. Merci à Régis pour son aide mathématique. Merci à Christine pour toutes ses connaissances sur les protéines, ses données biblio et son point de vue « industriel » des choses. Merci à Maryse pour tous ses conseils membranaires, ses grandes disponibilité et réactivité. Merci à Françoise, Fred, Jean-Jacques et Sébastien, les microbiologistes, pour leur aide bactéricide et leurs nombreux conseils, Merci à Dédé et Annie pour leur grande expérience en laboratoire et leurs précieux conseils, Merci à Isabelle, Christine et Isabelle pour leur aide administrative et leur gentillesse et en souvenir de nos longues conversations, Merci à Max et Jean-Yves pour avoir toujours trouvé du temps pour les multiples réparations nécessaire durant ces trois ans, Merci enfin à Nolwenn et Jean-Paul pour leur aide dans la dernière ligne droite de mes manipulations, et leur connaissance en GC-MS.

Alex, Peggy, Sandrine, merci simplement de votre présence quotidienne au cours de ces trois années. Notre soutien, notre entraide, parfois, et nos moments de délire, souvent, ont fait naître entre nous une amitié sincère. Merci, merci, merci.

Je souhaite également remercier toutes les personnes ayant côtoyé la salle thé, pour ce moment de détente et de complicité quotidien. Un merci tout particulier à Allegra, qui outre son amitié m'a offert sa disponibilité et l'amabilité de revoir mes écrits anglais.

Je remercie également les « Nantais », pour m'avoir permis l'évasion du monde scientifique. A ce titre, merci à Leeloo, Dim, Camille, Manu et tous les membres du PhotoClub Nantais.

Enfin, un immense merci à tous mes proches, pour leur soutien et leur patience (il en a fallu, je sais...). Merci à Jérôme, Frantz et Doudou, Quentin, Yec'hed mat, Maminette et Papili, Zouzou, Calou et Mat', les Dumay, Jean-Pierre et Françoise, Estelle, Eric et Côte, Béragère, Véro, Sylvain, Emilie et Camille, Fab et Oliv', Chrystèle, les Ardennais, les Courcheux, les Tartitiens et les Furieux. Merci à tous de votre présence à mes cotés.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein du département des Sciences Techniques et Alimentaires Marines (STAM) du centre Ifremer de Nantes et du laboratoire de GENIE des Procédés Environnement Agroalimentaire (GEPEA, UMR CNRS-6144) localisé au centre de recherche de transfert technologique de Saint-Nazaire. Ces deux laboratoires participent au projet Européen Valbiomar (Valorisation biotechnologiques des ressources marines), programme d'initiative communautaire Interreg III B.

A ce jour, ce travail a donné lieu à la publication d'un article dans une revue internationale et à deux conférences orales dans des congrès de rang international :

J. Dumay, C. Donnay-Moreno, G. Barnathan, P. Jaouen, J.P. Bergé. (2006). Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*. Sous presse.

J. Dumay, G. Barnathan, P. Jaouen, J.P. Bergé. (2006). A new mild procedure to get quantitative lipidic and peptidic fractions from sardine (*Sardina pilchardus*) heads. *Second Joint Trans Atlantic Fisheries Technology Conference*. Québec, Canada, Octobre 2006.

J. Dumay, A. Lheriau, G. Barnathan, P. Jaouen, J.P. Bergé. (2005). What could be the benefit of using enzymes for extracting lipids from fatty fish by-products? *35th West European Fish Technologists Association meeting*. Antwerp, Belgium, Septembre 2005.

Un poster a également été présenté lors des doctoriales des Pays de la Loire :

J. Dumay, J.P. Bergé, G. Barnathan, P. Jaouen. (2004). Production et extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique; application à la valorisation de co-produits et eaux de procédés de l'industrie de transformation du poisson. *Doctoriales des Pays de la Loire*. La Roche sur Yon, France, Septembre 2004.

Pour mener à bien ce travail, notamment concernant la conduite des hydrolyses et des analyses enzymologiques, une bourse Marie Curie pour un stage d'une durée de 3 mois a été obtenue. Ce stage a été effectué au laboratoire de biotechnologie de l'université des sciences et techniques de Trondheim, en Norvège, sous la responsabilité du professeur Turid Rustad.

Une collaboration a été entreprise avec le centre technologique des produits aquatiques de Gaspé, Québec, Canada. Ce travail, encore en cours actuellement, porte sur la comparaison de différentes méthodes de dosage des lipides de plusieurs matrices distinctes.

Ce travail a également permis la réalisation d'une collaboration avec l'Université de Sfax où l'hydrolyse des viscères de sardine réalisée durant cette thèse sera comparée avec l'hydrolyse des viscères de seiche (*Sepia officinalis*) réalisée durant la thèse d'Emna Soufi-Kéchaou, en co-tutelle Franco-Tunisienne.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du programme européen SEAFOODplus (No FOOD-CT-2004-506359), intégré dans le 6^{ème} PRCD, dans le 4^{ème} « pillard » nommé « ProPepHealth : High-added value functional seafood products for human health from seafood by-products by innovative mild processing ».

Cette thèse a été financée par la société Euro Seafood Trading, dans le cadre d'une collaboration avec le centre Ifremer de Nantes en vue de la valorisation des petits pélagiques gras par leur transformation en produits alimentaires intermédiaires.

RESUME

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des co-produits issus de la chaîne de transformation de sardine (*Sardina pilchardus*) en surimi par la mise en œuvre de techniques douces visant à un investissement et une dépense énergétique modérés afin d'obtenir des composés d'intérêt.

Les techniques d'hydrolyse enzymatique et de séparation membranaire ont été choisies pour cette étude. Les enzymes retenues ont tout d'abord été étalonnées de façon à déterminer leurs conditions opératoires optimales sur substrat modèle. Les hydrolyses ont ensuite été menées en deux étapes, une première pour déterminer l'efficacité des enzymes sur les matrices visées et cibler le domaine d'étude, la seconde étape a porté sur la détermination des meilleures conditions d'hydrolyse par plan d'expériences avec pour objectif d'obtenir la libération de lipides la plus importante possible. Une fois ces conditions déterminées, la phase soluble résultant de cette hydrolyse a été traitée par ultrafiltration afin de séparer les lipides des peptides. L'étude de l'ultrafiltration des effluents de la chaîne de transformation de sardine a également été réalisée.

Les lipides des têtes et viscères de sardine ont majoritairement été récupérés dans les phases liquides résultant de l'hydrolyse. La fraction aqueuse a de plus montré une forte teneur en phospholipides. Les acides gras de la famille des $\omega 3$ sont représentés à hauteur de 20% dans ces fractions. Concernant les matrices difficiles à broyer, l'extraction des lipides a été améliorée en réalisant une hydrolyse enzymatique plutôt qu'une extraction par solvants. Le traitement par ultrafiltration de la phase soluble a permis, après détermination des paramètres opératoires, de séparer les fractions lipidiques et peptidiques en concentrant les phospholipides dans le rétentat. Le traitement des eaux de lavage par ultrafiltration a de plus permis la récupération d'une fraction protéique intéressante, tout en dépolluant significativement les eaux de rejet.

La présente étude a ainsi permis de proposer un procédé d'extraction de lipides à partir de co-produits de poisson en utilisant des techniques non agressives. L'originalité de ce travail de thèse réside d'une part dans l'extraction des lipides par voie aqueuse et d'autre part, dans la combinaison de l'hydrolyse enzymatique à l'ultrafiltration

Mots clés : *Sardina pilchardus*, lipides, enzymes, ultrafiltration, co-produits, valorisation

Discipline : Génie des bioprocédés

ABSTRACT

This work is conducted in the framework of the sardine (*Sardina pilchardus*) by-products up-grading from surimi production using mild procedure, environmentally sound, in order to obtain valuable compounds such as lipids and peptides involving moderate investment and low energy consumption.

Hydrolysis and ultrafiltration techniques have been investigated. Firstly, selected enzymes have been calibrated in order to determine their optimal conditions with a model substrate and to allow the comparison between them. Then, hydrolysis on sardine heads and viscera has been carried out in two steps. The first one had the objective to determine the enzyme efficiency and the study area. The second step was to optimise enzymatic hydrolysis using experimental designs. The aim of this second step was to obtain the highest lipid recovery in the liquid fractions using the variation of the influents hydrolysis. The soluble phases obtained after this step have been filtered using ultrafiltration technique in order to separate lipids from peptides. The ultrafiltration of wash water has also been studied.

Lipids from sardine by-products have been mainly recovered in the liquid fractions of the hydrolysates. Moreover, aqueous fraction has shown a high content of phospholipids. $\omega 3$ Fatty acids represent around 20% of the total fatty acids into those fractions. Regarding viscera, which is a hardly crushing matrix, the lipid extraction yields have been improved using enzymatic treatment compared to solvent extraction. The ultrafiltration treatment of the soluble phase has allowed, after the determination of operating conditions, to separate lipids from peptides and to concentrate the phospholipids in the retentate. The ultrafiltration of the wash water has allowed to recover an interesting proteinic fraction and the polluting load of effluents has been significantly reduced.

The present study has allowed to propose a lipid extracting process using mild procedures from fish by-products. The originality of this PhD work is, on the one hand, the aqueous lipid extraction and on the other hand, the combination of enzymatic hydrolysis to ultrafiltration.

Keywords : *Sardina pilchardus*, lipids, enzymes, ultrafiltration, by-products, up-grading

Discipline : Bioprocess engineering

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES.....	6
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES ABREVIATION.....	18
NOMS USUELS ET TRIVIAUX DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS PRESENTES DANS CE MEMOIRE	20
INTRODUCTION.....	21
1. INTRODUCTION GENERALE	21
2. OBJECTIFS DE L'ETUDE	25
2.1. <i>Obtention des co-produits de sardine générés par le procédé de fabrication de surimi base – Sardine by-products obtention during surimi base process</i>	25
2.2. <i>Détermination de l'activité protéolytique des enzymes et des co-produits de sardine – Proteolytic activity of commercial enzymes and by-products determination</i>	26
2.3. <i>Hydrolyse des co-produits solides : hydrolyse longue durée, utilisation combinée des enzymes et optimisation – Solid by-products hydrolysis : long time hydrolysis, enzyme combination utilization and optimisation.....</i>	27
2.4. <i>Traitement des fractions liquides par ultrafiltration – Ultrafiltration of liquid fractions.....</i>	28
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	30
1. LES CO-PRODUITS D'ORIGINE MARINE	30
1.1. <i>La pêche et l'aquaculture dans le monde.....</i>	30
1.1.1. Intérêt du poisson	30
1.1.2. Production de poisson : quelques chiffres.....	30
1.1.3. La sardine commune (<i>Sardina pilchardus</i>).....	34
1.2. <i>Les co-produits : utilisation actuelle et valorisation potentielle.....</i>	36
1.2.1. Qu'appelle-t-on co-produit et quelles sont les contraintes de collecte ?.....	36
1.2.2. Les voies de valorisation des co-produits : produits dérivés.....	39
1.2.3. Farines et huiles de poisson.....	39
1.2.3.1. Procédé de fabrication	40
1.2.3.2. Les farines de poisson	41
1.2.3.3. Les huiles de poisson.....	42
1.2.4. Les hydrolysats.....	44
1.2.4.1. Définition	44
1.2.4.2. Les autolysats et produits fermentés	45
1.2.4.3. Les hétérolysats	45
1.2.5. Les hachis	50
1.2.6. Production de composés de haute valeur ajoutée.....	50
1.2.6.1. Chitine / Chitosan.....	50
1.2.6.2. Collagènes et gélatine.....	51
1.2.6.3. Les peptides.....	52
1.2.6.3.1. Source azotée.....	53
1.2.6.3.2. Intérêt nutritionnel et alimentaire	53
1.2.6.3.3. Intérêt fonctionnel	55
1.2.6.3.4. Activités biologiques.....	56

1.2.6.4. Les acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$	57
1.2.6.4.1. Pourquoi les $\omega 3$ et $\omega 6$ sont-ils importants ?.....	57
1.2.6.4.2. Quelles sont les activités biologiques de ces acides gras ?	57
1.2.6.4.3. Où trouver ces acides gras dans les co-produits de poisson ?.....	60
1.2.6.5. Les phospholipides	62
1.2.6.6. Autres molécules lipidiques d'intérêt.....	63
1.2.6.7. Valorisation aromatique	64
1.2.6.8. Autres exemples de produits dérivés à haute valeur ajoutée.....	65
2. LA VALORISATION DES CO-PRODUITS DE POISSON PAR TECHNIQUES DOUCES	66
2.1. <i>L'hydrolyse enzymatique par les protéases</i>	66
2.1.1. Les enzymes : définition et classification	66
2.1.2. Principe de l'hydrolyse enzymatique	67
2.1.3. Pourquoi suivre l'évolution de l'hydrolyse ?	67
2.1.4. Les paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique	68
2.1.4.1. Influence de la température sur la réaction enzymatique	69
2.1.4.2. Influence du pH sur l'action des enzymes	70
2.1.4.3. Comment influe la concentration en enzyme sur la réaction enzymatique ?	70
2.1.4.4. Quels sont les principaux modes d'activation et d'inhibition des enzymes ?	71
2.1.5. Les différents réacteurs enzymatiques	71
2.1.5.1. Modes de conduite des réacteurs.....	72
2.1.5.1.1. Réacteurs en « batch ».....	72
2.1.5.1.2. Réacteurs en « fed batch ».....	72
2.1.5.1.3. Réacteurs continus et combinaison bioréacteur enzymatique / UF.....	72
2.1.5.2. Les différents types de réacteurs	74
2.1.5.3. L'agitation dans les réacteurs enzymatiques	74
2.2. <i>La filtration membranaire</i>	76
2.2.1. Définition et principaux modes de filtration	76
2.2.2. L'ultrafiltration (UF)	79
2.2.2.1. Les modules.....	81
2.2.2.2. Structure des membranes	83
2.2.2.3. Circulation des fluides dans les modules d'ultrafiltration.....	84
2.3. <i>Nettoyage des membranes</i>	86
2.3.1. Couche de polarisation et colmatage.....	86
2.3.2. Comment nettoyer les membranes d'ultrafiltration ?.....	87
MATERIEL ET METHODES.....	89
1. MATERIEL BIOLOGIQUE	89
1.1. <i>Préparation des co-produits solides de sardine (Sardina pilchardus)</i>	89
1.2. <i>Homogénéisation et broyage des matrices</i>	90
1.3. <i>Obtention des co-produits liquides</i>	90
2. MATERIEL ENZYMATIQUE.....	91
2.1. <i>Protamex</i>	91
2.2. <i>Alcalase</i>	92
2.3. <i>Flavourzyme</i>	92
2.4. <i>Papaïne</i>	93
3. DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DES ENZYMES ET DES MATRICES	93
3.1. <i>Activités spécifiques des enzymes commerciales</i>	93
3.2. <i>Activité protéolytique des co-produits de sardine</i>	95

4. HYDROLYSES ENZYMATIQUES	96
4.1. Equipement et installation.....	96
4.2. Suivi de la cinétique des hydrolyses	97
4.3. Hydrolyses longue durée	98
4.4. Optimisation des hydrolyses.....	98
4.4.1. Principe de la méthodologie des plans d'expériences	98
4.4.2. Paramètres étudiés	100
5. ULTRAFILTRATION	103
5.1. Filtration de l'hydrolysate de têtes de sardine	103
5.1.1. Essais préliminaires : choix du seuil de coupure.....	103
5.1.1.1. Equipement.....	103
5.1.1.2. Mode opératoire	104
5.1.2. La filtration avec le pilote Minim [®]	104
5.1.2.1. Equipement.....	104
5.1.2.2. Normalisation des données.....	107
5.1.2.3. Nettoyage de la cassette	108
5.1.2.4. Détermination de la perméabilité à l'eau	110
5.1.2.5. Détermination des conditions de filtration	110
5.1.2.6. Diafiltration/concentration	111
5.2. Traitement des effluents de la chaîne de production de surimi.....	111
5.2.1. Equipement.....	111
5.2.1.1. Le module.....	111
5.2.1.2. Les membranes.....	113
5.2.1.3. Protocole de nettoyage des membranes	113
5.2.1.4. Protocole d'évaluation des effets de l'adsorption sur les différents matériaux des membranes et seuils de coupure.....	114
5.2.1.5. Solubilisation de la matière solide contenue dans le culot C1 par hydrolyse enzymatique	114
6. ANALYSES BIOCHIMIQUES.....	115
6.1. Détermination de la teneur en eau	115
6.2. Analyse des lipides	115
6.2.1. Extraction des lipides	115
6.2.2. Fractionnement des lipides en chromatographie liquide.....	116
6.2.3. Dosage des Phospholipides	117
6.2.4. Analyse des classes de lipides par CCM-FID	118
6.2.5. Analyse des acides gras par CPG-FID et CPG-SM	120
6.2.5.1. Dérivation des acides gras	120
6.2.5.2. Analyse des esters méthyliques d'acides gras par CPG	120
6.2.5.2.1. CPG-FID	120
6.2.5.2.2. CPG-SM	122
6.3. Analyse des protéines.....	124
6.3.1. Dosage des protéines totales	124
6.3.2. Dosage des protéines solubles.....	125
6.3.3. Analyse des poids moléculaires des peptides solubles par FPLC	126
RESULTATS ET DISCUSSION	127
1. OBTENTION DES CO-PRODUITS DE SARDINE GENERES PAR LE PROCEDE DE FABRICATION DE SURIMI BASE.....	127
1.1. Bilan massique de la chaîne de transformation.....	127
1.2. Caractérisation biochimique des matrices étudiées.....	129

1.2.1. Les co-produits solides : les têtes et les viscères de sardine	129
1.2.1.1. Protéines, lipides et cendres	129
1.2.1.2. Analyse des lipides	130
1.2.1.2.1. Lipides totaux	130
1.2.1.2.2. Lipides neutres, glycolipides et phospholipides	132
1.2.2. Les effluents de la chaîne de production	134
1.3. Discussion	135
2. DETERMINATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES ENZYMES ET DES CO-PRODUITS SOLIDES DE SARDINE	140
2.1. <i>Activité spécifique des enzymes commerciales</i>	141
2.1.1. Effet de la concentration en enzyme	141
2.1.2. Effet de la température	143
2.1.3. Effet du pH	145
2.2. <i>Activité protéolytique endogène</i>	147
2.3. Discussion	147
2.3.1. Activité spécifique des enzymes commerciales	147
2.3.2. Activité spécifique des enzymes endogènes	151
3. HYDROLYSE DES CO-PRODUITS SOLIDES : HYDROLYSE LONGUE DUREE, UTILISATION COMBINEE DES ENZYMES ET OPTIMISATION	155
3.1. <i>Hydrolyse des têtes de sardine</i>	155
3.1.1. Hydrolyses mono-enzymatiques	155
3.1.1.1. Cinétique et répartition de la matière	155
3.1.1.2. Libération des lipides	158
3.1.1.3. Distribution des phospholipides	159
3.1.1.4. Répartition des acides gras	160
3.1.1.5. Profils moléculaires des peptides	161
3.1.1.6. Discussion	163
3.1.2. Hydrolyses multi-enzymatiques : effet de la conjugaison des enzymes	172
3.1.2.1. Cinétique et répartition de la matière	172
3.1.2.2. Libération des lipides	174
3.1.2.3. Distribution des phospholipides	175
3.1.2.4. Profils moléculaires des peptides	175
3.1.2.5. Discussion	176
3.1.3. Optimisation de l'hydrolyse	181
3.1.3.1. Conduite du plan d'expériences et détermination des conditions optimales	181
3.1.3.2. Réalisation de l'hydrolyse dans les conditions prédites par le logiciel	186
3.1.3.2.1. DH, lipides et phospholipides libérés	186
3.1.3.2.2. Analyse des acides gras totaux	187
3.1.3.2.3. Analyse des classes de lipides	188
3.1.3.2.4. Analyse des peptides	192
3.1.3.3. Discussion	193
3.2. <i>Hydrolyse des viscères de sardine</i>	202
3.2.1. Hydrolyses mono-enzymatiques	202
3.2.1.1. Cinétique et répartition de la matière	202
3.2.1.2. Libération des lipides	204
3.2.1.3. Distribution des phospholipides	205
3.2.1.4. Répartition des acides gras	206
3.2.1.5. Répartition des poids moléculaires des peptides	207
3.2.1.6. Discussion	210

3.2.2. Hydrolyses multi-enzymatiques : effet de la conjugaison des enzymes	218
3.2.2.1. Cinétique et répartition de la matière	218
3.2.2.2. Libération des lipides	220
3.2.2.3. Distribution des phospholipides	221
3.2.2.4. Répartition des poids moléculaires des peptides	222
3.2.2.5. Discussion	222
3.2.3. Optimisation de l'hydrolyse	226
3.2.3.1. Conduite du plan d'expériences	226
3.2.3.2. Détermination des conditions optimales	229
3.2.3.3. Discussion	230
4. TRAITEMENT DES FRACTIONS LIQUIDES PAR ULTRAFILTRATION	234
4.1. <i>Séparation des fractions lipidique et peptidique de la fraction soluble issue de l'hydrolyse des co-produits de sardine</i>	235
4.1.1. Essais préliminaires	235
4.1.1.1. Choix du seuil de coupure	235
4.1.1.2. Diafiltration	237
4.1.1.3. Discussion	238
4.1.2. Filtration de l'hydrolysate de têtes de sardine	239
4.1.2.1. Nettoyage de la membrane	240
4.1.2.2. Filtration de l'hydrolysate de têtes de sardines	242
4.1.2.2.1. Détermination des conditions de filtration	242
4.1.2.2.2. Choix de la cascade de procédé	244
4.1.2.3. Discussion	250
4.1.2.3.1. Nettoyage du système	250
4.1.2.3.2. Filtration de l'hydrolysate de têtes de sardine	253
4.2. <i>Recherche de voies de valorisation des eaux de lavage de la chaîne de fabrication de surimi</i>	260
4.2.1. Sélection des membranes	260
4.2.1.1. Flux de solvant, réduction du rayon de pore	261
4.2.1.2. Ultrafiltration des eaux de lavage	263
4.2.1.3. Régénération des membranes	264
4.2.1.4. Analyses biochimiques	265
4.2.1.5. Discussion	266
4.2.2. Mise en œuvre de la membrane RC 70 PP pour le traitement UF des effluents issus de la chaîne de transformation de la sardine	269
4.2.2.1. Traitement de l'eau de lavage S2	269
4.2.2.2. Hydrolyse du culot C1 et traitement du surnageant résultant	271
4.2.2.3. Discussion	272
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	276
BIBLIOGRAPHIE	284

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principales étapes de la fabrication du surimi base et récupération des principaux co-produits solides et liquides.....	22
Figure 2 : Production mondiale des pêcheries en millions de tonnes provenant des pêches de capture et de l'aquaculture de 1950 à nos jours (FAO fisheries departement - 2005). <i>Fisheries global production in million tonnes from 1950 to our days</i>	31
Figure 3 : Délimitation de la zone de pêche FAO n°27 : Atlantique Nord-Est (FAO fisheries departement - 2005). <i>FAO area n°27 limits : North East Atlantic ocean</i>	32
Figure 4 : Production des pêches de capture en millions de tonnes de la zone Atlantique Nord-Est provenant de 1950 à nos jours en fonction des groupes d'espèces déterminées par le ISSCAAP (International Standard Statistical Classification of Aquatic Animal and Plants of FAO) (FAO fisheries departement - 2005). <i>North East Atlantic fisheries production from 1950 to our days, according to the ISSCAAP classification</i>	33
Figure 5 : Ventes totales en tonnes des produits de la pêche et de l'aquaculture en France en 2004 (OFIMER - 2006). <i>French total products (in tonnes) from fisheries and aquaculture sales in 2004</i>	33
Figure 6 : Principales espèces de poisson vendues dans les halles à marée françaises en 2005 (OFIMER - 2006). <i>Main fish species sold at french auction in 2005</i>	34
Figure 7 : Photographie de sardine (<i>Sardina pilchardus</i>). <i>Sardine picture</i>	34
Figure 8 : Tonnages annuels des captures de sardine (<i>Sardina pilchardus</i>) en Atlantique Nord Est de 1950 à 2004 (données FIGIS, site FAO). <i>North East Atlantic annual sardine captures from 1950 to our days</i>	35
Figure 9 : Principaux co-produits de poisson. <i>Main fish by-products</i>	37
Figure 10 : Proportions des différentes voies de valorisation des co-produits d'origine marine (Andrieux - 2004). <i>Different marine by-products up-grading fields</i>	38
Figure 11 : Procédé de fabrication d'huiles et de farines de poisson. <i>Fish meal and oil process</i>	40
Figure 12 : Production de farines de poisson par les 5 plus gros pays producteurs de 2000 à 2005 (source globefish.org). <i>Fish meal production by the 5 main producers during the 5 last years</i>	41
Figure 13 : Production d'huiles de poisson par les 5 plus gros pays producteurs de 2000 à 2005 (source globefish.org). <i>Fish oil production by the 5 main producers during the 5 last years</i>	43
Figure 14 : Utilisation des huiles de poisson durant la période 1990-2010 (Source IFFO). <i>Fish oil utilization from 1990 to 2010</i>	44
Figure 15 : Désacétylation de la chitine en chitosane. <i>Chitin deacetylation in chitosane</i>	50
Figure 16 : Biosynthèse des eicosanoïdes d'après Yongmanitchai et Ward - 1989. <i>Eicosanoids biosynthesis</i>	60
Figure 17 : Représentation schématique de la membrane plasmique (source encarta). <i>Cellular membrane representation</i>	62
Figure 18 : Schéma réactionnel de la libération de protons H ⁺ lors de l'hydrolyse enzymatique. <i>Proton liberation during enzymatic hydrolysis</i>	67
Figure 19 : Influence de la température sur la réaction enzymatique (Cuvellier - 1999). <i>Effect of temperature on enzymatic reaction</i>	69
Figure 20 : Variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction du pH (Cuvellier - 1999). <i>Rate variation of enzymatic reaction according to pH</i>	70
Figure 21 : Effet de la concentration en enzyme sur la quantité de substrat formé au cours du temps (A) et sur la vitesse de réaction (B) (Cuvellier - 1999). <i>Enzyme concentration effect on transformed substrat and on reaction rate</i>	71

Figure 22 : Différentes catégories de bioréacteurs à membranes. A : contact direct ; B : diffusion. <i>Different membrane bioreactor. A: direct contact; B: diffusion</i>	73
Figure 23 : Différents mobiles d'agitation (Leveau et Bouix - 1999). <i>Examples of agitation mobiles</i>	76
Figure 24 : Classement des procédés de séparation par membrane (Jaouen - 1989). <i>Membrane processes classification</i>	77
Figure 25 : Mécanismes de transfert sélectif au passage d'une membrane sous l'effet de la pression. Exemple des filtrations frontale et tangentielle. <i>Selective transfer mechanisms under pressure in frontal and tangential filtration</i>	80
Figure 26 : Représentation du taux de rétention d'une membrane. <i>Membrane retention rate</i>	81
Figure 27 : Différents modules utilisés en ultrafiltration. A : plan, B : tubulaire, C : spiralé, D : fibre creuse. <i>Ultrafiltration modules</i>	82
Figure 28 : Représentation schématique des différences de perméabilité entre un solvant pur et un fluide biologique. <i>Permeability of pure solvent and real fluid</i>	85
Figure 29 : Différents phénomènes de colmatage. A : Adsorption, B : formation d'un gâteau, C : obstruction des pores. <i>Fouling phenomenons : A : adsorption, B : cake formation, C : pore obstruction</i>	86
Figure 30 : Photographies des différentes parties obtenues après filetage de sardines (<i>Sardina pilchardus</i>) : filet, têtes et viscères. <i>Sardine parts obtained after filleting ; filet, heads and viscera</i>	89
Figure 31: Localisation de la zone de capture des sardines utilisées pour l'étude selon la répartition des zones de pêches classées par la FAO (www.fao.com). <i>FAO fishing areas</i>	90
Figure 32 : Schéma de traitement des effluents issus de la première eau de lavage de la production de surimi. <i>Effluents from first surimi production waste water treatment</i>	91
Figure 33 : Installation réalisée au laboratoire pour l'hydrolyse enzymatique contrôlée. <i>pHstat installation for enzymatic hydrolysis</i>	96
Figure 34 : Représentation d'un plan central composite en 3 dimensions.....	100
Figure 35 : Morphologie de la membrane Omega m-PES PALL®. A : vue de face ; B : vue de dessus. <i>PES membrane morphology</i>	103
Figure 36 : Schéma de fonctionnement du pilote Omega (PALL®). <i>Operating scheme of Omega pilot</i>	104
Figure 37 : Installation du pilote de filtration Minim®. <i>Minim® pilot installation</i>	105
Figure 38 : Schéma de fonctionnement du système d'ultra-filtration avec le pilote Minim®. <i>Operating scheme of Minim® ultrafiltration system</i>	105
Figure 39 : Cassette d'ultrafiltration Centramate screen channel PALL®. <i>Centramate screen channel ultrafiltration cartridge</i>	106
Figure 40 : Structure de la cassette OMEGA Centramate Screen Channel PALL®. <i>Omega centramate screen channel cartridge structure</i>	106
Figure 41 : Variation de la viscosité de l'eau en fonction de la température. <i>Water viscosity variation according temperature</i>	107
Figure 42 : Installation du module Rayflow® 100. <i>Rayflow® 100 installation</i>	112
Figure 43 : Schéma de fonctionnement du système Rayflow® 100 (T : sonde de température, P : capteur de pression). <i>Rayflow® 100 operating scheme</i>	113
Figure 44 : Courbe étalon du dosage des PL par la méthode au ferrothiocyanate d'ammonium. <i>Calibration curve for phospholipid assay</i>	117
Figure 45 : Comparaison des modes de détection FID (A) et SM (B) de la chromatographie en phase gazeuse. <i>Comparison between FID (A) and MS (mass spectrometry)(B) detection</i>	123

- Figure 46 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Bradford. *Calibration curve for Bradford protein assay* 126
- Figure 47 : Schéma des étapes unitaires de la chaîne pilote de fabrication du surimi mis en place par Ifremer et Euro Seafood Trading (Eymard - 2003) et visualisation des sorties des co-produits solides (en rouge) et liquides (en bleu) générés par ce procédé. *Sardine transformation process in surimi and visualization of by-products generated (red and blue arrows)* 128
- Figure 48 : Distribution des lipides, protéines et cendres dans les viscères et les têtes de sardine. *Lipid, peptide and ash distribution in sardine viscera and heads* 129
- Figure 49 : Répartition des classes de lipides dans les co-produits de sardine. *Lipid class distribution in sardine by-products* 132
- Figure 50 : Distribution de la charge en lipides, protéines et cendres dans l'eau de lavage S2 et dans le culot C1 issus de la chaîne de fabrication de surimi de sardine. *Lipid, protein and ash content in the washing water S2 and in the sludge C1 from surimi production* 135
- Figure 51 : Effet de la concentration en enzyme sur l'activité de Protamex à pH 8 et 50°C (A), Alcalase à pH8 et 50°C (B) et Flavourzyme à pH8 et 40°C (C). *Effect of enzyme concentration on Protamex (A), Alcalase (B) and Flavourzyme (C) activities* 142
- Figure 52 : Effet de la température sur l'activité de Protamex (A), Alcalase (B) et Flavourzyme (C). Tests réalisés à pH 8 pour des ratios E/S de 0,1% pour Alcalase et Protamex et de 1,5% pour Flavourzyme. *Effect of temperature on Protamex (A), Alcalase (B) and Flavourzyme (C) activities* 144
- Figure 53 : Effet du pH sur l'activité de Protamex à 60°C, E/S=0,1% (A) ; Alcalase à 60°C, E/S=0,1% (B) et Flavourzyme à 40°C, E/S=1,5% (C). *Effect of pH on Protamex (A), Alcalase (B) and Flavourzyme (C) activities* 146
- Figure 54 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C avec ou sans inactivation des enzymes endogènes (EE). *DH evolution during 24 h hydrolysis of sardine heads with Protamex, Alcalase and Flavourzyme with or without endogenous enzyme inactivation* 156
- Figure 55 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les têtes de sardine non hydrolysées et hydrolysées (par Protamex, Alcalase et Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Dry matter repartition among soluble, oily and insoluble fractions generated by sardine heads 24 h hydrolysis* 157
- Figure 56 : Distribution des lipides parmi les phases insolubles, huileuses et solubles des hydrolyses réalisées sur les têtes de sardine en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Lipid distribution among the fractions generated after 24 h hydrolysis of sardine heads compared to the lipid content in the raw material (in blue)* 158
- Figure 57 : Distribution des phospholipides parmi les phases insolubles, huileuses et solubles des hydrolyses réalisées sur les têtes de sardine en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Phospholipid distribution*

- among the fractions generated after 24 h hydrolysis of sardine heads compared to the phospholipid content in the raw material (in blue) 159
- Figure 58 : Répartition des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) dans les différentes fractions obtenues après hydrolyse des têtes de sardine. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Saturated (AGS), monounsaturated (AGMI) and polyunsaturated (AGPI) fatty acids distribution among fractions obtained after 24 h hydrolysis of sardine heads* 160
- Figure 59 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de têtes de sardine lors des hydrolyses de 24 h à pH 8 et à 50°C. A : têtes de sardine brutes; B: têtes de sardine hydrolysées avec Protamex 0,1%, C : têtes de sardine hydrolysées avec Alcalase 0,1% ; C : têtes de sardine hydrolysées avec Flavourzyme 1,5%. 1: Albumine (67,000 Da); 2: Ovalbumine (43,000 Da); 3: Chymotrypsinogène A (25, 000 Da); 4: Ribonucléase (13,700 Da). *Gel filtration chromatograms showing the distribution of heads FPH fraction molecular weight* 162
- Figure 60 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse combinée des têtes de sardine par Protamex (0,1%, P), Alcalase (0,1%, A) et Flavourzyme (1,5%, F) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C. *DH evolution during 24 h multi-enzymes hydrolysis of sardine heads with Protamex, Alcalase and Flavourzyme* 172
- Figure 61 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les têtes de sardine non hydrolysées et hydrolysées avec plusieurs enzymes (P : Protamex, A : Alcalase, F : Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Dry matter repartition among soluble, oily and insoluble fractions generated by sardine heads 24 h multi-enzymes hydrolysis* 173
- Figure 62 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses combinées réalisées sur les têtes de sardine en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex (P) ou Alcalase (A) et 1,5% de Flavourzyme (F). « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Lipid distribution among the fractions generated after 24 h multi-enzymes hydrolysis of sardine heads compared to the lipid content in the raw material (in blue)* 174
- Figure 63 : Distribution des phospholipides parmi les phases insolubles, huileuses et solubles des hydrolyses combinées réalisées sur les têtes de sardine en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Phospholipid distribution among the fractions generated after 24 h multi-enzymes hydrolysis of sardine heads compared to the phospholipid content in the raw material (in blue)* 175
- Figure 64 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de têtes de sardine lors des hydrolyses combinées de 24 h à pH 8 et à 50°C. PA : Protamex (0,1%) + Alcalase (0,1%) ; PF : Protamex (0,1%) + Flavourzyme (1,5%) ; AF : Alcalase (0,1%) + Flavourzyme (1,5%) ; PAF : Protamex (0,1%) + Alcalase (0,1%) + Flavourzyme (1,5%). 1: Albumine (67000 Da); 2: Ovalbumine (43000 Da); 3: Chymotrypsinogène A (25000 Da); 4: Ribonucléase (13700 Da). *Gel filtration chromatograms showing the distribution of multi-enzymatic heads FPH fraction molecular weight*..... 176

- Figure 65 : Surface de réponse estimée pour la libération des lipides dans les fractions liquides, en trois dimensions sous forme d'isoreponses, aux effets combinés de la température et de la concentration en enzyme (A), de la durée d'hydrolyse et de la température (B) et de la durée d'hydrolyse et de la concentration en enzyme (C). *Estimated response surfaces according to the time, enzyme and temperature parameters.* 185
- Figure 66 : Répartition des différentes classes de lipides obtenues par CCM-FID des fractions générées après l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex réalisée dans les conditions retenues d'après les résultats du plan d'expériences. PL : phospholipides, GL : glycolipides, MAG : monoacylglycérol, TAG : triacylglycérol. *Lipid classes distribution obtained by TLC-FID of fractions from hydrolysed heads* 188
- Figure 67 : Fractionnement SPE des classes de lipides des fractions issues de l'hydrolyse optimisées des têtes de sardine par Protamex. *SPE fractionation of lipid classes from hydrolysed heads fractions* 189
- Figure 68 : Profil moléculaire des peptides générés durant l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex. *Molecular weight distribution of peptides generated by the optimised heads hydrolysis with Protamex.*..... 193
- Figure 69 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C avec ou sans inactivation des enzymes endogènes (EE). *DH evolution during 24 h hydrolysis of sardine viscera with Protamex, Alcalase and Flavourzyme with or without endogenous enzyme inactivation.*..... 203
- Figure 70 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les viscères de sardine non hydrolysées et hydrolysées (par Protamex, Alcalase et Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Dry matter repartition among soluble, oily and insoluble fractions generated by sardine viscera 24 h hydrolysis* 204
- Figure 71 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées sur les viscères de sardine en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Lipid distribution among the fractions generated after 24 h hydrolysis of sardine heads compared to the lipid content in the raw material (in blue)* 205
- Figure 72 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées sur les viscères de sardine en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Phospholipid distribution among the fractions generated after 24 h hydrolysis of sardine heads compared to the phospholipid content in the raw material (in blue)* 206
- Figure 73 : Répartition des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) dans les différentes fractions obtenues après hydrolyse et/ou centrifugation des viscères de sardine. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Saturated (AGS), nono-unsaturated (AGMI) and poly-unsaturated*

- (AGPI)fatty acids repartition among fractions obtained after 24 h hydrolysis of sardine viscera 207
- Figure 74 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de viscères de sardine lors des hydrolyses de 24 h à pH 8 et à 50°C. A : viscères de sardine brutes; B: viscères de sardine hydrolysées avec Protamex 0,1%, C : viscères de sardine hydrolysées avec Alcalase 0,1%; C : viscères de sardine hydrolysées avec Flavourzyme 1,5%. 1: Albumine (67000 Da); 2: Ovalbumine (43000 Da); 3: Chymotrypsinogène A (25000 Da); 4: Ribonucléase (13700 Da). *Gel filtration chromatograms showing the distribution of sardine viscera FPH fraction molecular weight*..... 209
- Figure 75 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse combinée des viscères de sardine par Protamex (0,1%, P), Alcalase (0,1%, A) et Flavourzyme (1,5%, F) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C. *DH evolution during 24 h multi-enzyme hydrolysis of sardine viscera with Protamex (P), Alcalase (A) and Flavourzyme (F)*..... 218
- Figure 76 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les viscères de sardine non hydrolysées et hydrolysées avec plusieurs enzymes (P : Protamex, A : Alcalase, F : Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Dry matter repartition among soluble, oily and insoluble fractions generated after 24 h multi-enzymes sardine viscera hydrolysis* 219
- Figure 77 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses combinées réalisées sur les viscères de sardine en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex (P) ou Alcalase (A) et 1,5% de Flavourzyme (F). « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Lipid distribution among the fractions generated after 24 h multi-enzymes sardine viscera hydrolysis compared to the lipid content in the raw material (in blue)*..... 220
- Figure 78 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses combinées réalisées sur les viscères de sardine en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex (P) ou Alcalase (A) et 1,5% de Flavourzyme (F). « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Phospholipid distribution among the fractions generated after 24 h multi-enzymes sardine viscera hydrolysis compared to the phospholipid content in the raw material (in blue)*..... 221
- Figure 79 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de viscères de sardine lors des hydrolyses combinées de 24 h à pH 8 et à 50°C. PA : Protamex (0,1%) + Alcalase (0,1%); PF : Protamex (0,1%) + Flavourzyme (1,5%); AF : Alcalase (0,1%) + Flavourzyme (1,5%); PAF : Protamex (0,1%) + Alcalase (0,1%) + Flavourzyme (1,5%). 1: Albumine (67000 Da); 2: Ovalbumine (43000 Da); 3: Chymotrypsinogène A (25000 Da); 4: Ribonucléase (13700 Da). *Gel filtration chromatograms showing the distribution of viscera FPH molecular weight obtained after 24 h multi-enzymes hydrolysis*..... 222
- Figure 80 : Répartition de la matière sèche parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex. *Dry matter distribution among insoluble, oily and soluble fractions generated during experimental design* 227

Figure 81 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex. <i>Lipid distribution among insoluble, oily and soluble fractions generated during experimental design</i>	228
Figure 82 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex. <i>Phospholipid distribution among insoluble, oily and soluble fractions generated during experimental design</i>	229
Figure 83 : Evolution du DH lors de l'hydrolyse optimisée des viscères de sardine par Protamex. <i>DH evolution during sardine viscera optimised hydrolysis by Protamex</i> ..	230
Figure 84 : Répartition des peptides dans le rétentat et le perméat en fonction du seuil de coupure après ultrafiltration des hydrolysats de viscères de sardine lors sur pilote Oméga. <i>Peptide repartition in retentate and permeate of filtered sardine heads and viscera hydrolysates according to molecular weight cut off of ultrafiltration membrane</i>	236
Figure 85 : Répartition des lipides dans le rétentat et le perméat en fonction du seuil de coupure après ultrafiltration des hydrolysats de viscères de sardine lors sur pilote Oméga. <i>Lipid repartition in retentate and permeate of filtered sardine viscera hydrolysate according to molecular weight cut off of ultrafiltration membrane</i>	237
Figure 86 : Evolution de la concentration en protéines dans le perméat lors de la diafiltration de l'hydrolysat de co-produits de sardines sur membrane Omega PES 300 kDa. <i>Protein concentration evolution in the permeate during sardine by-product hydrolysate diafiltration on 300 kDa PES membrane</i>	238
Figure 87 : Taux de régénération de la membrane PES 300 kDa en fonction de la procédure de nettoyage et du passage de la solution colmatante (hydrolysat de têtes de sardine). <i>Regeneration rates of 300 kDa PES membrane according to the cleaning procedure</i>	240
Figure 88 : Colmatage des séparateurs de rétentat exprimé par la baisse du débit de recirculation du rétentat obtenu après chaque nettoyage (perméat fermé). <i>Retentate recirculation pathway fouling expressed by the Recirculation retentate flux obtained after each cleaning step</i>	242
Figure 89 : Evolution du flux de perméat de l'hydrolysat de têtes de sardine en fonction du temps et de la PTM pour un débit de rétentat de 7,2 L/h. <i>Permeation flux evolution of sardine heads hydrolysate according to the time and transmembrane pressure (PTM)</i>	243
Figure 90 : Flux de perméat de l'hydrolysat de têtes de sardine sur membrane PES 300 kDa en fonction de la PTM avec un débit de rétentat de 7,2 L/h obtenue en régime stabilisé (au bout de 50 min). <i>Permeation flux of sardine heads hydrolysate versus PTM</i>	243
Figure 91 : Evolution du flux de perméat et de la PTM lors de la cascade diafiltration → concentration de l'hydrolysat de têtes de sardine. <i>Permeation flux and PTM evolution during the diafiltration → concentration process of sardine heads hydrolysate</i>	244
Figure 92 : Evolution du flux de perméat et de la PTM lors de la cascade concentration → diafiltration de l'hydrolysat de têtes de sardine. <i>Permeation flux and PTM evolution during the concentration → diafiltration process of sardine heads hydrolysate</i>	245
Figure 93 : Evolution de la charge en peptides dans les perméats obtenus au cours des différentes cascades de filtration lors de l'ultrafiltration de l'hydrolysat de têtes de sardine. <i>Permeate peptide concentration evolution during the 2 filtration processes of sardine heads hydrolysate</i>	246
Figure 94 : Répartition des lipides dans les fractions obtenues lors de l'ultrafiltration de l'hydrolysat de têtes de sardine. <i>Lipid repartition and estimated losses in sardine heads ultrafiltration fractions</i>	248

Figure 95 : Evolution du flux de perméation J au cours du temps pour chaque matériau testé lors de la filtration de l'eau de lavage S2. T = 15°C, PTM = 1 bar. *Permeation flux evolution for each tested material during S2 filtration*..... 264

Figure 96 : Evolution du flux de perméation et du facteur de réduction volumique en mode concentration lors de la filtration de l'eau de lavage S2 avec la membrane RC 70 PP. T = 15°C, PTM = 1 bar. *Permeate flux evolution and volume reduction factor in concentration mode during S2 ultrafiltration with RC 70 PP membrane* 270

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse des co-produits marins. <i>Main proteases used for marine by-product hydrolysis</i>	47
Tableau II : Différentes applications du chitosan (Marinard Biotech. - 2003). <i>Different chitosan applications</i>	51
Tableau III : Principales activités biologiques des peptides de poisson. <i>Main biological activities found in fish peptides</i>	56
Tableau IV : Biosynthèse des acides gras poly-insaturés (Bergé - 1996). <i>Poly-unsaturated fatty acids biosynthesis</i>	57
Tableau V : Quelques fonctions et effets d'acides gras alimentaires. D'après Kinsella - 1988. <i>Some functions and effects of fatty acids</i>	59
Tableau VI : Classification des protéases. <i>Proteases classification</i>	67
Tableau VII : Principales application des bioréacteurs à membranes pour la bioconversion des macromolécules d'après Bouhallab (1998). <i>Main membrane bioreactor applications for macromolecules conversion</i>	74
Tableau VIII : Spécificité des Protéases utilisées. Les acides aminés entre parenthèse indiquent une activité moins prononcée de l'enzyme. <i>Proteases specificities</i>	93
Tableau IX : Tampons phosphate citrique utilisés pour la détermination de l'activité spécifique des enzymes. <i>Phosphate citric buffer used for the specific activity of enzymes</i>	94
Tableau X : Facteurs de dissociation α des groupements aminés obtenus en fonction de la température et du pH. <i>Dissociation factors of amino groups according to the temperature and pH</i>	97
Tableau XI : Calcul du niveau des facteurs utilisés pour la réalisation des plans d'expériences. <i>Factor level calculation for the experimental design</i>	100
Tableau XII :Matrice expérimentale de l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex concernant la durée de l'hydrolyse, la température et la concentration en enzyme. <i>Experimental matrix for the hydrolysis optimisation of sardine heads with Protamex</i>	101
Tableau XIII :Matrice expérimentale de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex concernant la durée de l'hydrolyse, la température et la concentration en enzyme. <i>Experimental matrix for the hydrolysis optimisation of sardine viscera with Protamex</i>	102
Tableau XIV : Caractéristiques du pilote Omega fournies par le fabricant. <i>Omega pilot characteristics</i>	104
Tableau XV : Facteurs de Correction de la Température à appliquer pour normaliser les valeurs à 20°C (FCT _{20°C}). <i>Temperature correction factors in order to data normalisation</i>	107
Tableau XVI : Caractéristiques des solutions de nettoyage pour des membranes en PES. <i>Cleaning solutions for PES membranes</i>	108
Tableau XVII : Conditions requises pour le nettoyage de la membrane d'ultrafiltration. <i>Cleaning conditions for ultrafiltration membranes</i>	109
Tableau XVIII : Caractéristiques du pilote Rayflow [®] 100 fournies par le fabricant. <i>Rayflow[®] 100 characteristics</i>	112
Tableau XIX : Caractéristiques des membranes utilisées pour la filtration des co-produits liquides. <i>Membranes characteristics used for liquid by-products filtration</i>	113
Tableau XX : Solvants utilisés en fonction des classes de lipides en chromatographie liquide sur colonne ouverte. <i>Solvents used for lipid class fractionation</i>	117

Tableau XXI : Classes de lipides, abréviations et standards utilisés pour la CCM-FID des extraits lipidiques. <i>Lipid classes, abbreviations and standards used in TLC-FID</i>	119
Tableau XXII : Programmation des températures pour la CPG-FID. <i>FID-GC temperature program</i>	121
Tableau XXIII : Bilan matière de la chaîne de production de surimi : matière première, co-produits et produit fini. <i>Weight balance of surimi production line : raw material, by-products and final product</i>	128
Tableau XXIV : Teneur en lipides des viscères et têtes de sardine par rapport à la matière fraîche et à la matière sèche. <i>Lipid content in sardine viscera and heads according to raw and dry matter</i>	130
Tableau XXV : Composition moyenne en acides gras des viscères et têtes de sardine (%). <i>Fatty acids composition of sardine viscera and heads</i>	131
Tableau XXVI : Composition moyenne en acides gras des phospholipides des viscères et têtes de sardine (%). <i>Phospholipid fatty acid composition of sardine viscera and heads</i> ...	133
Tableau XXVII : Activités protéolytiques des enzymes commerciales sur un substrat modèle obtenues à 50°C et à pH 8.....	148
Tableau XXVIII : Classification et conditions opératoires optimales des principales enzymes endogènes des matrices marines	151
Tableau XXIX : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse des têtes de sardine par Protamex, Alcalase et Flavourzyme à pH 8, 50°C et pendant 24 h. <i>Lipid content in the three fractions after 24 h sardine heads hydrolysis</i>	158
Tableau XXX : Proportion en EPA + DHA (%) dans les différentes fractions obtenues avant et après hydrolyse des têtes de sardine par Protamex, Alcalase et Flavourzyme pendant 24 h, à pH 8 et à 50°C. <i>EPA and DHA proportions on fractions obtained after 24 h sardine heads hydrolysis</i>	161
Tableau XXXI : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse combinée des têtes de sardine par Protamex (P), Alcalase (A) et Flavourzyme (F) à pH 8, 50°C et pendant 24 h. <i>Lipid content in fractions after 24 h multi-enzymes sardine heads hydrolysis</i>	173
Tableau XXXII : Réponses concernant le degré d'hydrolyse, les lipides et les phospholipides (somme des trois fractions et somme des fractions liquides <i>i.e.</i> fractions soluble et huileuse) obtenus après avoir réalisé le plan d'expériences visant à optimiser l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex. <i>Responses for Degree of Hydrolysis, lipids and phospholipids (sum of all fractions and sum of oily and aqueous fractions i.e. liquid fractions) obtained for the Central Composite Design concerning sardine heads hydrolysis</i>	182
Tableau XXXIII : Conditions optimales déterminées pour chaque réponse (DH, lipides et phospholipides libérés) de l'optimisation des têtes de sardine par Protamex et valeurs prédites pour ces réponses. <i>Optimal conditions calculated for each response and values predicted statistically according to those optimal conditions</i>	184
Tableau XXXIV : Résultats (DH, lipides et phospholipides libérés) obtenus après avoir conduit l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex avec les conditions optimales obtenues par le plan d'expériences. <i>Results obtained after processing the optimal hydrolysis compared to those predicted by the statistic software and those obtained in the crude material</i>	186
Tableau XXXV : Distribution des acides gras (%) au sein des trois fractions (insoluble, huileuse et soluble) générées au cours de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex <i>Fatty acid distribution among fractions after optimized hydrolysis</i>	187

Tableau XXXVI : Compositions moyennes en acides gras (%) des lipides neutres et des phospholipides contenus dans la fraction insoluble issue de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex. <i>Neutral lipid and phospholipid fatty acid composition in the insoluble fraction generated during the optimized hydrolysis of sardine heads by Protamex</i>	190
Tableau XXXVII : Compositions moyennes en acides gras (%) des lipides neutres contenus dans la fraction huileuse issue de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex. <i>Neutral lipid fatty acid composition in the oily fraction generated during the optimised hydrolysis of sardine heads by Protamex</i>	191
Tableau XXXVIII : Compositions moyennes en acides gras (%) des lipides neutres et des phospholipides contenus dans la fraction soluble issue de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex. <i>Neutral lipid and phospholipid fatty acid composition in the soluble fraction generated during the optimised hydrolysis of sardine heads by Protamex</i>	192
Tableau XXXIX : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse des viscères de sardine par Protamex, Alcalase et Flavourzyme à pH8, 50°C et pendant 24 h. <i>Lipid content in fractions after 24 h sardine viscera hydrolysis</i>	204
Tableau XL : Proportion en EPA + DHA (%) dans les différentes fractions obtenues avant et après hydrolyse des viscères de sardine par Protamex, Alcalase et Flavourzyme pendant 24 h, à pH 8 et à 50°C. <i>EPA and DHA proportions on fractions obtained after 24 h sardine viscera hydrolysis</i>	207
Tableau XLI : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse combinée des viscères de sardine par Protamex (P), Alcalase (A) et Flavourzyme (F) à pH8, 50°C et pendant 24 h. <i>Lipid content in fractions after 24 h multi-enzymes sardine viscera hydrolysis</i>	220
Tableau XLII : Réponses concernant le degré d'hydrolyse, les lipides et les phospholipides (somme des trois fractions et somme des fractions liquides <i>i.e.</i> fractions soluble et huileuse) obtenues après avoir réalisé le plan d'expériences visant à optimiser l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex. <i>DH, lipid and phospholipids contents (sum of all fractions and sum of oily and aqueous fractions i.e. liquid fractions) obtained for during the Central Composite Design concerning sardine viscera hydrolysis</i>	226
Tableau XLIII : Flux de perméation obtenus lors de la filtration des hydrolysats de têtes et de viscères sur le mini-pilote Omega à 20°C. <i>Permeation fluxes during hydrolysate filtration at 20°C on Omega mini-pilot</i>	236
Tableau XLIV : Charge en lipides dans les différentes fractions (rétentat et filtrat) obtenues après ultrafiltration de l'hydrolysate de têtes de sardine. <i>Lipid content in the fractions (permeate and retentate) obtained after the 2 ultrafiltration processes of sardine heads hydrolysate</i>	247
Tableau XLV : Charge en phospholipides contenue dans l'hydrolysate de têtes de sardine et dans les rétentats obtenus après ultrafiltration en fonction de la cascade de procédé. <i>Phospholipid content in the fractions (permeate and retentate) obtained after the 2 filtration processes of sardine heads hydrolysate</i>	249
Tableau XLVI : Répartition des acides gras (%) dans les fractions lipidiques des rétentats obtenus après ultrafiltration de l'hydrolysate de têtes de sardine. <i>Fatty acid repartition in lipidic fraction of sardine heads hydrolysate ultrafiltration retentate</i>	250
Tableau XLVII : Principaux résultats obtenus lors des deux différentes cascades réalisées lors de l'UF de l'hydrolysate de têtes de sardine.....	256

Tableau XLVIII : Flux à l'eau des membranes avant et après 20h d'adsorption et réduction du rayon de pore correspondant. <i>Water permeation flux before and after 20h adsorption test and pore size reduction</i>	262
Tableau XLIX : Flux de perméat obtenus avant, pendant et après ultrafiltration de l'eau de lavage S2. T = 15°C, PTM = 1 bar. <i>Permeation fluxes obtained before and after S2 filtration</i>	264
Tableau L : Composition biochimique (matière sèche, lipides, protéines) des fractions obtenues après ultrafiltration de l'eau de lavage S2. T = 15°C, PTM = 1 bar. <i>Biochemical composition (dry matter, lipids, proteins) of fractions generated during S2 ultrafiltration</i>	265
Tableau LI : Taux de rétention des lipides et des protéines pour chaque matériau après une filtration de 5 h de l'eau de lavage S2. T=15°C, PTM = 1 bar. <i>Lipid and protein retention rates after 5 h S2 ultrafiltration according to the filtration material</i>	266
Tableau LII : Caractérisation biochimique (matière sèche, lipides et protéines) et taux de rétention des fractions collectées après 8 h de filtration de l'eau de lavage S2 sur membrane RC 70PP en concentration (FRV = 3,8) à 15°C et pour une PTM de 1 bar. <i>Biochemical characterization (dry matter, lipid, protein) of collected fraction during S2 filtration with RC 70 PP membrane</i>	271
Tableau LIII : Caractérisation biochimique (matière sèche, lipides et peptides) du culot C1 et des fractions résultantes de son hydrolyse par la papaïne (2 h, 60°C, pH 6,5, E/S = 2%). <i>Biochemical characterization (dry matter, lipid, peptide) of collected fraction during C1 hydrolyse with papain</i>	271
Tableau LIV : Caractérisation biochimique (matière sèche, lipides et peptides) et taux de rétention des fractions collectées après 2 h de filtration du surnageant S3 sur membrane RC 70PP en concentration (FRV = 2,2) à 15°C et pour une PTM de 1 bar. <i>Biochemical characterization (dry matter, lipid, peptide) of collected fraction during S3 filtration with RC 70 PP membrane</i>	272

LISTE DES ABREVIATION

AA	Acide Arachidonique
AFSSA	Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments
AG	Acide Gras
AGMI	Acide Gras Mono-Insaturé
AGPI	Acide Gras Poly-Insaturé
AGS	Acide Gras Saturé
B	Perméabilité hydraulique de ma membrane
BSA	Bovine Serum Albumine
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CR	Cellulose Régénérée
D	diamètre de la section
DH	Degré d'Hydrolyse
DHA	DocosaHexaenoic Acid
DNFB	DiNitroFluoroBenzene
e	épaisseur de la membrane
EC	Enzyme Classification
EMAG	Ester Méthylique d'Acide Gras
EPA	EicosaPentaenoic Acid
FAO	Food and Agriculture Organisation
FID	Flamme ionisation detector (détecteur à ionisation de flamme)
FIGIS	Fisheries Global Information System
g	gramme
GL	GlycoLipides
h	heure
η	viscosité
hbt	habitant
<i>i.e.</i>	<i>Id est</i> (c'est à dire)
IFFO	International Fishmeal and Fish oil Organisation
Ifremer	Institut Français de recherche et d'exploitation de la mer
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
ISSCAAP	International Standard Statistical Classification of Aquatic Animal and Plants of FAO
kDa	kilo Dalton
L	litre
LN	Lipides Neutres
LT	Leucotriènes
M	molaire
MF	Microfiltration
min	minute

mL	millilitre
MS	Mass spectrometry
MUFA	MonoUnsaturated Fatty Acid (= AGMI)
MWCO	Molecular Weight Cut Off
n.c.	non communiqué
n.d.	non déterminé
NF	Nanofiltration
OI	Osmose Inverse
OPA	O-PhthaldiAldehyde
PAN	PolyAcryloNitrile
PdC	Perte de Charge
PES	Polyether Sulfone
PGa	Prostaglandines
PL	PhosphLipides
PM	Poids Moléculaire
PSSI	Programmed split/splitless injector
PTM	Pression transmembranaire
PUFA	PolyUnsaturated Fatty Acid (= AGPI)
PVDF	PolyVinyliDene Fluoride
rpm	rotation par minute
sec	seconde
SFA	Saturated Fatty Acid (= AGS)
SM	Spéctrométrie de Masse
t	tonnes
TAC	Total Admissible de Capture
TNBS	acide TriNitroBenzène Sulfonique
TX	Thromboxanes
U	Unité enzymatique
UF	Ultrafiltration

NOMS USUELS ET TRIVIAUX DES PRINCIPAUX ACIDES GRAS PRESENTES DANS CE MEMOIRE

	Nomenclature (acide)	Noms triviaux (acide) ou abréviations
C14 :0	tétradécanoïque	myristique
C16 :0	hexadécanoïque	palmitique
C17 :0 (IS)	heptadécanoïque	margarique
C18 :0	octadécanoïque	stéarique
C20 :0	eicosanoïque	arachidique
C22 :0	docosanoïque	béhénique
C24 :0	tétracosanoïque	lignocérique
C14 :1 c ω5	cis-9 tétracécénoïque	myristoléique
C16 :1 c ω7	cis-9 hexadécénoïque	palmitoléique
C18 :1 c ω6	cis-12 octadécénoïque	-
C18 :1 c ω7	cis-11 octadécénoïque	vaccénique
C18 :1 c ω9	cis-9 octadécénoïque	oléïque
C18 :1 c ω12	cis-6 octadécénoïque	pétrosélinique
C20 :1 c ω7	cis-13 eicosénoïque	-
C20 :1 c ω9	cis-11 eicosénoïque	gadoléïque
C20 :1 c ω12	cis-8 eicosénoïque	-
C22 :1 c ω9	cis-13 docosénoïque	érucique
C24 :1 c ω9	cis-15 tétracosénoïque	nervonique
C18 :2 c ω6	cis-9,12 octadécadiénoïque	linoléïque
C20 :2 c ω6	cis-11,14 eicosadiénoïque	-
C22 :2 c ω6	cis-13,16 docosadiénoïque	-
C18 :3 c ω3	cis 9,12,15 octadécatriénoïque	linoléinique
C18 :3 c ω6	cis-6,9,12 octadécatriénoïque	GLA
C20 :3 c ω3	cis-11,14,17 eicosatriénoïque	-
C20 :3 c ω6	cis-8,11,14 eicosatriénoïque	dihomo-γ-linolénique
C20 :3 c ω9	cis-5,8,11 eicosatriénoïque	-
C22 :3 c ω3	cis-13,16,19 docosatriénoïque	-
C18 :4 c ω3	cis-6,9,12,15 octadécatétraénoïque	stéaridonique
C20 :4 c ω3	Cis-6,9,11,14 eicosatétraénoïque	-
C20 :4 c ω6	cis-5,8,11,14 eicosatétratriénoïque	Arachidonique (AA)
C22 :4 c ω6	cis-7,10,13,16 docosatétraénoïque	-
C22 :4 c ω9	cis-9,12,15,18 docosatétraénoïque	-
C20 :5 c ω3	cis-5,8,11,14,17 eicosapentaénoïque	EPA
C22 :5 c ω3	cis-7,10,13,16,19 docosapentaénoïque	
C22 :6 c ω3	cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaénoïque	DHA

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION GENERALE

Les océans constituent une richesse alimentaire très diversifiée (algues, crustacés, coquillages, mollusques, poissons) et exploitée. Selon la FAO, plus de 130 millions de tonnes de poissons sont actuellement pêchés ou élevés chaque année dans le monde. Les produits de la mer peuvent être consommés frais, congelés, séchés ou encore transformés. Une des transformations majeures du poisson réside dans la fabrication de pâte de filet de poisson broyée et lavée, à laquelle est ajoutée des cryoprotecteurs : le « surimi base ». Ainsi, cette transformation confère au produit obtenu une plus grande conservation et une stabilité des propriétés fonctionnelles des protéines au cours de la congélation. La fabrication du surimi est traditionnellement réalisée avec du colin d'Alaska ou du merlan bleu. Ces espèces étant aujourd'hui menacées par une pêche trop importante, des quotas ont été fixés depuis une dizaine d'années. Cependant, face à la demande croissante de production de surimi, les professionnels des produits de la mer ont dû se tourner vers d'autres espèces de poisson. Certains petits pélagiques gras, comme la sardine, ne bénéficient pas à l'heure actuelle de quotas de pêche et possèdent une faible valeur marchande. C'est pourquoi, la valorisation de ce poisson, ainsi que d'autres espèces telles que le chinchard, le maquereau, en surimi base fait partie d'une thématique de recherche menée conjointement par l'Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer (Ifremer) et la société EuroSeafood Trading. Alors que l'adaptation du procédé de transformation de ces nouvelles espèces est étudiée depuis quelques années, la politique environnementale actuelle incite de plus en plus les industriels à prendre en compte les déchets générés par tout procédé de transformation. Ainsi, comme le résume la Figure 1, la production de surimi base est à l'origine de plusieurs sources de co-produits : les co-produits solides, comme les têtes et les viscères des poissons, et les co-produits liquides, comme les effluents issus de la chaîne de transformation (eaux de lavage). Les co-produits représentent entre 30 et 60 % des poissons entiers et, en 2005, s'élevaient à 150 000 t en France. Il est alors primordial de trouver des voies de valorisation de ces co-produits en intégrant la notion de développement durable : les techniques utilisées doivent être non agressives pour l'environnement et ne pas engendrer de dépenses énergétiques ou d'investissement trop lourds.

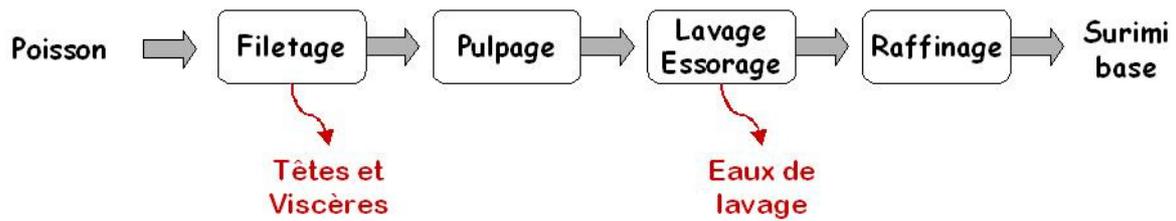


Figure 1 : Principales étapes de la fabrication du surimi base et récupération des principaux co-produits solides et liquides

L'intérêt porté par les industries de nutrition humaine et d'alimentation animale pour les lipides marins est croissant. En effet, les acides gras de la famille des $\omega 3$ ou $\omega 6$, dont les bienfaits sur la santé humaine ont été prouvés par de nombreuses études, sont présents en quantité importante dans les matrices marines. Les phospholipides, présents dans tous les tissus vivants, possèdent également de nombreuses propriétés intéressantes. Les petits pélagiques, comme la sardine, sont des poissons riches en lipides et il s'avère alors stratégique de se pencher sur la valorisation de ces composés. Cependant, à l'heure actuelle, deux types de procédés sont mis en oeuvre pour leur obtention. Le premier utilise des réactifs chimiques (solvants) créant une source de pollution importante et le second fait appel à l'application de hautes températures induisant d'éventuelles modifications de structure des composés (les acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$ étant très sensibles à l'oxydation).

De nombreuses études ont montré l'efficacité des hydrolyses enzymatiques par des protéases pour solubiliser des matrices solides. Considérant que ce type d'hydrolyse permet de solubiliser la matière, les protéines en particulier, il est possible que les lipides soient également libérés. Ainsi le potentiel du procédé d'hydrolyse enzymatique contrôlée sur les co-produits solides issus de la chaîne de transformation de sardine en surimi base va être étudié durant ce travail, dans le but de libérer puis de récupérer les lipides. Cependant, la mise en oeuvre de ce procédé suscite également des interrogations. Toutes les matrices vont-elles réagir de la même façon face à ce type de traitement ? Une déstructuration profonde permettra-t-elle la libération de tous les lipides ? Seront-ils de même qualité que lors d'une extraction traditionnelle par solvants ? Le choix de l'enzyme est-il important ? Doit-on utiliser une seule ou plusieurs enzymes en combinaison ? Est-il possible d'optimiser les conditions d'hydrolyse pour obtenir les rendements d'extraction les plus importants ?

Par ailleurs, les fractions liquides issues de la transformation du poisson en surimi base, ou générées lors de l'hydrolyse enzymatique doivent également entrer dans un processus de valorisation par l'utilisation de techniques douces. Les hydrolysats sont des matrices riches en

peptides et peuvent également contenir des lipides. Il est alors intéressant d'envisager leur séparation en vue d'une valorisation spécifique. Les volumes d'eau utilisés par la chaîne de transformation du poisson sont très élevés et les effluents générés sont fortement chargés, majoritairement de protéines. Les procédés à membranes, impliquant des coûts énergétiques plus faibles que les traitements thermiques, peuvent constituer une solution pour traiter ces fractions liquides. Ces techniques séparatives permettraient en effet soit de séparer deux types de composés, soit de réduire la charge polluante des effluents, tout en essayant de valoriser les composés obtenus. Mais de tels procédés permettront-ils de séparer les lipides des peptides ? Quel mode de filtration doit-on mettre en œuvre ? La charge polluante des effluents pourra-t-elle être significativement réduite ? Quel matériau, quel seuil de coupure et quelle structure choisir ?

Ainsi, après avoir dressé un état de l'art sur le sujet et passé en revue les modes opératoires choisis, ce travail se déclinera en 4 chapitres où des éléments de réponse apparaîtront. Faisant suite aux conclusions, des perspectives seront émises pour la conduite de futurs travaux.

Oceans possess a diversified and exploited food resources (seaweeds, crustaceans, molluscs, fish). Globally, according to the FAO, more than 130 millions tons of fish are nowadays caught or produced from fish farming. Sea products can be eaten fresh, frozen, dried or transformed. One of the major fish transformation consists to obtain a washed fish pulp with added cryoprotectors: the "surimi base". Hence, this transformation confers to the product a higher conservation and functional protein stability during frozen storage. Surimi manufacturing is generally realized with Alaska pollack or blue whiting. But these fish species are today threatened by an important fishing. Hence, for a decade, fishing quotas have been fixed. However, the surimi demand is more and more increasing and industrialists have to consider other fish species. Small fatty pelagic fish, such as sardine, do not possess, at the present time, catch quota and are of low value. Therefore, the up-grading of those fish (sardine, horse mackerel, mackerel) in surimi base is one of the research project conducted by Ifremer and a French industrialist, EuroSeafood Trading. While the transformation process adaptation has been studied for few years, environmentally guidelines encourage industrialists to consider wastes generated during the manufacturing. As shown in Fig. 1, surimi manufacturing induces by-products production: solid by-products, as fish heads and viscera and liquid by-products as washing water. By-products represent from 30 to 60 % of the whole fish and, in 2005, the French by-product production was 150,000 tons. Thus, it is

essential to find out new up-grading ways for those by-products, integrating sustainable development, with environmentally sound procedures requiring low energy consumption.

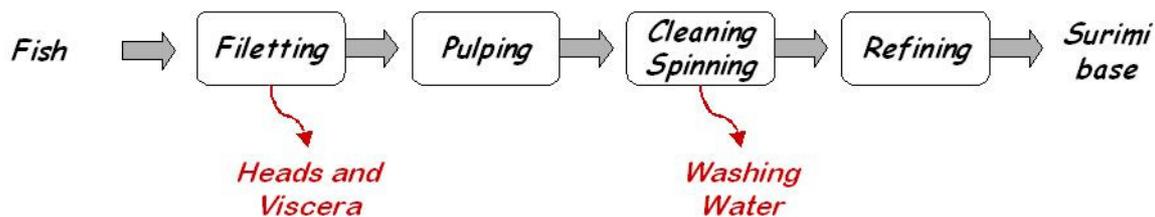


Fig. 1 : Main steps of surimi manufacturing and solid and liquid recovered by-products

In addition, the interest of feed and food industries for marine lipids is becoming more and more important. Indeed, marine matrixes possess high $\omega 3$ and $\omega 6$ fatty acids contents, with advantages on human health that been widely demonstrated. Phospholipids are also important compounds and are present in all living resources. Small pelagic fish, as sardine, are lipid rich organisms and it becomes strategic to study the up-grading of those compounds in such matrixes. However, at the present time, two different processes are used for their extraction. The first one is solvent consuming and the second one requires high temperature treatments and could induce structure alteration (polyunsaturated fatty acid are sensitive to oxidation).

Numerous studies have shown the efficiency of protease hydrolysis for the solubilization of the solid matrixes. Considering that hydrolysis could solubilize the matter, especially proteins, it is also likely that lipids could be released. Thus, the hydrolysis process on surimi manufacturing solid by-products is studied during this work, in order to obtain a high lipid extraction. However, this kind of procedure is a source of few interrogations: Do all kind of matrixes react in the same way with the hydrolysis treatment? Does a deep structure modification enable a total lipid release? Is the lipid quality identical following hydrolysis and solvent extraction? Is the enzyme choice important? Is it preferable to use single enzyme treatment or enzymes in combination? Is it possible to optimize the hydrolysis conditions to obtain higher extraction yields?

Furthermore, liquid fractions coming from surimi production, or generated during enzymatic hydrolysis have also to be up-graded using mild procedures. Hydrolysates are rich in proteins and could also contain lipids. So, it is interesting to consider their fractionation for a specific utilization. High water volumes are used during surimi transformation and washing water possesses an important protein load. Membrane procedures, which are less

expensive that thermal treatments, could be a solution for those liquid fractions up-grading. These procedures allow the separation of two types of compounds (such as lipids and proteins) or the reduction of the polluting load. But are such processes able to an efficient lipid / peptide separation? Which filtration sequence has to be employed? Will the polluting load be significantly decrease? Which material and which molecular weight cut off have to be chosen?

Therefore, a review of the bibliography covering these different fields is realized in the first part of the work. Then, after the material and methods enunciation, the work will be divided in four chapters, in which elements of responses will appear. Finally, conclusions and outlooks for further works will be submitted.

2. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'objectif principal de ce travail de recherche est l'étude de procédés originaux de récupération des fractions lipidique et peptidique de biomasses marines par techniques douces avec une consommation énergétique et un investissement modérés.

The main objective of this research work is the study of original processes for lipid and peptide fractions release from marine by-products using mild procedures with low energy consumption and investment.

2.1. Obtention des co-produits de sardine générés par le procédé de fabrication de surimi base – Sardine by-products obtention during surimi base process

La présente étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation de co-produits issus de la transformation industrielle de sardine en un produit alimentaire intermédiaire (PAI) : le surimi base. A ce titre, le premier chapitre de ce travail est consacré à la caractérisation du rendement de cette chaîne de transformation, à la quantification des produits et co-produits générés. Les co-produits seront ensuite caractérisés du point de vue biochimique. Les valeurs trouvées lors de cette étape serviront ainsi de référence pour la suite de l'étude.

The present study is realized in order to find an up-grading way for by-products generated during the sardine manufacturing in an Intermediate Food Product (IFP): the surimi base. Therefore, the first chapter of this work is devoted to the characterization of the output of this process line and to the quantification of product and by-products generated. By-

products have been then biochemically studied. Values obtained during this part will be used as a reference for further parts of the work.

2.2. Détermination de l'activité protéolytique des enzymes et des co-produits de sardine – Proteolytic activity of commercial enzymes and by-products determination

De nombreux procédés d'hydrolyse de matrices marines sont maintenant établis, mais peu sont standardisés. Pour permettre le criblage des enzymes, il convient de pouvoir les comparer entre elles. Or ces enzymes sont définies grâce à des tests spécifiques utilisant différents substrats. Le but de ce chapitre est donc d'étudier le comportement des enzymes en fonction de la concentration et des conditions de température et de pH. Le choix des enzymes a été effectué par le biais d'un partenariat avec la société Novozymes AS (Danemark). L'objectif de ce travail est de récupérer les fractions lipidiques et protéiques. Les protéases à large spectre nous ont paru être les plus pertinentes vis-à-vis de l'objectif fixé et de leurs conditions douces de travail (pas de pH ni de température extrême) permettent de ne pas dénaturer les composants. Alcalase et Protamex sont deux enzymes très répandues dans le traitement enzymatique des produits de la mer. Flavourzyme possède quant à elle des propriétés intéressantes, liées notamment à sa capacité à générer des peptides moins amers.

Comme tout tissu vivant, les co-produits de poisson possèdent également une machinerie enzymatique qui leur est propre. De nombreux auteurs dénaturent les enzymes endogènes avant l'hydrolyse. Cependant, la dénaturation thermique peut également endommager ou détruire certains composés d'intérêt. Notre choix durant cette étude fut de ne pas dénaturer les enzymes endogènes. C'est la raison pour laquelle, dans ce chapitre, les activités protéolytiques des matrices ont été déterminées dans les conditions optimales des enzymes commerciales.

Nowadays, a lot of hydrolysis processes on marine matrixes have been published, but few were standardized. To realize an enzyme screening, it is preferable to be able to compare them. Commercial enzymes are defined by specific tests using different substrates. The goal of this second chapter is to study the enzyme behaviour according to the temperature, the pH and the enzyme concentration. Enzyme choice has been made in a framework of a partnership with the Novozymes AS Company (Denmark). As the objective of this work is the lipid recovery, wide spectrum proteases appear to be the most efficient enzymes owing to their soft conditions requirement (moderate pH and temperature working conditions). Thus, lipids

would not be denatured during such hydrolysis. Alcalase and Protamex are widely used in enzymatic treatment of marine products and Flavourzyme possesses interesting properties, especially linked to its capacity to reduce the hydrolysates bitterness.

As all living matrixes, fish by-products possess endogenous enzymes. In numerous studies, endogenous enzymes are denatured before the addition of exogenous ones. However, the thermal denaturation could also damage compounds of interest. Our choice during this study is to avoid thermal treatment before hydrolysis to preserve all the compounds. So, in this chapter, proteolytic activity of each matrix have been determined in the same conditions as exogenous enzymes' ones.

2.3. Hydrolyse des co-produits solides : hydrolyse longue durée, utilisation combinée des enzymes et optimisation – Solid by-products hydrolysis : long time hydrolysis, enzyme combination utilization and optimisation

Ce chapitre est dédié à la conduite des hydrolyses enzymatiques. Trois démarches se succèdent pour tendre vers l'obtention d'un procédé enzymatique optimisé. Dans la première partie de ce chapitre, les têtes et les viscères de sardines sont hydrolysées avec les trois enzymes dans les conditions optimales déterminées précédemment avec un substrat modèle. Les hydrolysats obtenus sont ainsi caractérisés puis comparés. La deuxième partie du travail consiste à étudier l'effet de la combinaison de ces enzymes. De la même manière que dans la première partie, les hydrolysats obtenus en fonction des différentes combinaisons sont comparés. Enfin, à partir des enseignements tirés de ces expérimentations et en prenant en compte l'intérêt industriel (simplicité de mise en œuvre, coût, propriétés particulières), l'enzyme la plus adéquate est choisie pour optimiser le procédé d'hydrolyse pour chaque matrice. La complexité d'une matrice marine incite à penser que le comportement des enzymes est spécifique du substrat. La méthodologie des plans d'expérience est alors ici utilisée et trois paramètres sont étudiés : la concentration en enzyme, la durée d'hydrolyse et la température.

This chapter is devoted to enzymatic hydrolysis. Three approaches are successively adopted to obtain the best process. In the first part of this chapter, sardine heads and viscera are hydrolyzed with the three selected enzymes in the conditions determined in the second chapter (on a model substrate). Hydrolysates generated are then characterized and compared. The second part of this study consists to evaluate the effect of the enzyme

combination. Hydrolyses are performed with two or three enzymes simultaneously. Hydrolysates are also characterized and compared. Finally, thanks to former results, the most efficient enzyme is chosen for the process optimization for each by-product, taking into account industrial interest (easy implementation, costs). The experimental design using response surface methodology is applied for the study of the three following parameters: enzyme concentration, hydrolysis time and temperature.

2.4. Traitement des fractions liquides par ultrafiltration – Ultrafiltration of liquid fractions

Les procédés à membranes, et plus particulièrement l'ultrafiltration (UF), sont utilisés ici pour le traitement des fractions liquides.

Dans un premier temps, ce procédé d'UF est mis en œuvre pour séparer les fractions lipidique et peptidique de l'hydrolysate obtenu à partir des têtes de sardine. Suivant les recommandations du fabricant de membranes concernant la séparation lipides / peptides, il a été décidé de mener les expériences sur des membranes de matériau PES (polyéther sulfone). Une étape de criblage du seuil de coupure des membranes est tout d'abord réalisée. Cette étape de filtration est réalisée à l'aide d'un modèle de filtration particulier, le Minim[®] (Pall). Celui-ci possède l'avantage, par la structure de ces cassettes, de pouvoir être transposé de façon linéaire à plus grande échelle. Cependant, l'encrassement du module de filtration est plus rapide que lors de l'utilisation de modules plus simples. A ce titre, le nettoyage de ce système a fait l'objet d'une campagne expérimentale prolongée. De façon générale, la séparation des lipides et des peptides est obtenue par la réalisation d'une diafiltration et d'une concentration. L'ordre des séquences (diafiltration puis concentration ou inversement) est mis au point en fonction de la qualité des fractions obtenues, de la quantité d'eau requise et de la dépense énergétique occasionnée (liée au flux de perméat et à la durée de l'opération).

Dans un second temps, les eaux de lavage issues de la chaîne de fabrication du surimi sont également traitées par ultra-filtration de façon à décharger les eaux de rejets tout en récupérant les protéines contenues dans les eaux. Pour ce projet, un autre module à membranes planes est utilisé pour permettre une sélection des membranes plus diversifiée et moins coûteuse. Ainsi différents matériaux et seuils de coupure sont testés, pour obtenir la plus haute rétention des protéines et dépolluer au maximum ces eaux de procédé, tout en conservant ces protéines en vue d'une application future. Lors de cette étape, la valorisation

des culots résultant d'une centrifugation des eaux de lavage est également étudiée dans le cadre d'une cascade hydrolyse enzymatique / ultrafiltration.

Membrane procedures, especially ultrafiltration (UF) are used for the liquid fractions treatment.

In a first step, UF procedure is implemented for the separation of lipidic and peptidic fractions from sardine heads hydrolysate. According to the membrane manufacturer advices for lipid / peptide separation, experiments have been carried out with the PES (polyether sulfone) material. A screening step is firstly realized for the molecular weight cut off (MWCO) selection. Then, UF is carried on a peculiar pilot, the Minim[®], which possesses the advantage to be easily and linearly up-scaled, owing to the specific structure of its cartridges. However, the fouling of such a filtration system is more important to that observed for tubular or flat sheet systems. Hence, the cleaning procedure is studied during a long time experimental campaign. Generally, the separation of lipids from peptides is obtained with a combination diafiltration / concentration. The sequence order (diafiltration followed by concentration and vice versa) is studied to obtain the fractions with the best quality, with low water and energy (permeation flux and operating time) consumptions.

In a second step, washing water from surimi manufacturing is ultrafiltered in order to decrease the polluting load of the waste water and simultaneously to recover. Another UF module is used to permit a more diversified and less expensive membrane selection. Thus, several membrane materials and MWCO are studied. During this step, sludge up-grading resulting from a centrifugation step of the initial washing water are also studied within the framework of a combination enzymatic hydrolysis / ultrafiltration.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES CO-PRODUITS D'ORIGINE MARINE

1.1. La pêche et l'aquaculture dans le monde

1.1.1. Intérêt du poisson

Le poisson joue un rôle important dans la nutrition humaine en raison de ses qualités nutritionnelles mais aussi pour le vaste choix qu'il offre au niveau gustatif, de la texture ou de la forme sous laquelle il est commercialisé : entier ou en filet, frais, congelé, salé, fumé, séché ou transformé (conserves, plats préparés, surimi...). En 2001, la consommation européenne de poisson était de 19,8 kg/hbt, quantité supérieure à la moyenne mondiale (16,3 kg/hbt). Cependant, les apports en protéines animales moyens en Europe sont encore majoritairement issus de la viande et des produits laitiers (FAO fisheries department - 2004). Cette différence serait due essentiellement à des problèmes de goût et de culture (Roy et Durand - 1997).

Pourtant les qualités nutritionnelles du poisson sont en général supérieure ou égales à celles de la viande, la teneur en protéines de la chair de poisson étant, quelle que soit l'espèce, équivalente à celle de la viande (Piclet - 1987). De plus, les protéines de poisson sont plus digestes que celles de la viande et leur teneur en acides aminés essentiels est en général un peu plus élevée que dans la viande (Médale *et al.* - 2003). La teneur en lipides, très variable selon les espèces, est inférieure à 1% en poids frais pour des poissons maigres (cabillaud, merlan) et supérieure à 10% pour des poissons gras (thon, saumon, sardine). Les graisses de poissons sont surtout constituées de glycérides et renferment trois acides gras essentiels : l'acide linoléique, l'acide linoléique et l'acide arachidonique. Les poissons sont également riches en acides gras de la famille des $\omega 3$ et des $\omega 6$ dont les bénéfiques sur la santé humaine sont très connus (cf. 1.2.6.4). Le poisson est pauvre en glucides mais riche en sels minéraux (de 0,6 à 2,5% par rapport à la matière fraîche) (Piclet - 1987). Certaines espèces de poisson et de crustacés sont particulièrement riches en vitamines, notamment en vitamine D (Médale *et al.* - 2003).

1.1.2. Production de poisson : quelques chiffres

La production mondiale des pêches de capture et de l'aquaculture a fourni en 2002 environ 133 millions de tonnes de poissons dont 101 millions sont destinées à la nutrition humaine. Les 24% restant sont, quant à eux, destinés principalement à la production d'huiles

et de farines (FAO fisheries department - 2004). Depuis les années 50, la production mondiale des produits de la pêche est passée de 20 à 130 millions de tonnes (Figure 2). Les quantités mondiales débarquées provenant des pêches de capture restent relativement stables depuis la fin des années 90. En effet, depuis cette date, les quotas de pêches fixés ont été atteints et l'augmentation de la production totale des produits de la pêche est due au développement de plus en plus important des fermes aquacoles.

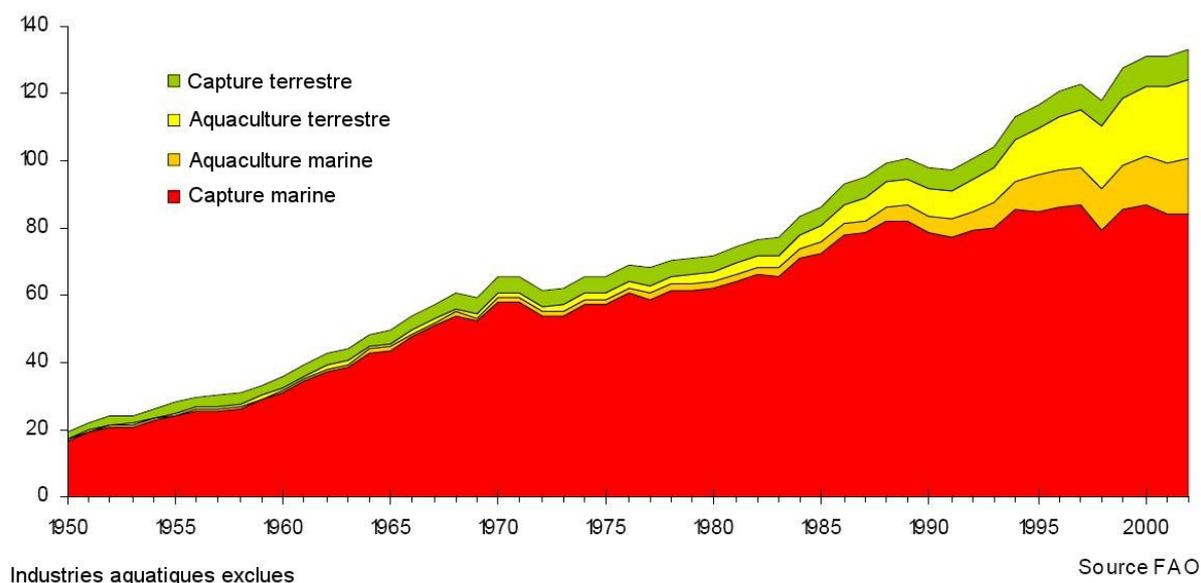


Figure 2 : Production mondiale des pêcheries en millions de tonnes provenant des pêches de capture et de l'aquaculture de 1950 à nos jours (FAO fisheries department - 2005). Fisheries global production in million tonnes from 1950 to our days

La Chine est de loin le plus gros pays producteur avec, selon les quantités déclarées, 44,3 millions de tonnes en 2002 (16,6 millions de tonnes provenant des pêches de capture et 27,7 de l'aquaculture). Cependant, du fait de la difficulté à collecter les données, les statistiques de la Chine relatives à sa production provenant des pêches de capture et de l'aquaculture seraient peut-être trop élevées (FAO fisheries department - 2004). Les autres principaux pays producteurs de poisson sont le Pérou (8,8 millions de tonnes en 2002), l'Inde (6,0), les Etats-Unis (5,4), l'Indonésie (5,4), le Japon (5,2), le Chili (4,8), la Thaïlande (3,5), la Norvège (3,3) et la Fédération de Russie (3,2) (FAO fisheries department - 2004).

En 2002, les principales espèces de poissons débarquées sont l'anchois du Pérou (9,7 millions de tonnes), le lieu d'Alaska (2,7), le listao (2,0), le capelan (2,0), le hareng de l'Atlantique (1,9), l'anchois du Japon (1,9), le chinchard du Chili (1,8), le merlan bleu (1,6), le maquereau espagnol (1,5) et le poisson-sabre commun (1,5).

La zone Atlantique Nord-Est (Zone FAO n°27, Figure 3) est la troisième zone de pêche marine avec une production de 11 millions de tonnes de poissons débarqués en 2002 (FAO fisheries departement - 2004). L'aire totale de cette zone est de 14,3 millions de km² parmi lesquels 2,7 millions de km² sont des zones côtières.

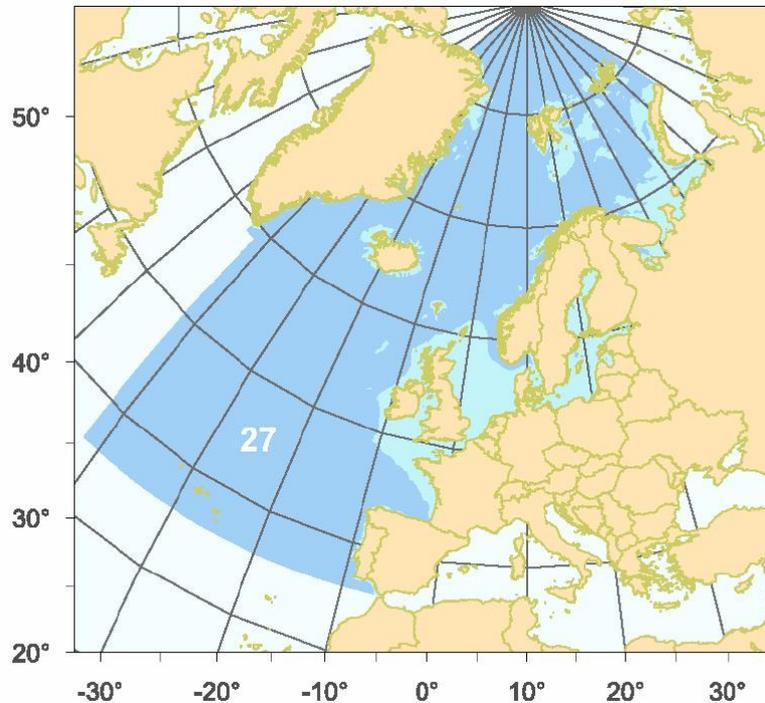


Figure 3 : Délimitation de la zone de pêche FAO n°27 : Atlantique Nord-Est (FAO fisheries departement - 2005). *FAO area n°27 limits : North East Atlantic ocean*

La production de poisson en Atlantique Nord-Est a augmenté rapidement à la fin du XIX^e et au début du XX^e siècle grâce à la mécanisation et la motorisation des moyens de production. Les deux guerres mondiales ont correspondu à deux courtes périodes de pêche relativement faibles durant lesquelles les populations de poissons ont pu se reconstruire. Les captures sont passées de 5,2 millions de tonnes en 1950 à un « pic » de près de 13 millions de tonnes en 1976 (Figure 4). Les captures ont ensuite connu un déclin jusqu'en 1990 pour atteindre 8,5 millions de tonnes puis un nouvel essor jusqu'en 1997 a permis d'atteindre 11,7 millions de tonnes, tonnage qui s'est ensuite stabilisé. Les principaux poissons rencontrés en Atlantique Nord-Est sont les poissons de la famille des gadidés (cabillaud, églefin, lieu jaune, merlu) puis les poissons pélagiques tels que le hareng, l'anchois ou la sardine (FAO fisheries departement - 2005).

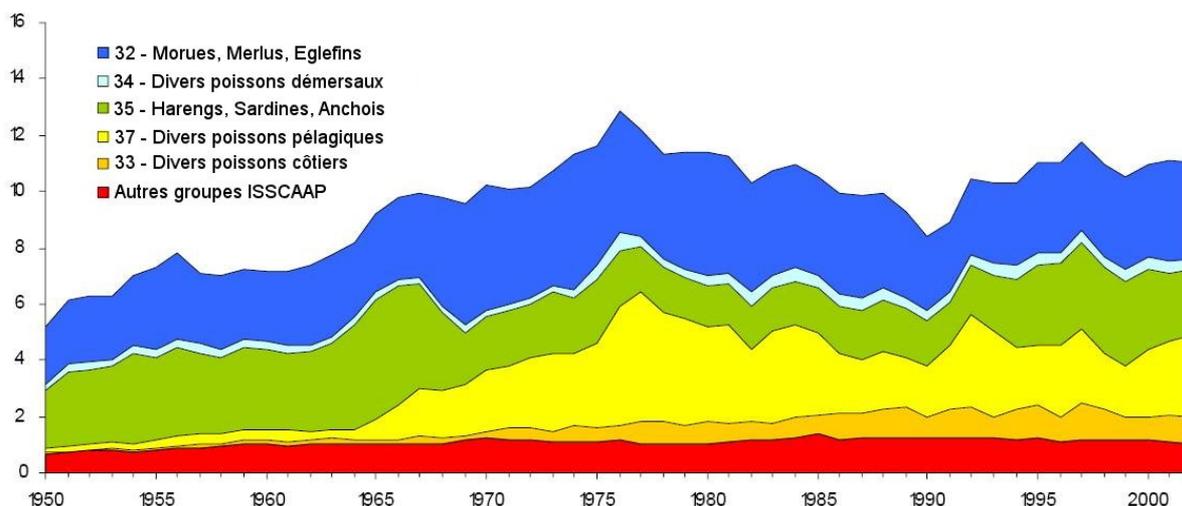


Figure 4 : Production des pêches de capture en millions de tonnes de la zone Atlantique Nord-Est provenant de 1950 à nos jours en fonction des groupes d'espèces déterminées par le ISSCAAP (International Standard Statistical Classification of Aquatic Animal and Plants of FAO) (FAO fisheries department - 2005). North East Atlantic fisheries production from 1950 to our days, according to the ISSCAAP classification

En France, 495 254 t de produits de capture ont été débarquées en 2004 (OFIMER et Ministère de l'agriculture et de la pêche - 2004). Ajoutés aux quantités fournies par l'aquaculture, la production globale de produits marins en 2004 s'élève à 854 600 t (Figure 5).

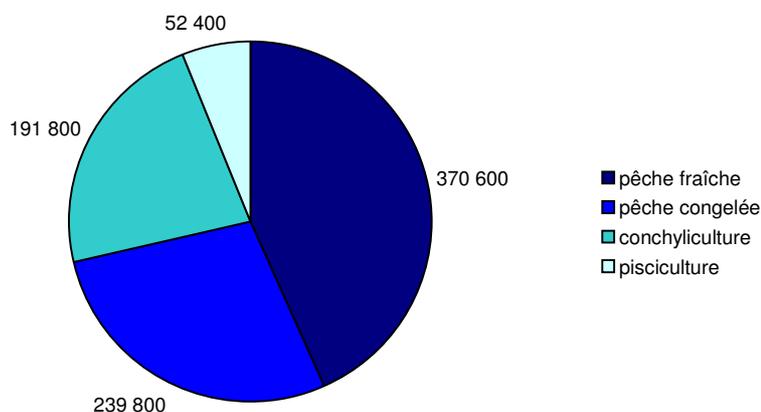


Figure 5 : Ventes totales en tonnes des produits de la pêche et de l'aquaculture en France en 2004 (OFIMER - 2006). French total products (in tonnes) from fisheries and aquaculture sales in 2004

Les principales espèces de poisson débarquées sont la sardine, la baudroie (communément appelée lotte), le merlan, le maquereau, le merlu, la sole, le lieu noir, le bar et le grondin (Figure 6).

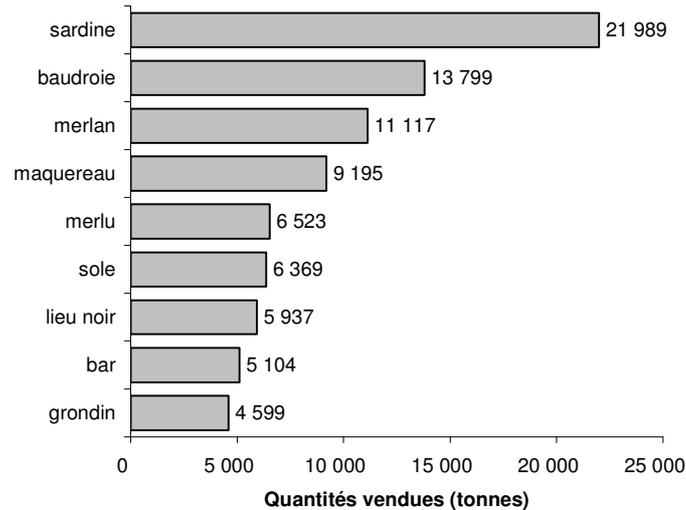


Figure 6 : Principales espèces de poisson vendues dans les halles à marée françaises en 2005 (OFIMER - 2006). Main fish species sold at french auction in 2005

1.1.3. La sardine commune (*Sardina pilchardus*)

La sardine commune (*Sardina pilchardus*) (Figure 7) appartient à la classe des Actinoptérygiens, à l'ordre des Clupéiformes et à la famille des Clupéidés. La sardine commune évolue en Atlantique Nord-Est, de la Norvège à l'Ecosse jusqu'au Sénégal, et en Méditerranée (Forest - 2001). C'est un poisson pélagique vivant dans les eaux côtières et jusqu'à 120 m de profondeur. La sardine vit en bancs parfois importants, près de la surface la nuit et plus en profondeur le jour. Sa taille moyenne est de 10-20 cm avec une taille maximale de 25 cm. La sardine fraie toute l'année et les périodes de ponte varient selon la répartition géographique. La sardine est une espèce planctonophage. Les jeunes se nourrissent de phytoplancton ainsi que d'œufs et de larves de petits crustacés. Les adultes consomment surtout des crustacés planctoniques (copépodes), mais également différentes larves présentes dans le zooplancton (crabes, ophiures, ...).



Figure 7 : Photographie de sardine (*Sardina pilchardus*). Sardine picture

La pêche à la sardine est une activité fortement influencée par les conditions hydrologiques. En effet, la température agit directement sur les migrations ainsi que sur l'importance et la localisation des concentrations de sardines et, donc sur leur accessibilité aux flottilles de pêche (Forest - 2001). La sardine est pêchée à la bolinche et de plus en plus, au chalut pélagique. Elle est consommée fraîche, salée, parfois fumée mais principalement en conserve. Les principaux pays producteurs sont le Portugal, l'Espagne, la France et le Royaume Uni (Massé et Evano - 2001).

Depuis 1960, les captures de sardine dans toute la zone Atlantique Nord-Est sont relativement stables, avec environ 160 000 t débarquées par an (Figure 8). Cependant, la biomasse de spécimens reproducteurs est dans une situation critique. En effet, dans le golfe de Gascogne, une baisse de 75% en 17 ans a été enregistrée, les stocks de biomasse de reproducteurs passant de 800 000 t dans les années 80 à 200 000 t en 1997. La pêche à la sardine ne bénéficie pas à l'heure actuelle d'un quota ou TAC (Total Admissible de Capture), aussi, en plus de limiter les prises aux individus de plus de 11 cm, des mesures spécifiques à chaque pays ont été mises en place pour essayer de stabiliser les populations. Au Portugal par exemple, la pêche est interdite pendant la période de reproduction, la pêche à la bolinche est fermée une semaine par mois et il est interdit de pratiquer des pêches au chalut de plus de 24 h successives (Massé et Evano - 2001).

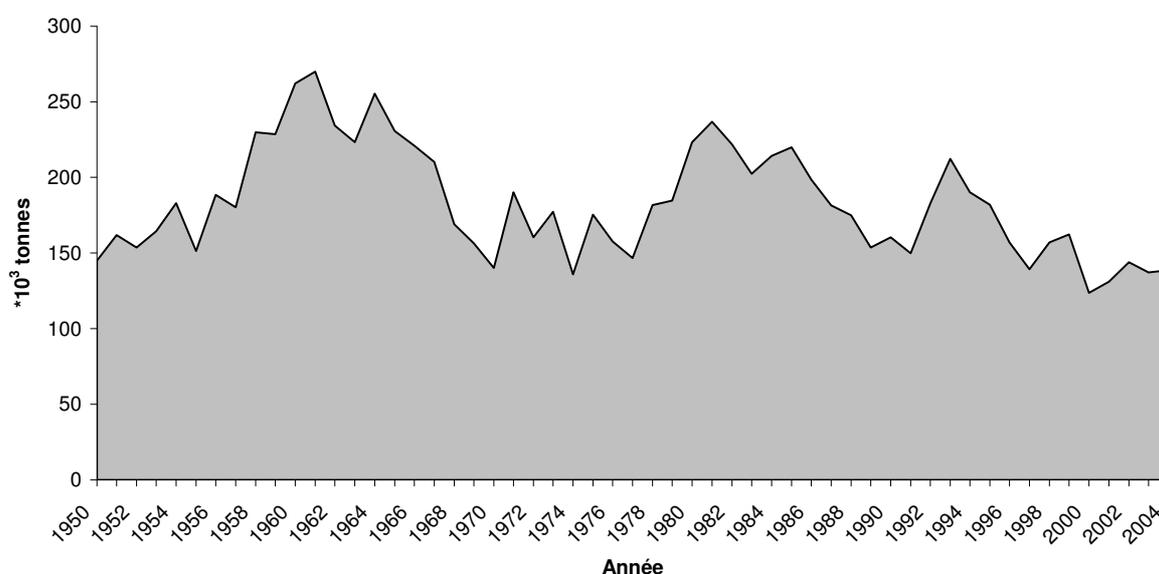


Figure 8 : Tonnages annuels des captures de sardine (*Sardina pilchardus*) en Atlantique Nord Est de 1950 à 2004 (données FIGIS, site FAO). North East Atlantic annual sardine captures from 1950 to our days

A l'instar des poissons, la sardine possède un grand intérêt nutritionnel. La sardine est l'un des poissons les plus riches en lipides et spécifiquement en acides gras de la famille des $\omega 3$ (20 à 30% des acides gras totaux) et le rapport acides gras insaturés / acides gras saturés est très bon puisque proche de 2. En effet, l'Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) recommande un apport alimentaire en acides gras insaturés environ 3 fois supérieur à celui en acides gras saturés (AFSSA - 2003). La sardine est également un des poissons les plus riches en protéines (autour de 20% de la composition totale du filet). Ces protéines ont une très bonne valeur nutritionnelle avec un index UPN (Utilisation Protéique Nette) supérieur à celui du bœuf. Ces protéines sont de plus une bonne source d'acides aminés indispensables puisque 100g de sardine suffisent à couvrir 100% des besoins quotidiens. La sardine est pauvre en glucides (0,1% par rapport au poids frais), et contient des vitamines, des sels minéraux et des oligo-éléments. Comme pour les acides aminés, une portion de 150 g couvre les besoins journaliers en vitamines D et E et apportent une quantité intéressante de vitamine A. Elle contient peu de sodium mais est riche en calcium, magnésium et potassium. Avec toutes ces qualités, la sardine est un aliment hypocalorique (170 kcal pour 100g) pouvant être intégré dans la plupart des régimes alimentaires (De Koning et H Mol - 1991), elle a ainsi été classée parmi les 11 espèces de poisson possédant les meilleures recommandations nutritionnelles par la société américaine du cœur (American Heart Association), les autres espèces étant le maquereau, le hareng de l'Atlantique et du Pacifique, la truite de rivière, le saumon de l'Atlantique, le saumon royal, le saumon rouge, l'anchois, la morue noire et le tassergal (Sidhu - 2003).

1.2. Les co-produits : utilisation actuelle et valorisation potentielle

1.2.1. Qu'appelle-t-on co-produit et quelles sont les contraintes de collecte ?

Les rejets sont la portion des prises rejetée à la mer, quelle qu'en soit la raison. La politique actuelle des Nations Unies, la déclaration de Kyoto et le code de conduite pour une pêche responsable encouragent à minimiser les rejets. En 1998, la FAO estimait la quantité de rejets mondiaux à 20 millions de tonnes (FAO fisheries department - 2004), soit 15 % des captures totales. La principale cause des rejets est la capture d'espèces non ciblées, plus communément appelée pêches accessoires. Des mesures ont été prises de façon à limiter ces captures accessoires, comme l'élaboration de nouveaux filets, le tri des captures à bord, l'introduction de quotas des espèces accessoires. De plus, un marché s'est créé pour certaines espèces de poisson définies comme étant auparavant accessoires. Ces pêches peuvent alors

servir pour l'alimentation piscicole, pour la nutrition humaine en créant une nouvelle demande, pour le secteur de transformation en mer (type bateaux usine produisant du surimi et des produits connexes), pour la fabrication de produits à valeur ajoutée, ou pour combler les vides en cale laissés par la diminution des quotas de certaines espèces non accessoire. Par conséquent, les rejets restant représentent environ 8% de la capture totale mondiale, 13% (1,3 millions de tonnes) en Atlantique Nord-Est (Kelleher - 2005).

Les co-produits sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de production. En vue d'une valorisation, les co-produits sont traités selon le même protocole de conservation que les parties destinées à la production alimentaire garantissant ainsi leur non-altération. Les principaux co-produits de poisson rencontrés sont : la tête, la peau, les chutes de filetage, les arêtes centrales, les viscères, le foie et, selon les périodes de pêche, les éléments reproducteurs tels que les œufs ou la laitance (Figure 9). Selon les espèces, essentiellement pour les espèces de taille importante, les foies peuvent être séparés des viscères.

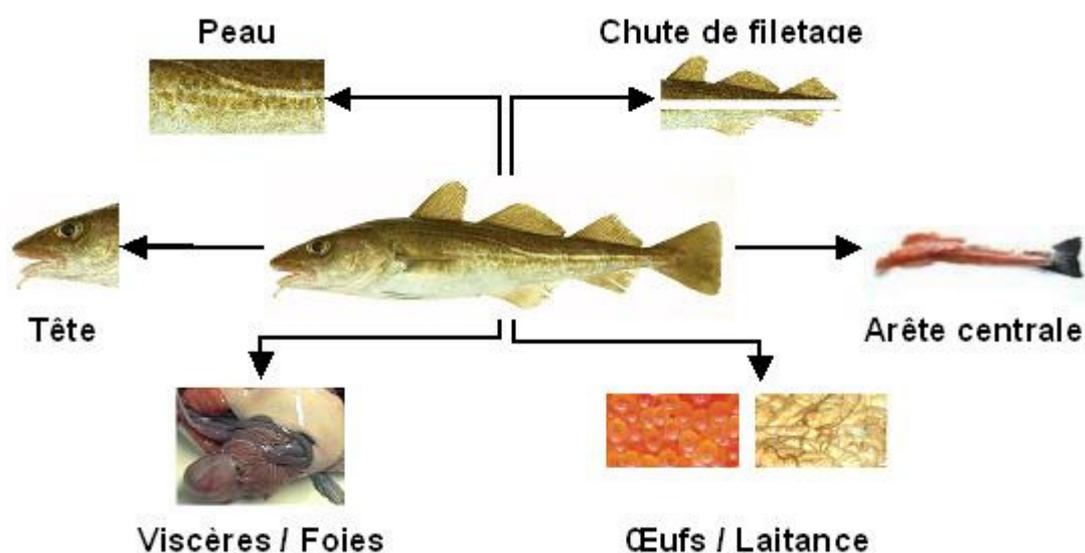


Figure 9 : Principaux co-produits de poisson. *Main fish by-products*

Pour cette étude, seuls les co-produits seront étudiés. Les co-produits représentent entre 30 et 60% de l'animal. La production française annuelle actuelle de co-produits est de 150 000 t, correspondant à 47% du tonnage brut des poissons (Andrieux - 2004). Il existe trois grands types de producteurs de co-produits : les mareyeurs, les sauteurs-saurisseurs et les conserveurs.

Les quantités de co-produits générées par an ont alors suscité l'intérêt des industriels pour rechercher une valeur commerciale à ces produits tout en entrant dans un contexte de développement durable. Plusieurs voies de valorisation peuvent intervenir dans le traitement des co-produits. Aujourd'hui, la pêche et l'aquaculture française valorisent la quasi-totalité de leurs co-produits. Cependant, 96% de cette valorisation conduit à des produits de faible valeur ajoutée. Seulement 4% des co-produits sont transformés en produits d'un intérêt économique plus important, comme des composés aromatiques, la production de protéines spécifiques... (Figure 10).

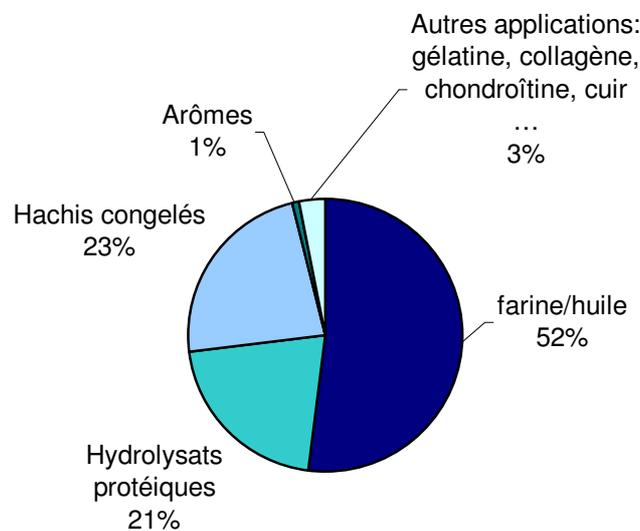


Figure 10 : Proportions des différentes voies de valorisation des co-produits d'origine marine (Andrieux - 2004). *Different marine by-products up-grading fields*

La valorisation des co-produits est soumise à certaines contraintes. En effet, les quantités disponibles par type de co-produits et par espèce sont limitées du fait du caractère pluri-spécifique des pêcheries françaises et de la dispersion des ateliers de mareyage. Les co-produits issus des industries de conserverie et de saurisserie (fabrication de produits fumés) ont l'avantage d'être plus spécifiques et plus concentrés géographiquement. Les co-produits prêts à l'emploi ont de plus un coût de revient élevé dû au circuit de collecte en plusieurs étapes (tri, lavage, congélation, stockage et transport). La qualité des co-produits varie en fonction de la saison et des espèces débarquées, ce qui rend difficile la standardisation des

procédés. De plus, des contraintes réglementaires viennent s'ajouter à ces contraintes technico-économiques. En effet, la France possède une réglementation très restrictive (par rapport aux autres pays européens) en ce qui concerne les secteurs de la diététique et de la nutraceutique. La production de pulpe en France doit obligatoirement être réalisée sur place et sans délai après l'opération de filetage, interdisant ainsi tout transport des co-produits. Enfin, la prise de conscience du fait que les co-produits, pour être valorisés, doivent être traités comme des matières nobles est encore à l'heure actuelle très faible (Andrieux - 2004).

1.2.2. Les voies de valorisation des co-produits : produits dérivés

Le produit dérivé est le produit commercial obtenu à partir d'un co-produit. Un co-produit pourra donner plusieurs produits dérivés. Ainsi, la tête d'un poisson pourra être valorisée en tant que farine, huile ou destinée à l'alimentation, les viscères peuvent donner des farines et de l'huile, mais aussi des vitamines, la peau pourra être transformée en farine, en cuir ou en gélatine (Guérard *et al.* - 2004). Ces produits sont qualifiés de produits dérivés et non de produits finis car ils sont généralement commercialisés sous forme d'ingrédients, c'est-à-dire sous forme de produits intermédiaires pour la nutrition humaine, l'alimentation animale, la diététique, la cosmétique. Néanmoins, certains co-produits (foies, œufs) peuvent être vendus à l'état brut aux consommateurs, mais cette tendance est faible. Leur utilisation par les industries de conserverie et de saurisserie est plus commune (Andrieux - 2004).

Quatre catégories de produits dérivés peuvent-être distinguées en fonction de leur destination :

- L'utilisation en nutrition humaine ou alimentation animale
- L'utilisation en diététique ou nutraceutique
- L'utilisation en cosmétique
- L'utilisation plus restreinte et spécifique d'un seul type de produit dérivé

Dressons maintenant un inventaire des différentes applications possibles des co-produits.

1.2.3. Farines et huiles de poisson

Cette valorisation est actuellement la plus importante car tous les co-produits peuvent être utilisés sans distinction. Elle ne nécessite aucun tri, seule la distinction co-produits issus de poissons sauvages ou d'élevage doit être faite.

1.2.3.1. Procédé de fabrication

Les huiles et les farines de poisson sont issues du même procédé de transformation. Ce procédé vise à séparer les fractions solides, huileuses et aqueuse de la matière première, en minimisant au mieux les coûts et en obtenant des produits de la meilleure qualité possible.

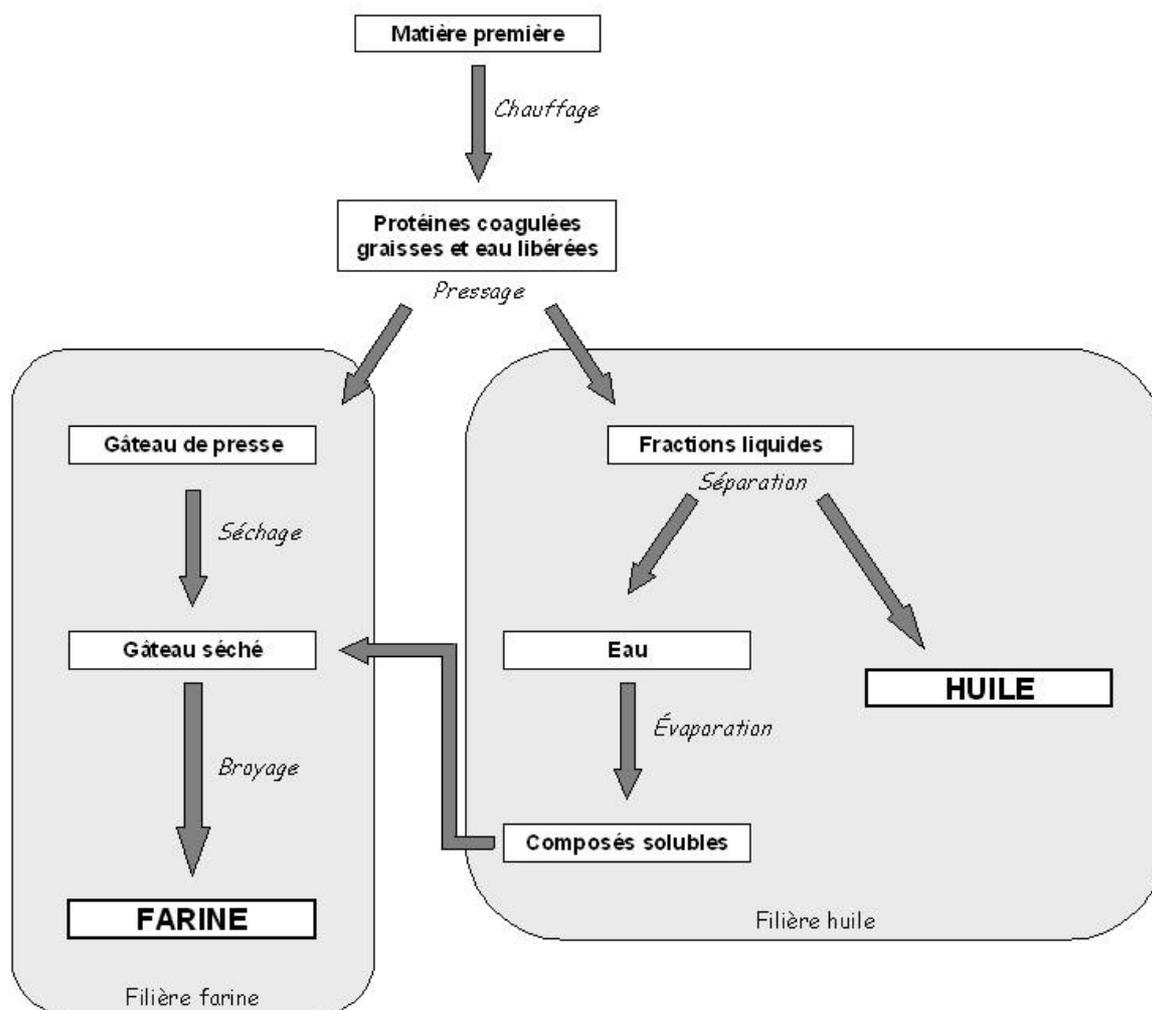


Figure 11 : Procédé de fabrication d'huiles et de farines de poisson. Fish meal and oil process

La Figure 11 récapitule les différentes étapes du procédé d'obtention de farines et d'huiles de poisson. La matière première est chauffée de façon à permettre la coagulation des protéines et la libération des huiles et de l'eau. Ensuite, le mélange est pressé (ou centrifugé), éliminant ainsi les fractions liquides (eau et huile). A ce stade, une séparation de l'eau et de l'huile peut-être effectuée par centrifugation ou décantation (cette étape est réalisée dans le cas de matrices riches en graisses). L'eau recueillie est ensuite évaporée, concentrant les composés solubles qui seront ajoutés au gâteau de presse obtenu précédemment. Ce gâteau est

ensuite séché de façon à former une préparation stable. Cette préparation est ensuite broyée de façon à obtenir la granulométrie désirée (FAO fisheries departement - 1986).

1.2.3.2. Les farines de poisson

En 2005, la production mondiale de farine de poisson s'élevait à 6,3 millions de tonnes. Le Pérou, avec une production de 2,2 millions de tonnes en 2005 génère à lui seul 35% des farines mondiales. Les autres principaux pays producteurs sont le Chili (795 000 t), le Danemark (214 000 t), L'Islande (179 000 t) et la Norvège (154 000 t) (Figure 12). Les principales espèces de poisson utilisées pour la réalisation de ces farines sont les petits pélagiques comme l'anchois, la sardine, le hareng, le chinchard, le capelan mais aussi le merlan bleu.

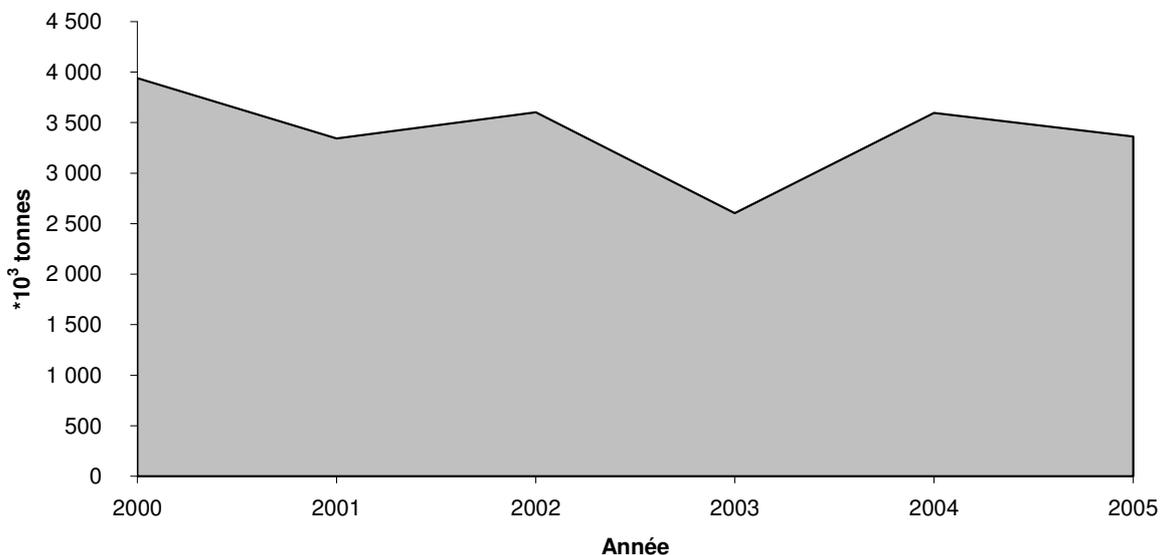


Figure 12 : Production de farines de poisson par les 5 plus gros pays producteurs de 2000 à 2005 (source globefish.org). Fish meal production by the 5 main producers during the 5 last years

Les farines produites contiennent en général de 65 à 67% de protéines et pas plus de 12% de lipides (source IFFO, organisation internationale des aliments de poisson et des huiles de poisson). Cependant, des farines enrichies en protéines peuvent être élaborées pour des utilisations spécifiques.

Les farines de poisson sont essentiellement destinées à la nutrition animale. Ces farines sont idéales pour la nutrition des volailles, des ruminants ou des poissons omnivores. Des alimentations plus spécifiques doivent être apportées aux poissons carnivores, aux crustacés et aux porcelets (source IFFO). Les craintes suscitées par l'encéphalopathie spongiforme bovine

(ESB) ont plané en 2001 sur le marché de la farine de poisson en Europe. Au début de 2001, la CE a interdit l'utilisation des protéines animales dans tous les aliments pour animaux, à l'exception de la poudre de lait et de la farine de poisson. L'utilisation de cette dernière n'a été interdite que pour l'alimentation des ruminants (FAO/SMIAR - 2001).

En nutrition aquacole, les farines de poisson ont l'avantage de procurer une source d'alimentation virtuellement identique à celle des populations sauvages. Cependant, la réglementation interdit l'utilisation de poisson ou de co-produits de poisson issus de l'aquaculture pour la réalisation des farines, de façon à ne pas déséquilibrer l'alimentation. Ces farines possèdent une composition équilibrée en protéines et en lipides afin d'optimiser la croissance des élevages (source IFFO). De plus, les farines de poisson offrent un large panel de composition essentiellement attribuable aux nombreuses espèces de poisson pouvant être impliquées dans la réalisation de ces farines. Il est ainsi possible de sélectionner les farines en fonction de leur composition nutritionnelle ou de leur origine spécifique (Goytortúa-Bores *et al.* - 2006; Nankervis et Southgate - 2006), de composer des alimentations en mélangeant plusieurs types de farines de façon à permettre l'optimisation de la croissance des poissons d'élevage, comme le saumon par exemple (Hevrøy *et al.* - 2004). Des études ont également montré qu'une alimentation 100% végétale ne permettait pas une croissance des poissons et une efficacité de nutriments aussi bonne qu'avec une nourriture composée de farine de poisson (Li *et al.* - 2006). Les farines issues des co-produits marins sont aussi digestes et efficaces que celles issues de poissons entiers pour l'alimentation de la crevette (Sudaryono *et al.* - 1996), de la morue (Toppe *et al.* - 2006) ou de Perciformes (Li *et al.* - 2004). En oviculture, l'utilisation des farines de poisson à la place de l'urée pour l'alimentation des agneaux s'est révélée être d'un grand intérêt (Ponnampalam *et al.* - 2005; Can *et al.* - 2005).

1.2.3.3. Les huiles de poisson

En 2004, 930 000 t d'huiles de poisson ont été produites dans le monde. Comme pour l'industrie des farines de poisson, le Pérou est le plus gros producteur,. Suivent le Danemark, le Chili, l'Islande et la Norvège. Ces 5 pays produisent à eux seuls plus de 60% de la production mondiale (Figure 13). La production d'huile de poisson subit depuis 2000 une baisse conséquente d'environ 50% en 5 ans. Cependant, d'après les données enregistrées depuis de nombreuses décennies, la production d'huiles de poisson a toujours été fluctuante. Cette variation de la production est une conséquence directe des effets climatiques, notamment ceux engendrés par le phénomène El Niño (Shepherd *et al.* - 2005). Toutefois,

après ces chocs climatiques, la production a tendance à remonter. En effet, après les chocs majeurs du phénomène El Niño en 1992 et 1998, la production mondiale d'huiles en 1999-2000 s'élevait à 1,51 million de tonnes (Gunstone - 2002).

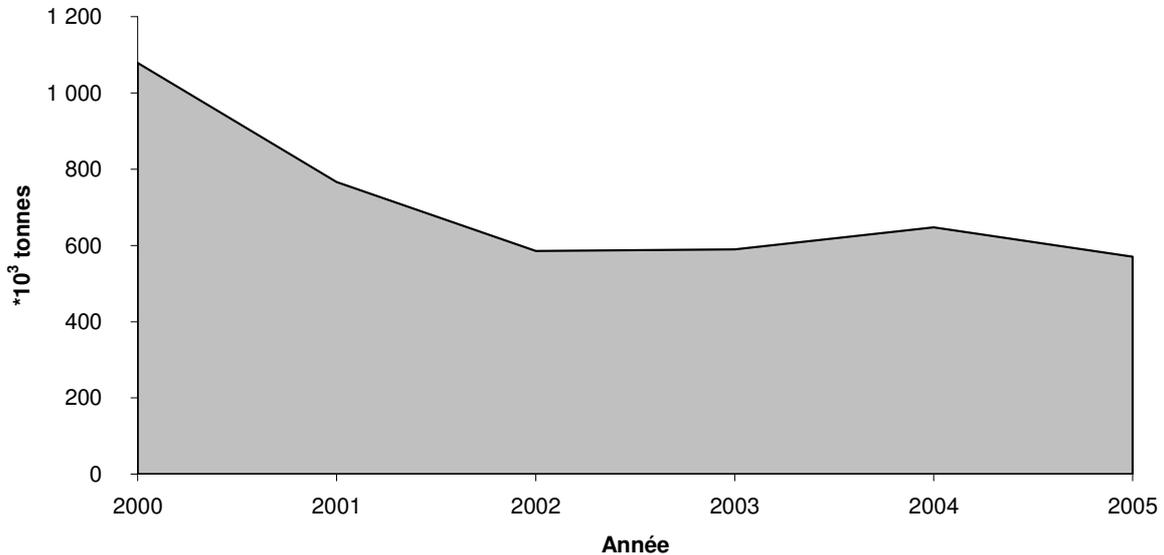


Figure 13 : Production d'huiles de poisson par les 5 plus gros pays producteurs de 2000 à 2005 (source globefish.org). Fish oil production by the 5 main producers during the 5 last years

En 1990, d'après l'organisation internationale des aliments de poisson et des huiles de poisson (IFFO), 70% de ces huiles étaient destinées à la fabrication de margarines ou d'huiles de cuisson, 16% à l'aquaculture et 8% pour un usage industriel. A l'heure actuelle, les tendances ont changé, notamment marquées par la baisse des huiles de poisson destinées à la consommation humaine (31% en 2000) et par l'augmentation de leur usage en aquaculture (57%). L'industrie pharmaceutique joue aussi un rôle dans l'utilisation de ces huiles de poisson (1% en 2000). La diminution spectaculaire de l'utilisation des huiles de poisson pour la nutrition humaine est due au fait que ces huiles sont principalement utilisées en tant que margarines. En effet, les margarines sont des huiles hydrogénées (les acides gras insaturés deviennent saturés par hydrogénation) pour pouvoir être sous forme solide. Or le principal intérêt nutritionnel des huiles de poisson réside dans la présence d'acides gras insaturés (type $\omega 3$ ou $\omega 6$, cf. 1.2.6.4). Ainsi, l'hydrogénation conduit à la perte de l'intérêt apporté par les huiles de poisson, cause de la baisse de l'utilisation des huiles pour la nutrition humaine. La Figure 14 illustre ces données, et indique en plus une prévision de l'utilisation de ces huiles pour l'année 2010.

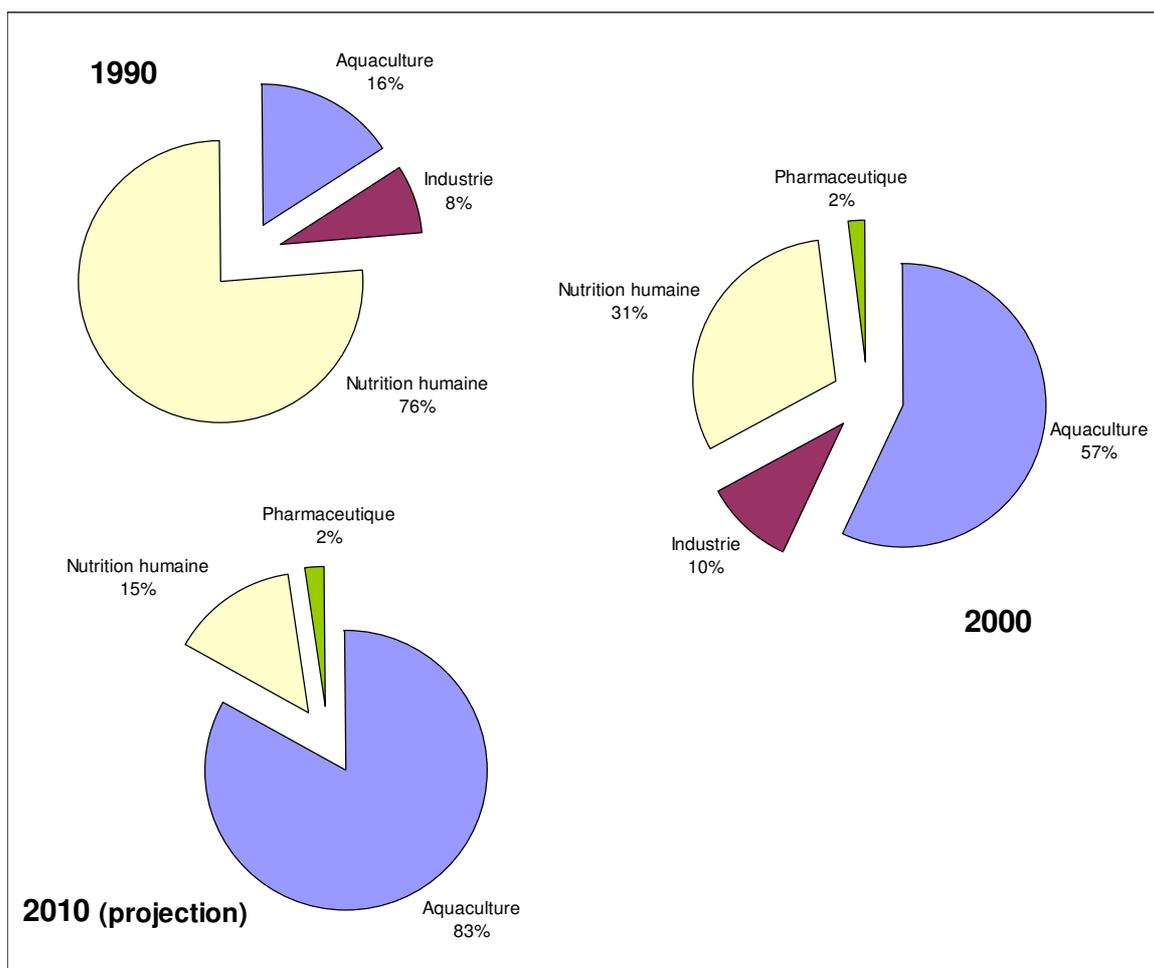


Figure 14 : Utilisation des huiles de poisson durant la période 1990-2010 (Source IFFO). *Fish oil utilization from 1990 to 2010*

De plus, outre les qualités initialement présentes dans les huiles de poisson, il est désormais possible d'enrichir ces huiles en $\omega 3$ (Shahidi et Wanasundara - 1998; Gunstone - 1999; Xu *et al.* - 2000; Xu - 2000; Linder *et al.* - 2001; Camacho PaezPáez B. *et al.* - 2002; Rao *et al.* - 2002; Linder *et al.* - 2002) en utilisant notamment des enzymes spécifiques (lipases, ligases) permettant de greffer des acides gras sur la partie glycérol des lipides.

1.2.4. Les hydrolysats

1.2.4.1. Définition

Les hydrolysats sont des fractions à teneur protéique élevée (73 à 85%) obtenus par autolyse (uniquement sous l'action d'enzymes endogènes) ou hétérolyse (avec l'ajout d'enzymes exogènes). L'aspect des hydrolysats sous forme séchée peut ressembler à celui des farines, cependant, la proportion en éléments minéraux est assez faible car les arêtes osseuses non hydrolysables ont été retirées. Les hydrolysats ont donc les avantages d'être très digests et d'avoir une haute qualité nutritive.

1.2.4.2. Les autolysats et produits fermentés

Les produits fermentés et les autolysats font tous deux intervenir les enzymes initialement présentes dans le produit de départ.

La fermentation des produits marins est connue depuis l'antiquité comme moyen de conservation du poisson. La prolifération bactérienne y est contrôlée par ajout de sucre et/ou de sel, déshydratant ainsi le produit. Dans ces mélanges complexes, la présence d'inhibiteurs naturels et la force ionique élevée diminuent l'activité des enzymes endogènes. La vitesse d'autolyse est alors très faible, la durée du procédé pouvant durer plusieurs mois (Roy et Durand - 1997). Les produits fermentés peuvent être de plusieurs types :

- sauces et pâtes de poisson orientales (Nuoc-Mam, Mam-Tom), pouvant être réalisées à partir de toutes les espèces de poissons et de crustacés, du moment que les enzymes soient suffisantes pour réaliser l'autolyse (Gildberg - 1992)
- anchois salés et maturés d'origine basque et méditerranéenne
- produits venant des pays nordiques, essentiellement à base de hareng.

Les autolysats sont élaborés en plusieurs étapes, à partir de poissons entiers ou de viscères. L'hydrolyse est réalisée par des enzymes endogènes, principalement par des protéases digestives et par des enzymes tissulaires. L'hydrolyse peut être contrôlée par les facteurs de pH, de température ou par salinité, ce qui permet une production standard, de qualité connue. Les autolysats, riches en protéines solubles et en acides aminés essentiels, constituent une nourriture idéale pour l'alimentation animale (Ravallec-Plé - 2000).

1.2.4.3. Les hétérolysats

Les hydrolyses sont, dans ce cas, réalisées grâce à l'ajout d'enzymes exogènes. L'ajout d'enzymes pour la réalisation d'hydrolyses de poisson date de l'après seconde guerre mondiale (Gildberg - 1993). Les différentes enzymes mises en jeu peuvent provenir de différentes origines. Elles peuvent être issues d'une purification d'enzymes digestives (De Vecchi et Coppes - 1996), extraites de végétaux (papaïne, bromélaïne) ou de l'industrie de génie génétique qui les produit à partir de cultures de bactéries, champignons ou levures. Il est fréquent dans le commerce, de rencontrer plusieurs enzymes sous la forme d'un complexe (c'est le cas notamment pour Alcalase, Protamex et Flavourzyme commercialisées par la société Novozymes). Par simplification, le terme enzyme désigne alors l'ensemble du complexe, mais il faut cependant rester prudent car les modes d'action des enzymes

constitutives de ces mélanges sont différents et entraînent des résultats pouvant varier en fonction des conditions d'hydrolyse. La réalisation du Tableau I a permis un recensement des principales protéases utilisées pour la réalisation d'hydrolyses de matrices d'origine marine. Ce tableau dresse également un aperçu des différentes espèces marines hydrolysées (saumon, morue, sardine, sole, capelan...) et les principales applications destinées aux hydrolysats obtenus. L'utilisation de la fraction protéique de ces hydrolysats (intérêt nutritionnel, source azotée et activité biologique) est majoritaire. Cependant, l'utilisation des hydrolyses enzymatiques pour obtenir des lipides d'intérêt se répand peu à peu. C'est ainsi que les hydrolysats de matrices marines peuvent être valorisés par leur composition protéique ou lipidique. L'obtention des peptides issus des hydrolysats, hormis pour l'alimentation animale, est une source de composés possédant une haute valeur ajoutée. Ainsi, ces composés seront détaillés dans le paragraphe 1.2.6.3.

Tableau I : Principales protéases utilisées pour l'hydrolyse des co-produits marins. *Main proteases used for marine by-product hydrolysis*

Enzyme (source, fournisseur)	EC	pH	Température (°C)	Espèce hydrolysée	Utilisation	Références	
Alcalase (Bactérie, Novozymes)	3.4.21.62	6-10	55-70	capelan	Intérêt nutritionnel	Shahidi <i>et al.</i> - 1995	
	3.4.21.19			crevette	Activité biologique	Bordenave <i>et al.</i> - 2002	
	3.4.22.31				Intérêt nutritionnel	Gildberg et Stenberg - 2001	
					hareng	Intérêt nutritionnel	Hoyle et Merrit - 1994
					morue	Activité biologique	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt - 2003
						Intérêt nutritionnel	Lalasisidis <i>et al.</i> - 1978
						Libération des lipides	Šližyte <i>et al.</i> - 2005b
						Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> - 2005a; Aspmo <i>et al.</i> - 2005b
					morue, saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> - 2000
					thon	Source azotée	Guérard <i>et al.</i> - 2001
					sardine	Activité biologique	Rousseau <i>et al.</i> - 2001; Ravallec-Plé <i>et al.</i> - 2001
						Intérêt nutritionnel	Quaglia et Orban - 1987b
						Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> - 2006
	saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco - 2000b; Kristinsson et Rasco - 2000c				
	sole	Activité biologique	Jun <i>et al.</i> - 2004; Rajapakse <i>et al.</i> - 2005				
	tilapia	Intérêt nutritionnel	Abdul-Hamid <i>et al.</i> - 2002				
Neutrase (Bactérie, Novozymes)	3.4.24.28	5,5-7,5	45-55	capelan	Intérêt nutritionnel	Shahidi <i>et al.</i> - 1995	
				morue	Intérêt nutritionnel	Šližyte <i>et al.</i> - 2005a	
					Libération des lipides	Daukšas <i>et al.</i> - 2005; ĐliËyte <i>et al.</i> - 2005	
					Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> - 2005a; Aspmo <i>et al.</i> - 2005b	
				morue, saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> - 2000	
	sole	Activité biologique	Jun <i>et al.</i> - 2004; Rajapakse <i>et al.</i> - 2005				

Enzyme (source, fournisseur)	EC	pH	Température (°C)	Espèce hydrolysée	Utilisation	Références
Protamex (Bactérie, Novozymes)	3.4.21.62	6-8	35-60	morue	Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> - 2004
	3.4.24.28			sardine	Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> - 2005a; Aspmo <i>et al.</i> - 2005b
				saumon	Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> - 2006
Corolase 7089 (Bactérie, Rohm enzymes)	n.c.	7,5	40	saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> - 2003
						Kristinsson et Rasco - 2000b; Kristinsson et Rasco - 2000c
Pronase E. (Bactérie, Sigma)		5-9	37	sole	Activité biologique	Jun <i>et al.</i> - 2004
Protease N (Bactérie, Amano Pharmaceutical)				maquereau	Activité biologique	Wu <i>et al.</i> - 2003
Flavourzyme (Champignon, Novozymes)	3.4.11.1	5-8	40-60	morue	Intérêt nutritionnel	Šližyte <i>et al.</i> - 2005a
				sardine	Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> - 2004; Daukšas <i>et al.</i> - 2005; Āliēyte <i>et al.</i> - 2005
				saumon	Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> - 2006
Kojizyme (Champignon, Novozymes)	3.4.11.1	5,5-6	45-55	morue, saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco - 2000b; Kristinsson et Rasco - 2000c
Umamizine (Champignon, Amano Pharmaceutical)	3.4.21.63 3.4.24.39	7	45	thon	Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> - 2000
Corolase PN-L (Champignon, Rohm enzymes)	n.c.	7,5	40	saumon	Source azotée	Guérard <i>et al.</i> - 2002
Pepsine (Viscères, Sigma)	n.c.	7,5	40	saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco - 2000b; Kristinsson et Rasco - 2000c
	3.4.23.1	2-4	35-40	morue, saumon	Intérêt nutritionnel	Liaset <i>et al.</i> - 2000
Trypsine (Viscères, Sigma)	3.4.21.4	6-8	35-60	crevette	Activité biologique	Jun <i>et al.</i> - 2004; Rajapakse <i>et al.</i> - 2005
				sole	Intérêt nutritionnel	Simpson <i>et al.</i> - 1998
				sole	Activité biologique	Jun <i>et al.</i> - 2004; Rajapakse <i>et al.</i> - 2005

Enzyme (source, fournisseur)	EC	pH	Température (°C)	Espèce hydrolysée	Utilisation	Références
Chymotrypsine (Viscères, Sigma)	3.4.21.1	7-8	25-40	crevette	Intérêt nutritionnel	Simpson <i>et al.</i> - 1998
				morue	Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> - 2004
				sole	Activité biologique	Jun <i>et al.</i> - 2004; Rajapakse <i>et al.</i> - 2005
Bromelaine (Végétal, Biochem europe)	3.4.22.32	5-9	20-65	morue	Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> - 2005a; Aspmo <i>et al.</i> - 2005b
Papaine (Végétal, Biochem europe / Sigma / Guangzhou)	3.4.22.2	5-8	40-80	capelan	Intérêt nutritionnel	Shahidi <i>et al.</i> - 1995
	3.4.22.6			hareng	Intérêt nutritionnel	Hoyle et Merrit - 1994
	3.4.22.30			morue	Libération des lipides	Dumay <i>et al.</i> - 2004
	3.4.22.25				Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> - 2005a; Aspmo <i>et al.</i> - 2005b
				<i>Saurida elongata</i>	Activité biologique	Dong <i>et al.</i> - 2005
	sole	Activité biologique	Jun <i>et al.</i> - 2004; Rajapakse <i>et al.</i> - 2005			
Actinidine (Végétal, Biochem europe)	3.4.22.14	4-7	15-40	morue	Source azotée	Aspmo <i>et al.</i> - 2005a; Aspmo <i>et al.</i> - 2005b
E. digestive maquereau	-	10	50	lieu	Activité biologique	Je <i>et al.</i> - 2005
E. digestive morue	-	7	40	morue	Intérêt nutritionnel	Gildberg <i>et al.</i> - 2002
E. digestive saumon	-	7,5	40	saumon	Intérêt nutritionnel	Kristinsson et Rasco - 2000b; Kristinsson et Rasco - 2000c
E. digestive thon	-	10	50	sole	Activité biologique	Jun <i>et al.</i> - 2004; Rajapakse <i>et al.</i> - 2005

n.c. : non communiqué

1.2.5. Les hachis

Les hachis représentent la troisième voie de valorisation de masse en France avec une production de 33 000 t en 2002 (Andrieux - 2004).

Seuls les co-produits viscéres sont exclus de cette valorisation, ainsi que tous les poissons cartilagineux. Après un tri spécifique, les co-produits sont broyés et filtrés, puis le hachis obtenu est congelé en blocs.

Ces produits dérivés sont utilisés pour la fabrication d'aliments pour animaux domestiques, essentiellement les chats. Les hachis, souvent commercialisés sous forme congelée, sont une bonne source de protéines. De plus, ils permettent aux fabricants de petfood d'appliquer un certain nombre d'allégations de type « cabillaud », « poisson blanc », « saumon », « truite » pour leur gamme d'aliments humides et secs (Andrieux - 2004).

1.2.6. Production de composés de haute valeur ajoutée

Certains co-produits, plus spécifiques, peuvent quant à eux, servir à la production de composés possédant des caractéristiques précises leur conférant une haute valeur marchande. Ces produits dérivés sont essentiellement utilisés en diététique, nutraceutique ou cosmétique.

1.2.6.1. Chitine / Chitosan

La chitine est un biopolymère insoluble composé de séquences linéaires d'acétylglucosamine. La chitine est extraite de carapaces de crustacés, d'os de seiche ou de plumes de calmars. Chez la crevette, la chitine représente environ 1/3 de la carapace. La chitine représente le deuxième polymère naturel en abondance sur la terre après la cellulose (www.marinard.com). Sous forme déacétylée, la chitine devient chitosan (Figure 15). Le chitosan est un produit biologique possédant une charge électrique positive due à un doublet d'électrons libres sur l'atome d'azote du groupement $-NH_2$.

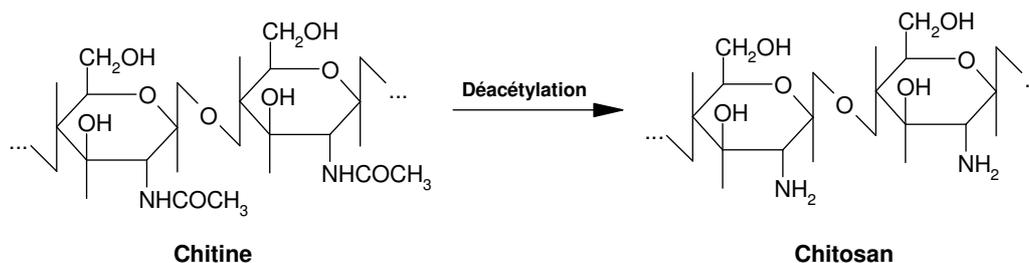


Figure 15 : Désacétylation de la chitine en chitosan. *Chitin deacetylation in chitosane*

Cette propriété, exceptionnelle dans le milieu biologique permet au chitosan de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement et de les fixer solidement par liaison ionique. Le chitosan présente également des propriétés filmogènes et bioadhésives lui permettant des applications en cosmétologie et en médecine. Il présente également des propriétés fongicides et bactéricides. Ces propriétés variées ont permis de recenser, en 2000, plus d'une centaine d'applications du chitosan (Marinard Biotech. - 2003). Les différentes applications du chitosan sont essentiellement fonction du degré de pureté du composé (Tableau II).

Tableau II : Différentes applications du chitosan (Marinard Biotech. - 2003). *Different chitosan applications*

Technique	Pur	Ultra-pur
<u>Traitement d'eau</u>	<u>Nutraceutique</u>	<u>Biotechnologies</u>
Floculant/coagulant	Agent de conservation	Immobilisation d'enzymes
	Stabilisant	Séparation de protéines
<u>Pâtes et papier</u>	Additif	Immobilisation de cellules
Traitement de surface		Chromatographie
Traitement de masse	<u>Cosmétique</u>	
Papier carbone	Soin des cheveux	<u>Biomédical</u>
	Crème peau, main, visage	Libération contrôlée
<u>Agriculture</u>	Humidifiant	Traitement des plaies
Enrobage graine	Dentifrice	Réduction du cholestérol
Relargage	Agent anti-bactérien	Peau artificielle
Fertilisant	Anti-odeur	Lentilles cornéennes
Bio-fongicide		Pansements
		Traitement des os et cartilage

A ce jour, le coût de production de la chitine et du chitosan en France est trop élevé pour être rentable (150 €/kg contre 20 €/kg hors Europe). La transformation de calmar et de seiche est quasiment inexistante en France, la majorité des pêches étant exportées en brut. Il n'y a donc pas assez de co-produits disponibles pour établir un marché (Andrieux - 2004).

1.2.6.2. Collagènes et gélatine

Les collagènes sont des macromolécules de nature glycoprotidique très répandues dans le règne animal comme chez l'homme : ils représentent environ 30% des protéines de l'organisme humain. Ces molécules sont caractérisées par une structure en triple hélice : trois chaînes d'acides aminés s'enroulent sur elles-même, expliquant la difficulté d'une digestion enzymatique de ces molécules. Les collagènes sont relativement stables et peuvent être utilisés comme biomatériau.

Le collagène d'origine marine peut être natif (obtenu par extraction douce) ou hydrolysé. La forme hydrolysée du collagène ou dénaturée par chaleur est plus communément appelée gélatine. Tous deux sont obtenus à partir de peaux, de nageoires, d'arêtes, de vessies natatoires ou de tout tissu conjonctif. De nombreuses études ont été réalisées sur l'extraction de collagènes à partir de co-produits marins, essentiellement des arêtes et des peaux de poissons (Morimura *et al.* - 2002; Sadowska *et al.* - 2003; Kolodziejska *et al.* - 2004; Muyonga *et al.* - 2004; Ogawa *et al.* - 2004). Le collagène natif (PM > 300 kD) pourra être utilisé dans la réalisation d'implants pour le lissage des rides et des cicatrices du visage. Les gélatines (PM < 100 kD), en plus de leur fonctions gélifiantes (Badii et Howell - 2006) seront utilisés en tant qu'agents filmogènes perméables à l'air qui favorisent la régénération cellulaire (Andrieux - 2004).

Le rôle des collagènes dans l'organisme est multiple ; ils interviennent dans la croissance et la différenciation cellulaire, ils ont des propriétés hémostatiques (Althabe - 1992). Des hydrolysats de collagène obtenus à partir de co-produits marins ont montré une activité anti-radicalaire et hypotensive (Morimura *et al.* - 2002). Une mise au point récente sur les composés actifs provenant des co-produit marins indique que les collagènes possèdent également des propriétés intéressantes dans le traitement de cancers, qu'ils réduisent les douleurs des patients atteints d'arthrite osseuse et qu'ils préviennent la formation de cartilage et d'os. En industrie médicale et pharmaceutique, les collagènes sont utilisés en tant que molécules porteuses de principes actifs, de protéines ou de gènes (Kim et Mendis - 2006). Les collagènes sont dépourvus de caractère antigénique. Ils sont par conséquent biocompatibles avec les tissus vivants.

Les gélatines, sous formes moins pures, peuvent également être utilisées dans des domaines aussi variés que les industries agroalimentaire (en tant que gélifiant), chimique (microencapsulation, papier carbone), photographique et électronique ou en tant qu'adhésif (glue) (Ockerman et Hansen - 2000).

1.2.6.3. Les peptides

Lorsqu'elles subissent une hydrolyse enzymatique avec des protéases, les protéines sont alors clivées en peptides. L'action des enzymes sur la formation des peptides est prépondérante puisqu'elle va jouer sur la taille et la fonction des peptides générés lors de l'hydrolyse. En effet, les modifications apportées sont souvent requises pour la production de composés possédant des propriétés plus désirables qui pourraient par exemple entrer dans la

formulation de produits alimentaires (Quaglia et Orban - 1987b). De nombreuses voies de valorisation des peptides issus des hydrolyses de co-produits marins sont citées dans la littérature.

1.2.6.3.1. Source azotée

Dans la culture d'organismes microbiologiques (bactéries, champignons, levures), la source de nutriments représente le plus gros investissement (Martone *et al.* - 2005). L'utilisation d'hydrolysats de poisson comme source de nutriments pour ces organismes constitue une bonne voie de valorisation. Cette utilisation permettrait conjointement d'augmenter la valeur des hydrolysats et de réduire le coût de production de la culture cellulaire. Une étude menée en 1989 indique que des hydrolysats de compost de poisson amélioreraient la seconde partie de la croissance d'un champignon acide, *Scytalidium acidophilum*, valorisant ainsi le compost de poisson jusque là difficilement utilisable du fait de la forte odeur dégagée (Martin et Chintalapati - 1989). Plus récemment, des travaux ont validé le remplacement d'un milieu de croissance commercial par des hydrolysats provenant de viscères de morue ou de thon pour la croissance de bactéries, de levures et de champignons (Guérard *et al.* - 2001; Aspino *et al.* - 2005b). De façon similaire, une étude menée sur 3 bactéries différentes et sur une archéobactérie (*Bacillus subtilis* (gram⁺), *Staphylococcus epidermis* (gram⁺), *Escherichia coli* (gram⁻) et *Halobacterium salinarum*) montre qu'un hydrolysat de hareng contenant 80% de protides et peu d'acides aminés libres permet une culture identique à celle obtenue avec un milieu de référence, à condition que la salinité et le pH de l'hydrolysat soient identiques (Martone *et al.* - 2005). Les peptides contenus dans ces hydrolysats permettent ainsi la croissance non sélective d'organismes microbiologiques (bactéries gram⁺, gram⁻ ou archéobactéries poussent avec le même hydrolysat).

1.2.6.3.2. Intérêt nutritionnel et alimentaire

➔ En nutrition humaine

Les hydrolysats de poisson sont utilisés depuis de nombreuses années. Dans l'antiquité, les produits fermentés permettaient la conservation du poisson. Depuis, les laboratoires recherchent des caractéristiques plus précises pour l'utilisation et la valorisation des hydrolysats. Ainsi, en 1975, une équipe japonaise faisait le rapprochement entre la saveur d'un hydrolysat de poisson et celle du monoglutamate de sodium (Noguchi *et al.* - 1975). Par contre, dans certaines applications, la note poisson peut être néfaste pour l'utilisation des

hydrolysats à des fins alimentaires. Une étude portant sur le hareng démontre que la teneur en lipides est corrélée avec l'intensité de l'odeur (Hoyle et Merrit - 1994).

La digestibilité des protéines de poisson hydrolysées présente un avantage pour la nutrition de personnes dont le système digestif est en dysfonctionnement. En effet, des régimes adéquats en fonction des pathologies peuvent être élaborés par synthèse mais ces productions sont très coûteuses. Depuis les années 70, les recherches se sont tournées vers les hydrolysats de poisson, montrant que les intérêts nutritionnels et la composition de ces produits pouvaient être incorporés en alimentation humaine dans des régimes spécifiques. En effet, le taux de protéides solubles est important et la composition en acides aminés équilibrée. Les hydrolysats de morue (Lalasisidis *et al.* - 1978), de tilapia (Abdul-Hamid *et al.* - 2002), de saumon (Liaset *et al.* - 2003) ont montré leurs grandes valeurs nutritionnelles, parfois supérieures à celles des régimes synthétiques. Un hydrolysat provenant d'un poisson de mer de faible valeur, *Saurida elongata*, a également montré des propriétés anti-anémiantes (Dong *et al.* - 2005). En plus de leur intérêt nutritionnel, les hydrolysats de poisson peuvent conférer aux produits auxquels ils sont associés une augmentation du rendement de la cuisson (en diminuant les pertes en eau et en protéines occasionnées) et des propriétés anti-oxydantes (Shahidi *et al.* - 1995).

L'amertume des peptides générés lors de l'hydrolyse est un frein pour l'utilisation des hydrolysats en alimentation humaine (Kristinsson et Rasco - 2000b). Cette apparition est due à la libération des acides aminés hydrophobes, qui sont nativement compris à l'intérieur des chaînes peptidiques (Mackie - 1982; Liaset *et al.* - 2000). Certaines protéases sont particulièrement utilisées pour la réduction de l'amertume. Ces enzymes peuvent être utilisées dès le début de l'hydrolyse, comme Protamex (Novozymes - 2001c) et Alcalase (Hoyle et Merrit - 1994), ou à la suite d'une hydrolyse, comme Flavourzyme (Novozymes - 2001b), Kojizyme (Liaset *et al.* - 2000) et la pancréatine (Lalasisidis *et al.* - 1978).

➔ En alimentation animale

Quelques applications ont été trouvées pour l'utilisation des hydrolysats de poisson en tant que substitut du lait pour les bovins et les ovins. En comparaison avec la caséine, les animaux nourris avec les hydrolysats de poisson gras après un début de croissance plus lent, arrivent au même poids au bout de quelques semaines (Ørskov *et al.* - 1982; Ritchie et Mackie - 1982). De plus, une étude économique montre les intérêts des peptides de poisson en tant

que substituts du lait (Merritt - 1982). Pour le bétail adulte, l'ensilage obtenu à partir d'herbe peut être également remplacé par des hydrolysats de poisson (Ouellet *et al.* - 1997).

Mais c'est dans le domaine de l'aquaculture que ces hydrolysats sont les plus valorisés. En effet, en aquaculture, la charge récurrente la plus importante est la source protéique apportée aux animaux. Les protéines de poisson hydrolysées, en plus de leur faible coût, sont d'une grande digestibilité. De plus, de nombreuses études ont montré que certains hydrolysats de poisson possédaient des propriétés nutraceutiques. Ainsi, le remplacement des farines de poisson par des hydrolysats de poisson augmenterait la croissance des crevettes et des larves de poisson (Córdova-Murueta J.H. et García-Carreño F.L. - 2002). Les turbots nourris avec des hydrolysats de poisson, grandissent de façon similaire à ceux nourris traditionnellement par farine de poisson (Olivia-Teles *et al.* - 1999). Les mêmes conclusions ont été apportées pour des tilapias nourris avec de l'ensilage de poisson (Fagbenro et Jauncey - 1998). Les fermes de salmonidés (saumons, truites...) ont suscité le plus grand nombre de recherches à ce sujet. En 2002, une étude sur l'alimentation des truites arc-en-ciel a conclu que, au terme de leurs expérimentations, l'incorporation d'hydrolysats de co-produits de thon ne pouvait être que partielle, une incorporation totale devant faire l'objet d'une expérimentation et d'une optimisation plus poussées (Bald *et al.* - 2002). Quatre années plus tard, une autre équipe démontrait que les saumons pouvaient être élevés sans farine de poisson, en la remplaçant par une farine végétale supplémentée en hydrolysat de poisson (Espe *et al.* - 2006). Les hydrolysats de poisson agiraient de plus sur la prise alimentaire des saumons, permettant une meilleure croissance (Refstie *et al.* - 2004). Les peptides contenus dans ces hydrolysats sont de plus capables d'induire des actions immuno-modulatrices chez les poissons les ingérant (Murray *et al.* - 2003).

1.2.6.3.3. Intérêt fonctionnel

En plus de leur qualités nutritionnelles maintenant établies, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats de poisson ont été étudiées. En effet, pour pouvoir entrer dans la composition des aliments, les hydrolysats doivent avoir des propriétés particulières, concernant l'hydrophobicité, les facultés d'émulsion (et leur stabilité) ou de formation de mousse, la capacité à retenir l'eau. Dans une mise au point sur l'utilisation des hydrolysats de poisson, Kristinsson et Rasco ont souligné le fait que l'ajout de 1,5% d'hydrolysat de saumon réduisait la perte en eau après congélation de 3 à 1% (Kristinsson et Rasco - 2000b). Quaglia et Orban ont montré en 1990 que les hydrolysats de sardine avaient des propriétés émulsifiantes et

hydrophobes variant en fonction de l'avancement de l'hydrolyse (Quaglia et Orban - 1990). D'une manière générale, les propriétés fonctionnelles des hydrolysats sont liées aux conditions d'hydrolyse. Ainsi, en contrôlant ces conditions, il est possible d'obtenir les propriétés fonctionnelles voulues, ce qui permettrait de trouver des applications variées dans les domaines alimentaires, comme dans l'élaboration de vinaigrettes ou de saucisses industrielles (Šližyte *et al.* - 2005a). Concernant les hydrolysats de co-produits de morue, une étude a montré que l'addition d'eau dans le procédé d'hydrolyse avait plus d'influence que l'enzyme choisie : moins il y a d'eau, meilleures sont les propriétés (Šližyte *et al.* - 2005a).

1.2.6.3.4. Activités biologiques

De nombreux articles portent sur les activités biologiques des peptides issus d'hydrolyses protéolytiques. Les peptides marins ne font pas exception. Une revue récente sur les composés marins bio-actifs liste les différentes activités des peptides. Ainsi, ces derniers peuvent avoir des effets anti-hypertenseurs, anti-thrombotiques, immuno-modulateurs, antioxydants, anti-coagulants...(Kim et Mendis - 2006). Les peptides marins interviennent dans le traitement de l'ostéoporose, de l'arthrite, des maladies cardiovasculaires, du diabète, de l'obésité ou encore du cancer (Gildberg *et al.* - 2002; Kim et Mendis - 2006). Le Tableau III précise quelques exemples de ces activités.

Tableau III : Principales activités biologiques des peptides de poisson. *Main biological activities found in fish peptides*

Espèce	Activité	Référence
merlu	réparation du tissu épithélial	Fitzgerald <i>et al.</i> - 2005
sole	anticoagulante	Rajapakse <i>et al.</i> - 2005
sole	anti-oxydante	Jun <i>et al.</i> - 2004
sardine	hypotensive	Bordenave <i>et al.</i> - 2002 Kajimoto <i>et al.</i> - 2005b
sardine	comportement hormonal	Ravallec-Plé <i>et al.</i> - 2001 Rousseau <i>et al.</i> - 2001
morue	secrétagogue	Ravallec-Plé et Van Wormhoudt - 2003
	immuno-modulatrice	Gildberg <i>et al.</i> - 1996
	anti-proliférative	Picot <i>et al.</i> - 2006
maquereau	oxydante	Wu <i>et al.</i> - 2003
lieu	oxydante	Je <i>et al.</i> - 2005
merlu	immuno-modulatrice	Duarte <i>et al.</i> - 2006
carrelet	anti-proliférative	Picot <i>et al.</i> - 2006
merlan	anti-proliférative	Picot <i>et al.</i> - 2006
saumon	anti-proliférative	Picot <i>et al.</i> - 2006

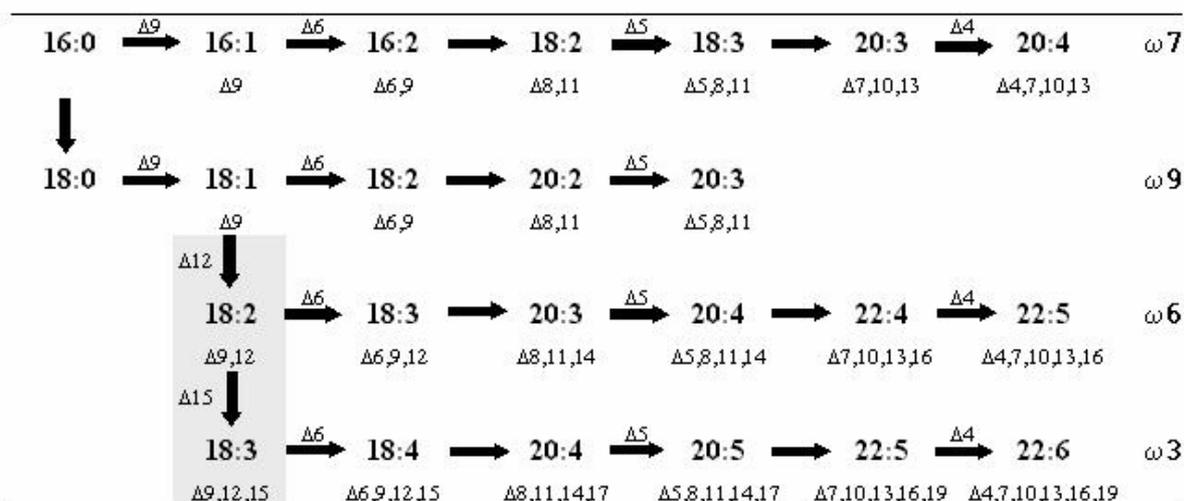
1.2.6.4. Les acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$

Les lipides sont également une source de valorisation avec des enjeux économiques intéressants. En effet, les acides gras de la famille des $\omega 3$ par exemple, remportent depuis quelques années un vif succès marketing et commercial et leurs propriétés sont nombreuses.

1.2.6.4.1. Pourquoi les $\omega 3$ et $\omega 6$ sont-ils importants ?

Seuls les végétaux synthétisent les acides linoléique (C18:2 c $\omega 6$) et linoléique (C18:3 c $\omega 3$) qui doivent donc être apportés lors de l'alimentation animale. Les animaux sont par contre capables de convertir les acides linoléique, linoléique, oléique (C18 :1 c $\omega 9$) et palmitoléique (C16 :1 c $\omega 7$) en 4 familles d'acides gras poly-insaturés (Tableau IV). Les familles $\omega 6$ et $\omega 3$ sont dites essentielles du fait que les animaux supérieurs soient incapables de synthétiser leurs précurseurs et la synthèse de leurs dérivés est insuffisante. Les familles $\omega 7$ et $\omega 9$ ne sont pas considérées comme essentielles. Un rapport de la FAO reconnaît comme essentiels dans l'alimentation humaine les acides gras suivants : C18 :2 c $\omega 6$, C18 :3 c $\omega 3$, C20 :4 c $\omega 6$ et C20 :5 c $\omega 3$ (WHO/FAO - 1977).

Tableau IV : Biosynthèse des acides gras poly-insaturés (Bergé - 1996). *Poly-unsaturated fatty acids biosynthesis*



Δn : désaturase, n étant la position (par rapport au carboxyle) de la double liaison introduite.
 Acides gras synthétisés par les végétaux

1.2.6.4.2. Quelles sont les activités biologiques de ces acides gras ?

Les recherches sur les AGPI se sont accrues depuis une vingtaine d'années, depuis la découverte de leurs actions préventives et thérapeutiques sur de nombreuses pathologies.

Ainsi, les $\omega 3$ ont un effet bénéfique au niveau circulatoire dans la prévention et le traitement de l'artériosclérose, de la thrombose, de l'hypertriglycémie (Barnerjee *et al.* - 1992) et comme régulateur de la pression sanguine (Mortensen *et al.* - 1988). Un des rôles les plus étudiés des acides gras $\omega 3$ est sans doute leur action contre les maladies cardiaques (Jacobson - 2006; Kris-Etherton *et al.* - 2006; Reiffel et McDonald - 2006; Brouwer *et al.* - 2006). Les $\omega 3$ peuvent aussi intervenir dans le traitement des inflammations dues à l'asthme, l'arthrite, les migraines, le diabète, les fonctions immunes et le psoriasis (Kinsella - 1988; Bajpai et Bajpai - 1993; Puglia *et al.* - 2005), ou dans l'inhibition de la genèse des carcinomes (Larsson *et al.* - 2004). Récemment, de nouvelles propriétés des acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$ ont été découvertes. C'est ainsi que ces acides gras ont démontré un rôle contre la schizophrénie (Mahadik *et al.* - 2001), le stress et la dépression (Bourre - 2005), dans le bon développement fœtal (Weisinger *et al.* - 2001). Le Tableau V indique quelques fonctions reconnues des acides gras dont les familles des $\omega 3$ et $\omega 6$. De nos jours, les acides gras $\omega 3$ et 6 offrent un important potentiel commercial et les produits de consommation courante à base de ces composés sont de plus en plus diversifiés (œufs, produits laitiers, huiles et margarines, plats cuisinés, crèmes cosmétiques ...).

Tableau V : Quelques fonctions et effets d'acides gras alimentaires. D'après Kinsella - 1988. *Some functions and effects of fatty acids*

Acide gras	Effet / Fonction
Chaîne moyenne	Source rapide d'énergie
Saturés	
Laurique (C12:0)	Hyperlipidémique Hypercholestérolémique Prothrombotique
Myristique (14:0)	
Palmitique (16:0)	
Stéarique (18:0)	Neutre Hypolipidémique Précurseur de l'acide oléique
Mono-insaturés	
Oléique (18:1 ω9)	Hypolipidémique Hypocholestérolémique Précurseur de l'acide eicosatriénoïque
Elaidique (18:1 trans)	cf. C18:0
Erucique (22:1 ω9)	Compromet l'oxydation des acides gras dans le cœur chez le rat
ω6 poly-insaturés	
Linoléique (18:2 ω6)	Acide gras essentiel Composé des acylglucocéramides Précurseur de l'acide arachidonique (AA) Hypolipidémique (comparé aux AG saturés) Hypotensif? Augmente la fluidité des membranes
γ Linoléique (18:3 ω6)	Précurseur de l'acide eicosatriénoïque et AA Modifie les taux d'eicosanoïdes
γ Homolinoléique (20:3 ω6)	Précurseur des séries PGE ₁ des eicosanoïdes
Arachidonique (20:4 ω6)	Fluidité de la membrane Précurseur des eicosanoïdes
ω3 poly-insaturés	
α Linoléique (18:3 ω3)	Hypolipidémique Fluidité de la membrane Précurseur des EPA et DHA Réduit la synthèse des eicosanoïdes
Eicosapentaénoïque (20:5 ω3)	Hypolipidémique Réduit la synthèse des eicosanoïdes Précurseur des PGI ₃ , TXA ₃ , TXB ₅
Docosaénoïque (22:6 ω3)	Hypolipidémique Essentiel pour la vision Réduit la synthèse de AA Réduit les eicosanoïdes dans certaines cellules (macrophages)

Généralement, ces acides gras interviennent en tant que précurseurs des eicosanoïdes, qui sont directement responsables des effets préventifs et thérapeutiques décrits ci-dessus. Sous le terme générique d'eicosanoïdes sont regroupés les prostaglandines (PG_{α}), les thromboxanes (TX) et les leukotriènes (LT) dont la biosynthèse est indiquée sur la Figure 16.

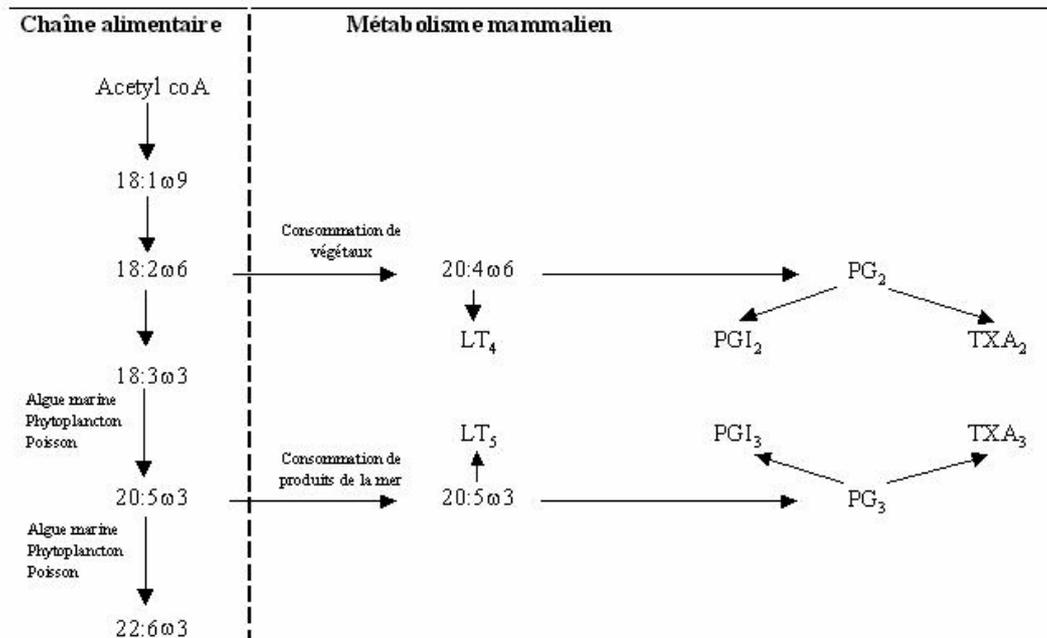


Figure 16 : Biosynthèse des eicosanoïdes d'après Yongmanitchai et Ward - 1989. *Eicosanoids biosynthesis*

Toutefois, les eicosanoïdes issus de l'AA et de l'EPA diffèrent structurellement et leurs effets physiologiques peuvent être antagonistes. Par exemple, la production du TXA_2 dérivant de l'AA est inhibé par l'EPA, qui lui active la production du TXA_3 (Yongmanitchai et Ward - 1989).

1.2.6.4.3. Où trouver ces acides gras dans les co-produits de poisson ?

Les acides gras et par extension les lipides, sont présents dans tous les organismes marins, de la bactérie au poisson en passant par les éponges, algues, coquillages et crustacés. Dans tous ces organismes, les acides gras des familles $\omega3$ et $\omega6$ sont largement représentés. Les poissons, qui sont souvent parmi les derniers maillons de la chaîne trophique, possèdent par voie de fait également de grandes proportions de ces acides gras. Les poissons peuvent de plus synthétiser certains acides gras et possèdent la machinerie enzymatique (désaturases, élongases) pour les transformer (Tableau IV). En plus des voies métaboliques, les conditions de vie des organismes influent sur leur composition en acides gras. Plus l'eau sera froide, plus

les acides gras seront insaturés (essentiellement en raison du fait que les acides gras insaturés ont une température de cristallisation plus basse, ce qui conduit à une meilleure fluidité de la membrane garantissant ainsi une meilleure adaptation au froid). En général, les poissons possèdent entre 25 à 40% d'acides gras poly-insaturés dont l'EPA (14 à 19% des acides gras totaux) et le DHA (5 à 8%) (Bergé et Barnathan - 2005).

Les principales sources industrielles d'acides gras ω_3 et ω_6 sont les huiles de poisson, c'est-à-dire du mélange de différents co-produits. Chez les poissons gras (sardine, maquereau, saumon, truite...) ou semi-gras (bar, flétan...), les lipides sont présents dans toutes les fractions avec une concentration plus importante dans les tissus sous-cutanés, péri-viscéraux ou dans le muscle blanc. Dans les poissons maigres (morue, églefin, lieu, raie), la majeure partie du poisson ne contient pas beaucoup de lipides. Ces poissons ont la particularité de concentrer leur lipides dans un organe de stockage : le foie. Pour ces espèces, le foie sera donc la principale source d'acides gras ω_3 et ω_6 . En effet, cet organe est composé de plus de 60% de lipides en moyenne par rapport à la matière fraîche alors que les viscères, les chutes de filetage ou les œufs sont composés de moins de 5% de lipides, ces valeurs connaissant des fluctuations en fonction de la saison, de l'espèce, de la zone de vie... (Dumay - 2003).

De ce fait, de nombreuses activités biologiques ont été recensées dans les huiles de poisson. Certaines études ont montré des propriétés anti-inflammatoires, dans l'huile de sardine (Puglia *et al.* - 2005) et de poisson en général (Kim *et al.* - 2006; Maroon et Bost - 2006). Sur les modèles murins, les huiles de poisson ont une action contre le développement de l'athérosclérose (Zampolli *et al.* - 2006), contre les ulcères ou dommages gastriques (Bhattacharya *et al.* - 2006), pour la régénération du foie après une ablation (Kirimlioglu *et al.* - 2006), contre la prolifération de cellules cancéreuses (Pizato *et al.* - 2006), ou pour l'amélioration de la mémoire (Chen *et al.* - 2006). Les huiles provenant d'anchois permettent aux rats qui en ont été nourris de voir baisser leur taux de cholestérol, de triglycérides, de graisse abdominale par rapport à une alimentation comprenant de l'huile de soja (Toyoshima *et al.* - 2004). La supplémentation en huile de poisson du régime de chèvres gestantes et allaitantes permet l'augmentation de la proportion d'acides gras à longue chaîne de la famille des ω_3 dans le colostrum et dans le lait (Cattaneo *et al.* - 2006). D'autres études montrent l'intérêt d'introduire dans les régimes de salmonidés des acides gras ω_3 et ω_6 (Geurden *et al.* - 2006; Tocher *et al.* - 2006).

1.2.6.5. Les phospholipides

Les phospholipides sont naturellement présents dans tous les organismes. En effet, les phospholipides sont un des constituants majeurs des membranes cellulaires (Figure 17). Les quantités les plus importantes de phospholipides dans les co-produits marins sont trouvées dans les têtes (Andrieux - 2004), mais également, en saison favorable, dans les œufs de poisson. La structure des principaux phospholipides est reportée en Annexe A.

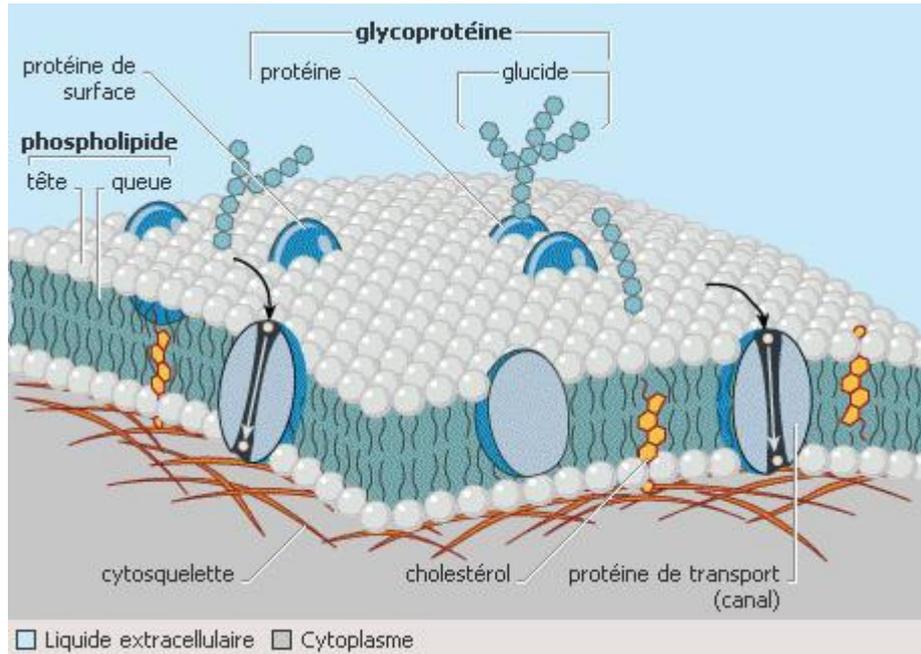


Figure 17 : Représentation schématique de la membrane plasmique (source encarta). Cellular membrane representation

Parfois cités en tant que lécithines, les phospholipides présentent de nombreuses fonctionnalités. Les phospholipides sont très utilisés dans les domaines de l'alimentation, de la nutraceutique, médical et cosmétique (Peng *et al.* - 2002).

Le rôle essentiel des phospholipides est leur pouvoir émulsifiant. Ainsi, les phospholipides entrent dans la composition des margarines, chocolats, pâtisseries, produits instantanés, produits laitiers, produits cosmétiques et pharmaceutiques. Dans ce type d'applications, les valeurs nutritionnelles des phospholipides ne sont pas importantes du fait de la faible proportion de ces composés dans la formulation des aliments (de 0,3 à 1%). La formation de liposomes par les phospholipides dans les systèmes aqueux permet de plus la solubilisation de composés lipophiles. Ces composés pourront ainsi entrer dans la composition de certains produits industriels. La disponibilité de certaines substances peut, de cette manière, être accrue (jusqu'à un facteur 13) (Schneider - 2001).

Les phospholipides jouent aussi un rôle en aquaculture. Des études menées conjointement entre l'Ifremer et l'INRA ont montré que les phospholipides sont des constituants essentiels des aliments pour larves de poissons. En effet, les phospholipides sont de très bons vecteurs pour apporter aux larves de poissons les acides gras essentiels à leur développement. De plus, une alimentation des larves de poissons enrichie en phospholipides induit une mortalité plus basse et une prise de poids plus importante. Des études ont également révélé la diminution de malformations spinales et des déformations de la mâchoire des poissons avec une alimentation riche en phospholipides (Cahu et Zambonino Infante - 2001; Cahu *et al.* - 2003).

Les activités biologiques des phospholipides ont également été recherchées. Parmi toutes les classes de lipides, les phospholipides se révèlent être les plus actifs. Certains phospholipides issus de bactéries possèdent une activité anti-bactérienne (Tamehiro *et al.* - 2002). Les phospholipides possèdent également des actions cytotoxiques et anti-prolifératives, leur donnant un rôle potentiel dans la lutte contre le cancer. En effet, les phospholipides jouent des rôles divers dans le métabolisme cellulaire, notamment du fait de leur participation dans la composition de la membrane cellulaire. Le récepteur de la phosphatidylcholine, par exemple, est un signal de reconnaissance de l'apoptose. Et l'apoptose donne lieu à une redistribution des lipides membranaires (Arnoult *et al.* - 2001). Des analogues de l'acide phosphatidique sont des régulateurs des facteurs de croissance. Ainsi, LPA (acide *lyso*-phosphatidique) et le plasmalogène glycérophosphate induisent la prolifération cellulaire, alors que LPA cyclique inhibe cette prolifération (Fischer *et al.* - 1998). Le champignon *Physarum polycephalum* synthétise des phospholipides capables d'inhiber l'action de l'ADN polymérase α des cellules eucaryotes (Murakami-Murofushi *et al.* - 1992; Murakami-Murofushi *et al.* - 1995). Les phospholipides peuvent également être synthétisés, dérivés ou conjugués pour donner naissance à des composés actifs : activité antivirale (Hostetler *et al.* - 1994a; Hostetler *et al.* - 1994b; Xie *et al.* - 1995; Kucera *et al.* - 1998; Cheng *et al.* - 2000) ou antitumorale (Unger et Eibl - 1991; Berkovic *et al.* - 1995; Wieder *et al.* - 1998; Boggs *et al.* - 1998; Wang *et al.* - 1998; Arthur et Bittman - 1998; Cabaner *et al.* - 1999; Thaler *et al.* - 2000; Gajate *et al.* - 2000) par exemple.

1.2.6.6. Autres molécules lipidiques d'intérêt

D'autres classes de lipides présentent un intérêt dans les domaines pharmaceutiques, nutraceutique, cosmétique, alimentaire...

Les glycosphingolipides, qui sont des lipides dérivés de la sphingosine possédant une molécule de sucre, ont montré par exemple des activités immunomodulatrices et antitumorales (Bergé et Barnathan - 2005).

Les stérols possèdent également des propriétés intéressantes. Le cholestérol, en formant des complexes avec certaines molécules, permet la détoxification de l'organisme par ces molécules. Le cholestérol possède également une action anti-hémolytique. En s'associant aux carbohydrates et aux protéines, il permet le transport de ces substances dans l'organisme sous forme de suspension colloïdale. Le cholestérol possède de plus la propriété de stabiliser les émulsions, lui conférant un intérêt en agroalimentaire, mais aussi des propriétés hydrophile et émoulliente, très recherchées pour la formulation pharmaceutique et cosmétique (pommades, laits, crèmes, lotions) (Bordier - 1995).

Le squalène, un hydrocarbure isoprénoïde qui doit son nom à sa forte présence dans l'huile de requin possède d'intéressantes propriétés, notamment en alimentation humaine où il est commercialisé sous forme de capsules. Son rôle majeur est son pouvoir oxygénant, mais il est aussi utilisé en tant que détoxifiant contre les xénobiotiques. Son fort taux d'insaturation, lui confère un pouvoir antioxydant et protège la peau face à l'exposition aux UV et autres sources de radiation (Kelly - 1999). Le squalène possède également des qualités lubrifiantes ;

Les éthers de glycérol ont eux aussi montré de nombreuses activités biologiques, comme des activités anti-inflammatoires découvertes en 1968 (Burford et Gowdey - 1968), une action contre des maladies allergiques ou en cancérologie, en protégeant l'organisme des effets secondaires liés aux rayons X et en réduisant la croissance de la tumeur (Brohult *et al.* - 1986).

Enfin, les vitamines, appartenant aux lipides, possèdent de nombreuses propriétés (stimulants, anti-oxydants, colorants...). Citons l'astaxanthine ou vitamine A, présente dans les crustacés, dont l'intérêt en tant que colorant alimentaire est démontré, notamment dans le cadre de l'industrie du saumon. La vitamine A est aussi utilisée en nutraceutique en tant qu'agent antioxydant.

1.2.6.7. Valorisation aromatique

Les hydrolysats enzymatiques peuvent également conduire à la production de composés aromatiques. Ces produits dérivés sont destinés à être incorporés dans la formulation de plats cuisinés, soupes, fumets et sauces ou à être utilisés pour l'aromatisation du surimi. Un tri

rigoureux par espèce doit être fait, hormis pour les poissons blancs et seules les viscères sont exclues. Cette valorisation demeure encore marginale en France où seules 2 100 t de co-produits sont destinées à la réalisation de composés aromatiques (Andrieux - 2004). Les arômes peuvent également être obtenus à partir des effluents issus de l'industrie alimentaire comme par exemple les jus de cuisson de moules ou de crevettes (Cros - 2004). Les arômes les plus porteurs sur la marché sont les appellations crabe, crevette, langoustine, homard, poisson blanc. Les autres marchés sont encore restreints pour les autres espèces : anchois, saumon, thon, coquille Saint-Jacques.

1.2.6.8. Autres exemples de produits dérivés à haute valeur ajoutée

D'autres produits dérivés peuvent être obtenus à partir des co-produits d'origine marine. D'après le rapport de la filière co-produits de la pêche et de l'aquaculture Française (Andrieux - 2004), citons brièvement :

- la chondroïtine sulfate, protéine impliquée dans la tonicité des tissus de soutien et dans le mécanisme de constitution de la structure cartilagineuse et de la croissance osseuse. Cette protéine est extraite des cartilages des raies et requins ;
- les compléments en minéraux, extraits des arêtes et des écailles qui permettent de compléter l'alimentation (humaine et animale) en calcium, phosphore et magnésium ;
- l'élastine, structure ligamenteuse associée au collagène qui confère une tonicité optimale aux tissus de soutien et stimule la croissance cellulaire. L'élastine est obtenue à partir des nageoires et des ligaments de thon ;
- les dérivés d'acides nucléiques dont le plus connu est la protamine sulfate, issus des laitances de poisson (saumon, hareng, truite, maquereau...). Ce produit possède de nombreuses activités : hydratante, anti-oxydante, protection contre les rayonnements solaires, inhibition des collagénases et élastases, stimulation de la régénération cellulaire... ;
- la kératine, obtenue à partir des écailles de poisson, est utilisée pour les soins capillaires et les ongles en tant qu'agent filmogène, tenseur et hydratant ;
- le cuir, provenant des peaux de poisson. Quelques entreprises de tannerie de poisson ont vu le jour et les cuirs en résultant sont destinés à la confection d'objets de maroquinerie. Toutes les peaux de poisson peuvent être tannées,

la taille de ces peaux étant le seul critère restrictif (taille minimum de 60 x 13 cm).

2. LA VALORISATION DES CO-PRODUITS DE POISSON PAR TECHNIQUES DOUCES

2.1. L'hydrolyse enzymatique par les protéases

2.1.1. Les enzymes : définition et classification

Une enzyme est une protéine permettant de catalyser une réaction chimique. Comme tout catalyseur, elle n'intervient pas dans le processus réactionnel et est retrouvée intacte à la fin de la réaction. Une enzyme est spécifique d'une réaction, c'est-à-dire qu'elle catalyse toujours la même transformation sur les mêmes corps chimiques. A ce titre, les enzymes sont classées en fonction de ces spécificités selon la nomenclature donnée par l'union internationale de biochimie et biologie moléculaire (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB). Les 4 nombres de la nomenclature EC (Enzyme Classification) des enzymes désignent chacun une caractéristique de l'enzyme qui permet son identification :

- le premier nombre de la nomenclature EC indique le type de la réaction catalysée,
- le second indique le substrat général impliqué lors de la réaction,
- le troisième indique le substrat spécifique impliqué,
- le quatrième indique le numéro de série de l'enzyme.

Les principales classes d'enzymes sont :

- les oxydoréductases (EC 1),
- les transférases (EC 2),
- les hydrolases (EC 3),
- les lyases (EC 4),
- les isomérases (EC 5),
- les ligases (EC 6).

Dans notre étude, toutes les enzymes sont des hydrolases (EC 3) et elles appartiennent plus spécifiquement au groupe des protéases (EC 3.4) en s'attaquant aux liaisons peptidiques. Le Tableau VI indique les différentes spécificités des protéases.

Tableau VI : Classification des protéases. *Proteases classification*

Numéro	Substrat spécifique
3.4.11	Aminopeptidases
3.4.13	dipeptidases
3.4.14	dipeptidyl- et tripeptidyl-peptidases
3.4.15	peptidyl-dipeptidases
3.4.16	sérine carboxypeptidases
3.4.17	metallo carboxypeptidases
3.4.18	cystéine carboxypeptidases
3.4.19	oméga peptidases
3.4.21	sérine endopeptidases
3.4.22	cystéine endopeptidases
3.4.23	aspartique endopeptidases
3.4.24	metallo endopeptidases
3.4.25	thréonine endopeptidases
3.4.99	endopeptidases au mécanisme inconnu

2.1.2. Principe de l'hydrolyse enzymatique

Lors d'une hydrolyse enzymatique, les protéases vont cliver les liaisons peptidiques entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire d'une protéine, générant ainsi au moins deux peptides. L'hydrolyse des liaisons peptidiques va donc générer la libération des protons H^+ (Figure 18). Cette libération de protons H^+ va induire une acidification du milieu. Ce principe est valable pour les hydrolyses se déroulant à pH supérieur à 6,5, pour que le degré de dissociation des ions $R-N^+H_3$ soit suffisant (Ravallec-Plé - 2000). Lorsque le pH est inférieur, la réaction s'inverse et ce seront des ions HO^- qui seront libérés.

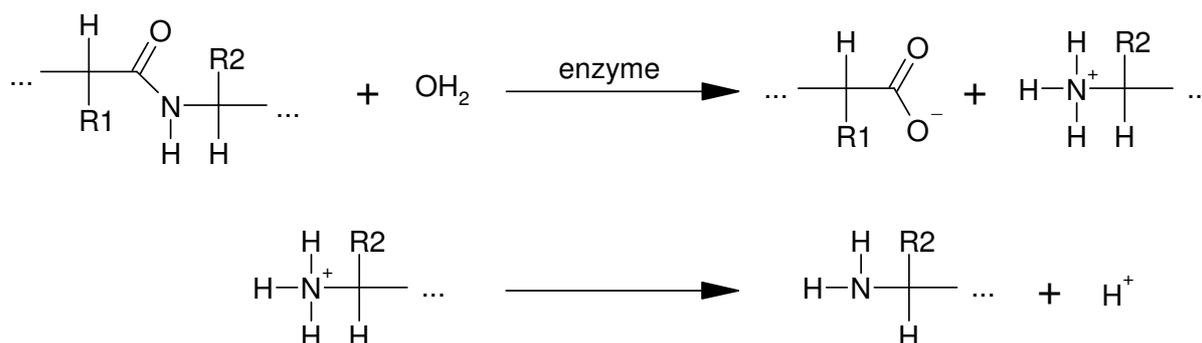


Figure 18 : Schéma réactionnel de la libération de protons H^+ lors de l'hydrolyse enzymatique. *Proton liberation during enzymatic hydrolysis*

2.1.3. Pourquoi suivre l'évolution de l'hydrolyse ?

Le suivi de l'hydrolyse est une préoccupation majeure lors de la mise en place de procédés enzymatiques. En effet, l'activité des enzymes ne s'arrête que lorsque le substrat est

totale­ment hydroly­sé, ou que les condi­tions du milieu ne sont plus adé­quates pour l'enzyme. Il est donc impor­tant de suivre l'hydrolyse en fonc­tion des produits dési­rés, l'hydrolyse totale ne condui­sant pas, dans la majeure partie des cas, aux produits les plus inté­ressants. De nombreux proto­coles ont été mis en place pour le suivi de cette hydrolyse. Un des procé­dés les plus simples est de mesurer les modi­fications de pH induites par l'hydrolyse. Cette mesure peut être effectuée direc­tement à l'aide d'un pHmètre plongé dans le milieu réactionnel, mais pas ce biais, l'hydrolyse ne peut être poussée très loin, l'activité de l'enzyme étant très sensible aux varia­tions de pH (voir ci-dessous). La mesure peut égale­ment être lue de manière indirecte. Pour permettre une action plus longue de l'enzyme, le milieu peut être neutralisé par ajout de soude (lors de libération de H⁺) ou d'acide (libération HO⁻). Le volume versé est direc­tement proportionnel à la quantité de liaisons peptidiques coupées. Cette méthode est la méthode dite du pHstat (en référence à l'appareil utilisé) (Adler-Nissen - 1986). Les méthodes les plus courantes pour estimer l'évolution de l'hydrolyse sont les méthodes basées sur le dosage des groupements terminaux (α-NH₂ ou α-COOH) qui se retrouvent libérés tout au long de l'hydrolyse. Ces groupements terminaux peuvent être titrés à l'aide de formol (Taylor - 1957) mais, dans la plupart des cas, ce sont des dosages colorimétriques qui sont utilisés, comme les dosages au dinitrofluoro benzène (DNFB) (Bhaskar *et al.* - 2002), à l'acide trinitro benzène sulfonide (TNBS) (Adler-Nissen - 1979), à l'o-phthaldialdéhyde (OPA) (Nielsen *et al.* - 2001) et à la ninhydrine (Panasiuk *et al.* - 1998). Ces dosages mettent en jeu des molécules qui vont se complexer avec des groupements α-aminés libres et former une coloration quantifiable (à l'aide de l'étalonnage d'une solution standard). L'évolution de l'hydrolyse est alors quantifiée sous le terme de degré d'hydrolyse (DH) et peut être représentée par l'Équation 1.

$$\%DH = \frac{\text{nombre de liaisons peptidiques coupées}}{\text{nombre de liaisons peptidiques totales}} \cdot 100 \quad \text{Équation 1}$$

Une fois mises en place, ces méthodes d'évaluation du degré d'hydrolyse vont permettre le suivi de l'hydrolyse et la comparaison de plusieurs hydrolyses (avec différents substrats, différentes enzymes, différentes conditions d'hydrolyse).

2.1.4. Les paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique

Différents facteurs peuvent affecter l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des protéines : la température, le pH, la concentration du substrat et de l'enzyme, la force ionique, la présence ou l'absence de substances inhibitrices/activatrices, la quantité d'eau ajoutée.

Nous traiterons ici uniquement les principaux facteurs, à savoir la température, le pH, la concentration en enzyme et, brièvement, l'effet des substances inhibitrices ou activatrices.

2.1.4.1. Influence de la température sur la réaction enzymatique

L'étude de la vitesse initiale en fonction de la température fait apparaître deux phases bien distinctes (Figure 19). La température accélère d'une part les vitesses des réactions en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière d'énergie d'activation, mais au-delà d'une certaine température, une modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme se produit entraînant progressivement sa dénaturation et sa désactivation. La résultante de ces deux effets se traduit par une courbe généralement dissymétrique passant par une valeur maximale pour une température optimale. Certaines enzymes, avec une masse faible et une structure simple ou stabilisée (à l'aide de ponts disulfures par exemple), se révèlent particulièrement stables à la chaleur. Une mutation peut conférer à une enzyme une thermosensibilité différente de celle de l'enzyme native, très utile pour conférer une meilleure stabilité à des enzymes utilisées à haute température.

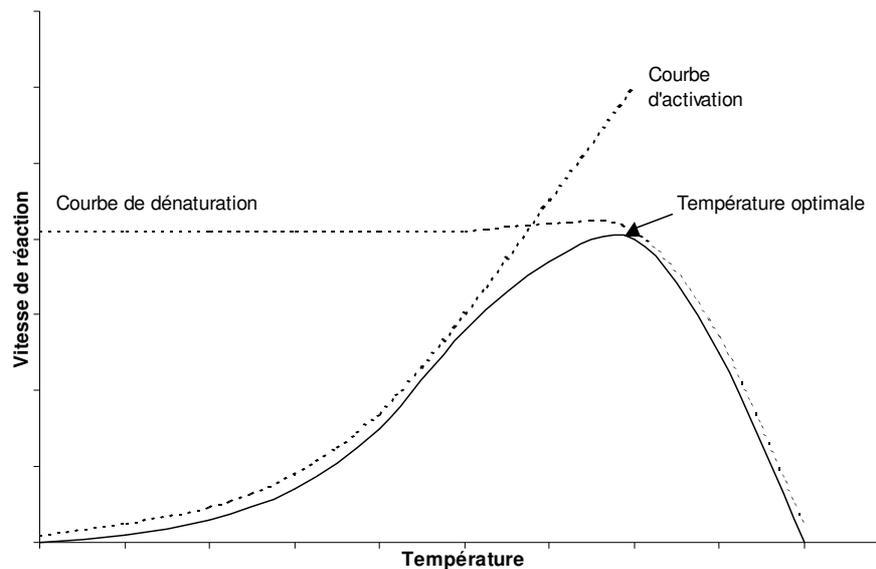


Figure 19 : Influence de la température sur la réaction enzymatique (Cuvellier - 1999). *Effect of temperature on enzymatic reaction*

Quoi qu'il en soit, la température est spécifique pour chaque enzyme (souvent indiquée par le fournisseur) et il est important de travailler dans la plage de température indiquée (quelques exemples sont donnés dans le Tableau I). En biotechnologie, l'inactivation de l'enzyme est très souvent réalisée par traitement thermique, souvent moins dénaturant pour la récupération des produits obtenus qu'une variation de pH (induisant l'ajout de sels).

2.1.4.2. Influence du pH sur l'action des enzymes

La variation du pH peut avoir des conséquences sur l'enzyme en provoquant des modifications de l'état d'ionisation de certains acides aminés situés sur le site actif ou sur la zone permettant le maintien de la conformation tridimensionnelle native de la protéine. Le substrat peut aussi subir une modification de son degré d'ionisation, pouvant permettre ou empêcher la formation du complexe enzyme / substrat. Le pH optimum sera défini en fonction de la transformation enzymatique d'un substrat dans un milieu de composition donnée. Comme le montre la Figure 20, la vitesse d'une réaction décroît généralement rapidement lorsque l'on s'éloigne du pH optimum jusqu'à devenir négligeable (à ± 2 unités de pH). Ce pH optimum varie beaucoup selon les enzymes. Les exemples de protéases indiquées dans le Tableau I ont des pH optimaux variant de 2 (pepsine) à 10 (alcalase).

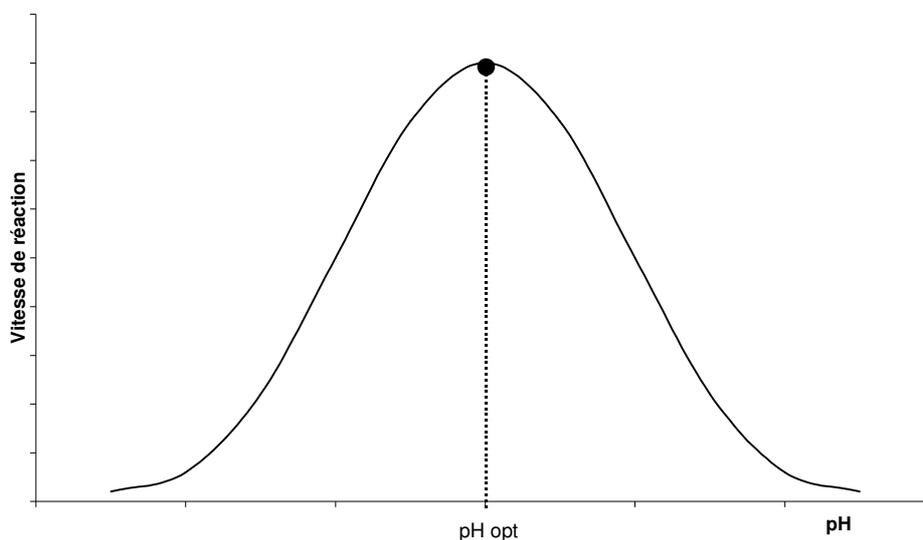


Figure 20 : Variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction du pH (Cuvellier - 1999). *Rate variation of enzymatic reaction according to pH*

2.1.4.3. Comment influe la concentration en enzyme sur la réaction enzymatique ?

Pour une concentration donnée de substrat, l'étude des variations de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en enzyme (Figure 21) montre que cette variation n'est pas linéaire. La courbe présente une allure hyperbolique correspondant au fait qu'au-delà d'une certaine concentration en enzyme, la totalité du substrat se trouve complexé. Il est donc préférable de se placer dans la partie linéaire de la courbe, avec une faible concentration en enzyme, pour des raisons d'efficacité maximale et de réduction de coût.

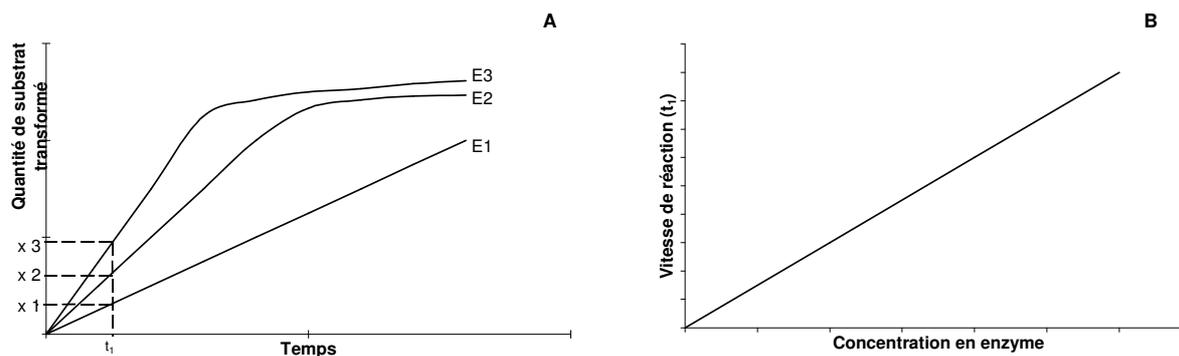


Figure 21 : Effet de la concentration en enzyme sur la quantité de substrat formé au cours du temps (A) et sur la vitesse de réaction (B) (Cuvellier - 1999). Enzyme concentration effect on transformed substrate and on reaction rate

2.1.4.4. Quels sont les principaux modes d'activation et d'inhibition des enzymes ?

La vitesse d'une réaction et l'activité de l'enzyme peuvent être modifiées par la présence de composés autres que le substrat ; ce sont des effecteurs qui jouent un rôle important dans les phénomènes de régulation. Ces effecteurs peuvent avoir un effet inhibiteur ou activateur.

Les inhibiteurs peuvent être compétitifs, c'est-à-dire qu'ils possèdent une analogie de structure avec le substrat et qui peuvent aller se loger sur le site actif de l'enzyme à la place du substrat. A l'inverse, certains inhibiteurs peuvent être non compétitifs. Ces composés ne vont pas se fixer sur le site actif spécifique du substrat mais sur un autre site de l'enzyme, modifiant ainsi sa structure tridimensionnelle et son activité. Cette deuxième sorte d'inhibition est tout de même assez rare. Les co-produits marins, comme toute matrice vivante, possèdent un grand nombre de ces substances (Gildberg - 1993).

2.1.5. Les différents réacteurs enzymatiques

La réaction enzymatique est conduite dans un réacteur. Cela implique des dispositifs qui peuvent être très simples ou complexes en faisant intervenir des appareils annexes (aération, stérilisation...). Le réacteur est ainsi conçu en fonction du type de processus qui doit s'y dérouler. La réaction enzymatique peut ainsi être produite en discontinu (batch), en alimentation continue (fed batch) ou totalement en continu (alimentation et soutirage). Après avoir établi quels étaient les différents modes de conduite et les différentes formes de réacteurs, nous verrons également que l'agitation au sein du réacteur a une grande importance sur la réaction.

2.1.5.1. Modes de conduite des réacteurs

2.1.5.1.1. Réacteurs en « batch »

La réaction est conduite de façon discontinue. Ce mode de réaction est préconisé dans le cas de faibles volumes. Après avoir placé la matrice à hydrolyser, l'eau si nécessaire, et après avoir atteint les valeurs de consigne des différents paramètres (température, pH), le système est clos durant le temps de réaction. Une pointe d'addition peut être ajoutée au système en cas de régulation de pH, mais aucun substrat ou enzyme n'est ajouté au système. Le volume réactionnel est le même et l'agitation peut être conduite de façon homogène tout le temps de la réaction. De plus, l'hydrolyse enzymatique entraîne souvent une liquéfaction des produits hydrolysés, rendant plus facile l'agitation.

2.1.5.1.2. Réacteurs en « fed batch »

La réaction dans ce cas est conduite différemment. La réaction commence avec un petit volume de substrat. La quantité d'enzyme présente est alors en plus forte concentration que lors d'un système en batch et la réaction démarre plus vite. La matrice à hydrolyser est ensuite introduite en continu dans le réacteur. Le volume total est en augmentation constante. Cette technique, beaucoup utilisée dans le cas de fermentation microbienne, est peu répandue dans le cas d'hydrolyses enzymatiques, où l'on préfère en général, les hydrolyses en batch ou en continu.

2.1.5.1.3. Réacteurs continus et combinaison bioréacteur enzymatique / UF

Dans ce type de réacteur, la cuve est alimentée et soutirée en continu. Pour réaliser ce type d'hydrolyse, l'enceinte de la cuve est différente des deux autres précédemment citées puisque une évacuation sélective est réalisée de façon à ce que uniquement le produit sorte de l'enceinte.

Dans le cas d'hydrolyses enzymatiques à l'aide de protéases, les produits générés sont des peptides. Pour ne récupérer que ces peptides, le réacteur pourra par exemple être combiné avec un système d'ultrafiltration (UF) au seuil de coupure connu. Un tel système permettrait ainsi de contrôler la taille des peptides générés. Cependant, il faut veiller à ce que les enzymes ne passent pas au travers de la membrane. Les enzymes pourront alors être fixées sur un support inerte. Un des problèmes majeur de ce type de procédé est l'encrassement des membranes par les différentes substances colmatantes résultant de l'hydrolyse. En effet, ce

type de système nécessite un milieu réactionnel peu colmatant, sinon la mise en place de systèmes de pré-filtration (tamis, filtre...). Les bioréacteurs à membranes peuvent être séparés en deux catégories : les bioréacteurs où l'enzyme et le substrat sont directement mis en contact et les bioréacteurs où la réaction enzymatique nécessite la diffusion du substrat à travers la membrane (Figure 22) (Bouhallab - 1998).

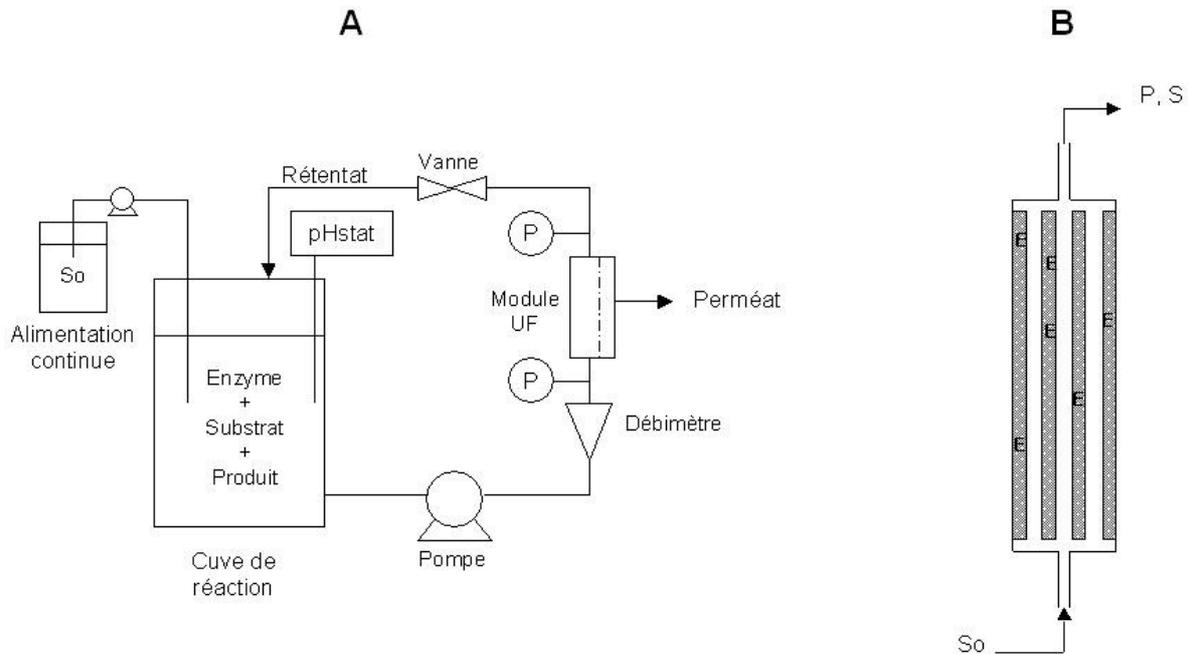


Figure 22 : Différentes catégories de bioréacteurs à membranes. A : contact direct ; B : diffusion. Different membrane bioreactor. A: direct contact; B: diffusion

Les bioréacteurs à membrane sont appliqués à la transformation de divers composés alimentaires en vue de développer des procédés continus à haute productivité. Leur application concerne aussi bien les bioconversions des macromolécules (protéines, polysaccharides) que des molécules de faible masse moléculaire (acides aminés, oligosaccharides). Le Tableau VII recense les principales applications des bioréacteurs à membranes dans le traitement des protéines.

Tableau VII : Principales application des bioréacteurs à membranes pour la bioconversion des macromolécules d'après Bouhallab (1998). Main membrane bioreactor applications for macromolecules conversion

Substrat / Enzyme	Membrane	Référence
Protéines de poisson / Protéase	Fibre creuse	Cheftel <i>et al.</i> - 1971
Soja / Protéase acide fongique	Spirale	Iacobucci <i>et al.</i> - 1974
Protéines lactosérum / Pancréatine	Fibre creuse	Maubois <i>et al.</i> - 1979
Soja / Pronase	Fibre creuse	Deeslie et Cheyran - 1991
Protéines de plasma / Alcalase	Fibre creuse	Bressolier <i>et al.</i> - 1988
Caséines / Alcalase	Fibre creuse	Mannheim et Cheyran - 1990
Protéines de poisson / Protéase thermorésistante	Fibre creuse	Nakajima <i>et al.</i> - 1992
Caséine β / Plasmine	Fibre creuse	Visser <i>et al.</i> - 1989
Caséinomacropéptide / Trypsine	Céramique	Bouhallab <i>et al.</i> - 1992
Caséine β / Chymosine	Céramique	Bouhallab <i>et al.</i> - 1993
Hémoglobine / Pepsine	Céramique	Dhulster <i>et al.</i> - 1994

Fibres creuses : polysulfone, spirale : cellulose régénérée, Céramique : carbone-zircone

2.1.5.2. Les différents types de réacteurs

Les réacteurs peuvent être plus ou moins élaborés dans leur conception et disposer de plus ou moins de matériel annexe. La plupart des réacteurs sont cylindriques ou parallélépipédiques mais ils peuvent aussi être cylindroconiques pour permettre de travailler sur des petits volumes en conférant une meilleure récupération. La température est réglée soit par le biais d'une double enveloppe à circulation continue, soit par l'ajout d'un thermoplongeur directement dans le système. Les réacteurs disposent généralement de plusieurs entrées pour permettre d'ajouter des accessoires ou pour pouvoir intervenir sur le milieu réactionnel. Par ces entrées peuvent ainsi être introduits dans le système des capteurs de mesure physique (sonde de température, électrode de pH, sonde de pression...), des sondes de distribution (liquide, gaz...), etc. Les réacteurs enzymatiques sont utilisés de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle. Leur capacité peut ainsi varier de quelques millilitres à des centaines de mètres cubes.

2.1.5.3. L'agitation dans les réacteurs enzymatiques

L'agitation est l'opération qui crée ou accélère le contact entre les différentes phases contenues dans le réacteur. En hydrolyse enzymatique, deux phases sont principalement rencontrées :

- ➔ la matrice à hydrolyser (phase solide ou liquide),
- ➔ l'enzyme (phase solide ou liquide).

L'agitation doit également permettre, le cas échéant, une meilleure homogénéisation du milieu en vue d'une meilleure régulation des paramètres physico-chimiques, tels que la régulation de la température ou du pH à l'intérieur du système.

L'agitation peut être réalisée par agitation d'une pièce mobile (agitateur) ou par le biais d'une pompe. Le mobile d'agitation permet la formation d'émulsions en divisant les bulles d'air introduites dans le réacteur et en les faisant circuler dans la phase liquide.

La plupart des agitateurs utilisés pour les réacteurs enzymatiques sont des agitateurs rotatifs. L'agitation est provoquée par une pièce entraînée dans un mouvement de rotation, par un arbre lui-même relié à une source d'énergie mécanique. L'agitation a pour fonction de mettre en mouvement un fluide constitué de plusieurs phases placé dans un récipient. Ce système est appelé hydro-machine.

La géométrie du réacteur joue un rôle sur l'efficacité de l'agitation comme le montre la relation :

$$\frac{Q}{H} = k \left(\frac{d}{D} \right)^n \quad \text{Équation 2}$$

où Q est le débit du mobile d'agitation, H la hauteur manométrique, d le diamètre de l'agitateur et D celui de la cuve. k et n dépendent des caractéristiques hydrauliques du système à agiter. Ainsi, plus le diamètre de l'agitateur sera proche de celui de la cuve, plus le débit sera important. Par contre, pour obtenir un effet de cisaillement important (une hauteur manométrique importante), le diamètre de l'agitateur doit être petit devant celui de la cuve.

La géométrie du mobile d'agitation (Figure 23) possède aussi une grande importance. Pour les fluides peu visqueux, les turbines à pales droites et étroites (turbine Rushton) sont bien adaptées. Lorsque la viscosité est plus importante, il est préférable d'utiliser d'autres agitateurs à débit radial comme le paddle (larges pales rectangulaires) ou les agitateurs à ancre. Les agitateurs à débit axial sont intéressants du fait de la circulation du fluide qu'ils provoquent. Les hélices à grandes pales minces sont particulièrement indiquées dans le cas de solutions visqueuses. Les agitateurs à ruban hélicoïdal sont également préconisés dans le cas de solutions visqueuses.

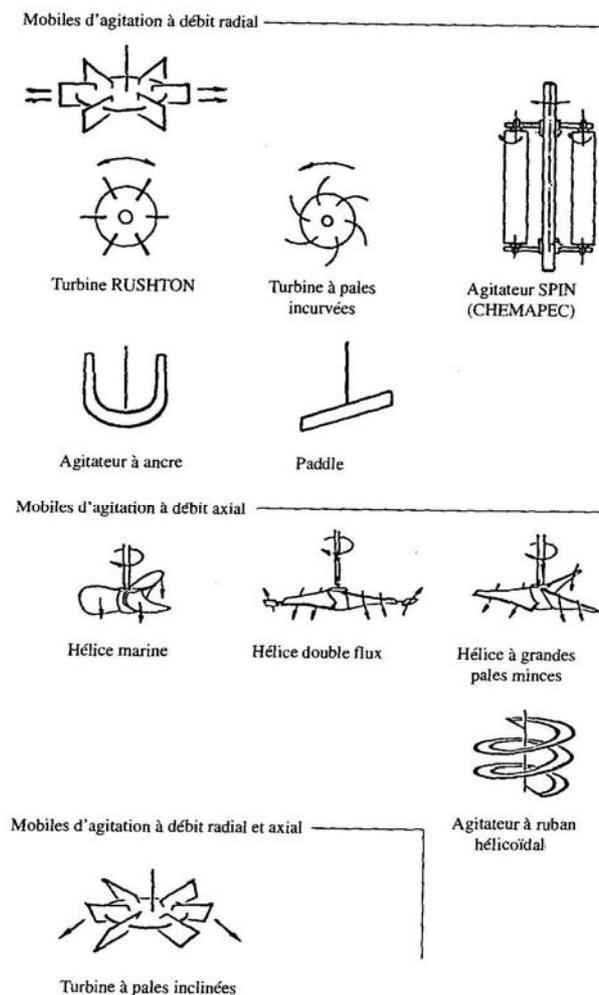


Figure 23 : Différents mobiles d'agitation (Leveau et Bouix - 1999). *Examples of agitation mobiles*

2.2. La filtration membranaire

2.2.1. Définition et principaux modes de filtration

Les procédés de séparation par membrane sont utilisés pour séparer soit des ions ou des molécules en solution soit des particules ou des micro-organismes en suspension. Ces techniques séparatives sont généralement employées pour concentrer un soluté contenu dans un solvant en vue de sa valorisation (concentration des protéines du lait par exemple) ou de son élimination (traitement des effluents). Une autre application de ces procédés concerne la clarification des solutions (jus de fruits, vin, vinaigre, bains d'usinage chimique...).

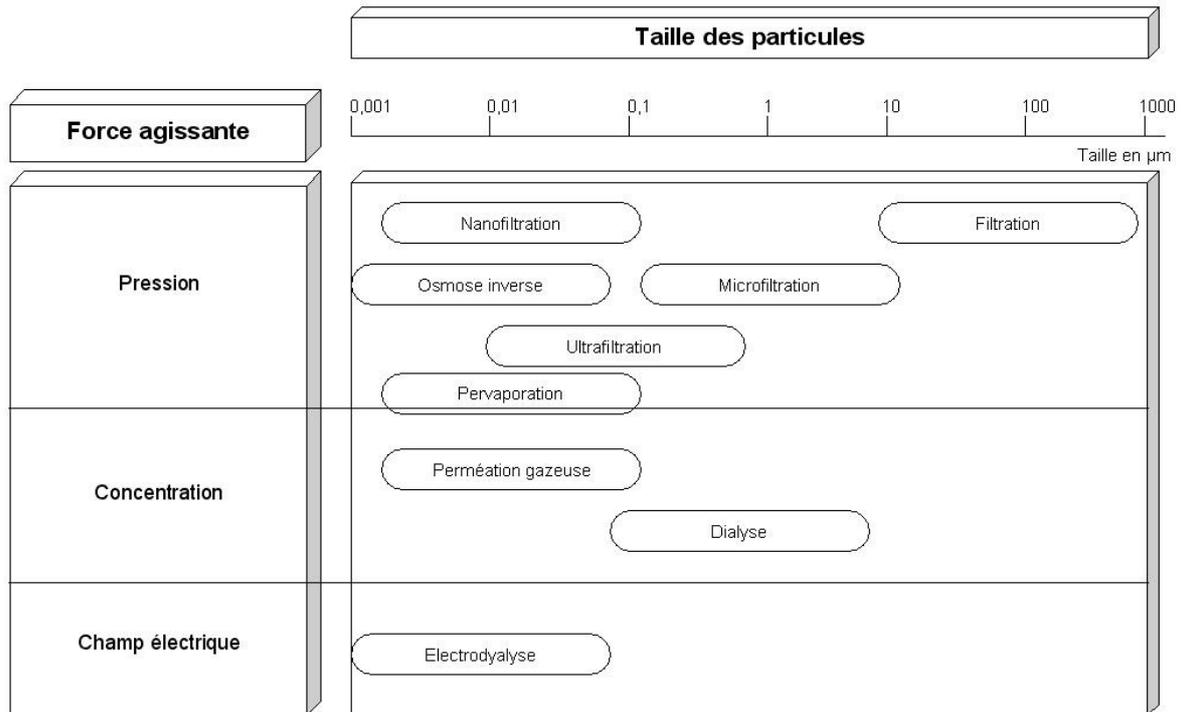


Figure 24 : Classement des procédés de séparation par membrane (Jaouen - 1989). *Membrane processes classification*

Une membrane est une barrière qui permet, sous l'action d'une force motrice, d'effectuer une séparation à l'échelle microscopique. La force motrice peut être une différence de pression, une différence de potentiel électrique ou une différence de concentration, de part et d'autre de la membrane. La Figure 24 classifie les différents modes de filtration possible en fonction de cette force agissante et de la taille des particules ou solutés contenus dans la charge à traiter.

La filtration permet la séparation de grosses molécules (pollens, grosses bactéries) allant de 10 à 100 μm .

La microfiltration (MF) permet de traiter des fluides contenant des matières en suspension dont la taille peut varier de 0,1 à 10 μm (levures, bactéries colloïdes). Les pressions exercées pour ce type de filtration peuvent varier de 0,1 à 5 bars. Les applications principales de la microfiltration concernent la clarification et la stérilisation des eaux et des liquides alimentaires et biologiques.

L'ultrafiltration (UF) est une technique qui permet de concentrer des solutions macromoléculaires ou des émulsions en ne laissant passer à travers la membrane que le

solvant et les solutés de faible masse molaire (colloïdes, virus, macromolécules organiques, composés organiques). Le diamètre des pores d'une membrane d'ultrafiltration est de 0,1 à 0,01 μm . Les pressions appliquées dans ce type de filtration sont comprises entre 1 et 10 bars. Les principales applications industrielles sont la concentration des protéines de lactosérum et la concentration du lait en agroalimentaire, la séparation d'émulsion eau-huile...

La nanofiltration (NF) permet la séparation de composants dont la taille est de l'ordre du nanomètre (composés organiques, macromolécules organiques, sels dissous). Les pressions appliquées sont comprises entre 5 et 30 bars. La nanofiltration permet la déminéralisation sélective des eaux et la concentration de composés organiques de faible masse molaire (antibiotiques et pesticides par exemple).

L'osmose inverse (OI) est un système de purification de l'eau contenant des matières en solution par un système de filtration très fin qui ne laisse passer que les molécules d'eau. Les pressions utilisées sont généralement situées entre 20 et 80 bars. Le diamètre des pores d'une membrane d'osmose inverse est inférieure à 0,001 μm . Le principe de l'OI est d'appliquer sur le compartiment contenant les sels dissous une pression supérieure à la pression osmotique de façon à inverser le flux d'eau pure. Les applications industrielles de l'osmose inverse concernent essentiellement le traitement des eaux (dessalement de l'eau de mer, potabilisation d'eaux souterraines, préparation d'eau « ultra-pure » pour l'électronique et les industries pharmaceutiques...).

La pervaporation permet le fractionnement des mélanges liquides en les vaporisant partiellement à travers une membrane dense placée à leur surface. Le transport de matière est assuré en maintenant la face aval de la membrane sous vide partiel ou en la balayant par un courant gazeux. Ce procédé fait successivement intervenir un partage au niveau de l'interface amont, une diffusion transmembranaire et une désorption coté aval. La composition du perméat peut, en fonction du matériau permselectif utilisé, être très différente de celle de la vapeur mixte obtenue après un simple équilibre liquide-vapeur. Cette technique permet ainsi de séparer des azéotropes (utilisée dans la préparation d'éthanol absolu par exemple) et entre en compétition directe avec la distillation extractive et la distillation par entraînement.

La perméation gazeuse est un procédé dans lequel les composés à séparer sont des gaz. Dans ce procédé, la séparation des composés d'un mélange gazeux est basée sur les différences de capacité des différents gaz à se solubiliser et surtout à diffuser à travers la

membrane en polymère de structure dense non poreuse, sous l'effet d'une différence de pression partielle entre les deux faces de la membrane. Les applications de cette technique de filtration sont par exemple la récupération d'hydrogène dans des gaz de purge d'usine d'ammoniac, la préparation d'air enrichi en oxygène, la déshydratation d'hydrocarbures gazeux.

La dialyse consiste à extraire à travers une membrane imperméable aux macromolécules les impuretés de faible masse molaire contaminant une solution. D'un côté de la membrane, la solution à purifier est mise en circulation et de l'autre côté, un solvant est renouvelé en continu. Les impuretés diffusent sous l'action de la différence de concentration et peuvent ainsi être éliminées en totalité. L'application essentielle de la dialyse est l'hémodialyse qui permet d'épurer le sang des personnes souffrant d'insuffisance rénale.

L'électrodialyse fait appel au champ électrique et à deux types de membranes échangeuses d'ions : des membranes anioniques (perméable aux anions) et des membranes cationiques (perméables aux cations). Ces deux types de membranes sont alternés dans la cellule d'électrodialyse qui peut comporter plusieurs dizaines de compartiments parallèles. Lorsqu'une solution saline comportant des cations (chargés positivement) et des anions (négatifs) circule dans un tel système, les ions vont entrer en mouvement sous l'effet du champ électrique appliqué perpendiculairement aux membranes. Ce mouvement va ainsi provoquer une concentration dans un compartiment sur deux et une déminéralisation dans les compartiments adjacents. L'utilisation principale de l'électrodialyse est le dessalement d'eaux saumâtres (et parallèlement leur concentration en vue de l'obtention de sel de table). L'électrodialyse peut également être applicable en agroalimentaire pour la déminéralisation de jus divers.

2.2.2. L'ultrafiltration (UF)

La présente étude s'intéresse exclusivement à la séparation de composés par UF.

Comme évoqué précédemment, l'UF est un procédé ayant pour force motrice une différence de pression permettant de concentrer ou de séparer sels, macromolécules, colloïdes, microorganismes et particules contenus dans un solvant à température ambiante sans changement de phase, ni ajout d'agents chimiques. La membrane semi-perméable sépare la suspension en un rétentat (ou concentrât) contenant les espèces retenues et un perméat (ou filtrat) qui traverse la membrane. Le gradient de pression peut être appliqué de façon frontale

ou tangentielle (Figure 25). En filtration frontale, les solutés retenus par la membrane ont tendance à s'accumuler sur la surface de la membrane, rendant la filtration moins efficace au cours du temps et nécessitant un procédé discontinu. Ce mode de filtration possède donc une entrée (alimentation confondue avec le rétentat) et une sortie (perméat). La filtration tangentielle permet un balayage permanent de la membrane, et donc une utilisation plus longue avant nettoyage. En filtration tangentielle, il y a une entrée (alimentation) et deux sorties : le rétentat et le perméat.

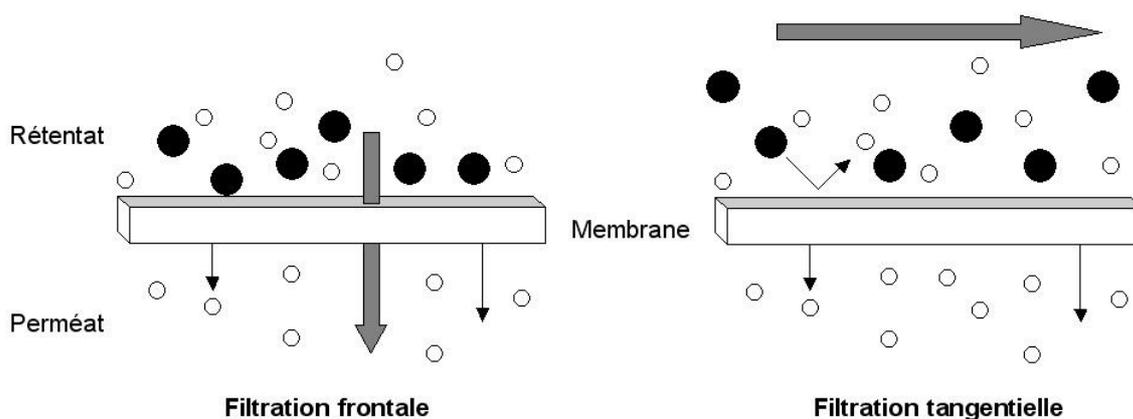


Figure 25 : Mécanismes de transfert sélectif au passage d'une membrane sous l'effet de la pression. Exemple des filtrations frontale et tangentielle. *Selective transfer mechanisms under pressure in frontal and tangential filtration*

En UF, la sélectivité d'une membrane est définie par son seuil de coupure, c'est-à-dire par la masse de la plus petite molécule, ou ion, arrêté par la membrane. Les diamètres de pores des membranes utilisées en UF sont généralement compris entre 0,5 et 150 nm, les seuils de coupures, exprimés en Daltons (Da) varient quant à eux de 1 à 300 kDa (100 nm correspondent à 200 kDa).

Le pouvoir de séparation d'une membrane dépend, en plus de la taille et de la structure des pores, de la nature du matériau. En effet, en fonction du matériau choisi, des interactions avec les composants du soluté peuvent se produire (effets électrostatiques et/ou hydrophobes). Chaque type de membrane peut adopter des configurations différentes et être composé de matériaux différents.

En plus de sa perméabilité, une membrane est caractérisée par son pouvoir de rétention. Ce pouvoir d'arrêt est quantifiable par le taux de rétention (TR), appelé aussi taux de rejet, défini comme suit :

$$TR = 1 - \left[\frac{C_s}{C} \right]$$

Équation 3

où C_s est la concentration en soluté dans le perméat et C la concentration en soluté dans la solution d'alimentation. En fonction de la membrane, le TR fluctue en fonction du poids moléculaire du soluté suivant une courbe représentée sur la Figure 26. Le seuil de coupure sera défini comme étant la masse molaire des plus petites molécules retenues à 95% par la membrane.

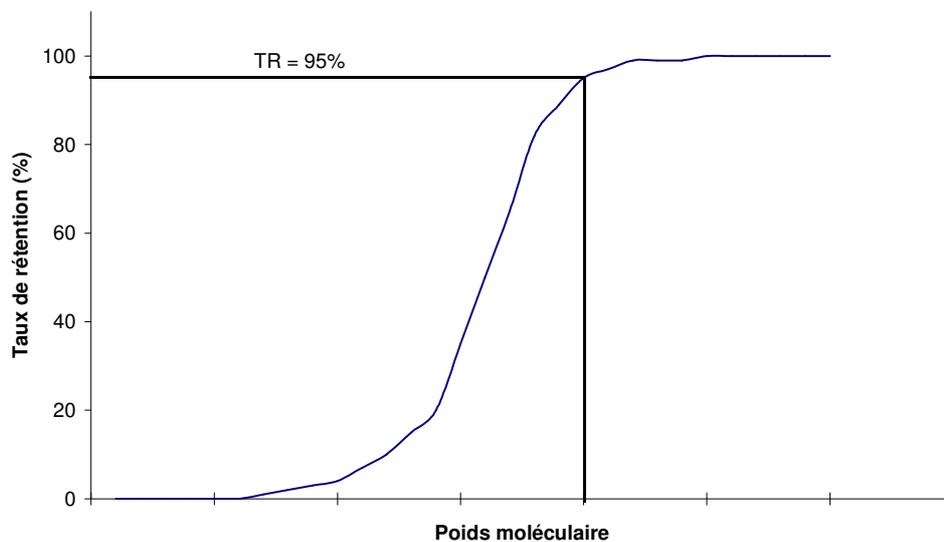


Figure 26 : Représentation du taux de rétention d'une membrane. *Membrane retention rate*

2.2.2.1. Les modules

La principale nécessité d'un module de filtration tangentielle est d'entourer la membrane afin que l'alimentation soit séparée du perméat et que ces deux flux ne se mélangent pas. Les modules doivent également être capables de supporter le gradient de pression et l'écoulement doit être optimisé pour limiter les risques de colmatage. De plus, le coût de fabrication ne doit pas être trop élevé, le système doit être aussi compact que possible tout en permettant un remplacement aisé des membranes. Différents types de modules ont donc été développés : module plan, tubulaire, spiralé et fibre creuse (Figure 27). Le choix d'un module s'effectue essentiellement en fonction des caractéristiques de l'effluent à traiter

(viscosité, taux de matière en suspension, volume à traiter...). Les différents modules doivent aussi permettre une circulation non dénaturante pour le produit, et avoir un maximum de surface de membrane par unité de volume.

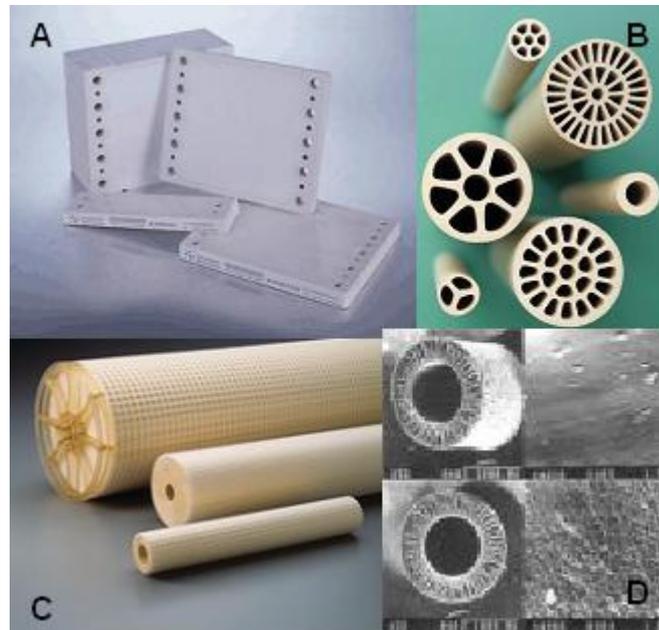


Figure 27 : Différents modules utilisés en ultrafiltration. A : plan, B : tubulaire, C : spiralé, D : fibre creuse. Ultrafiltration modules

Les modules plans qui sont en fait de simples feuilles, sont peu coûteux et très simples à mettre en œuvre. Cependant, la surface filtrante reste très faible par rapport à l'encombrement engendré. C'est pourquoi ce type de technique ne permet que la filtration de petits volumes. Ce type de module est aussi très utilisé dans la réalisation des essais de filtration. Pour augmenter la surface filtrante, des cassettes peuvent être utilisées. Les cassettes correspondent à des superposition de feuilles de membranes empilées et séparées par des couches inertes permettant la circulation des fluides (photo A, Figure 27).

Dans le cas des modules tubulaires (photo B, Figure 27), les membranes ont la forme de cylindres dans lesquels circule l'alimentation. Le rétentat sort à l'extrémité du canal alors que le perméat traverse la membrane et sort latéralement. Ce système est plus volumineux mais moins sensible à l'encrassement que le système plan, il permet ainsi de traiter des solutions plus visqueuses ou chargées sans pré-traitement.

Les modules spiralés sont composés d'une ou plusieurs feuilles membranaires enroulées autour d'un axe (photo C, Figure 27). L'alimentation se fait dans le sens de cet axe ou perpendiculairement, le rétentat sort à l'autre extrémité alors que le perméat est collecté dans

l'axe. Ce type de configuration est surtout utilisé pour des membranes à faible débit dont il est nécessaire d'augmenter la surface filtrante sans trop augmenter le volume de l'installation. L'inconvénient réside dans le fait qu'un pré-traitement est nécessaire, engendrant un surcoût.

Les modules fibres creuses sont composés de membranes de fibres creuses de diamètre interne inférieur à 3 mm (photo D, Figure 27). Par conséquent, les risques d'obstruction sont élevés. Ces modules ne peuvent être utilisés que pour le traitement des eaux contenant peu de solides en suspension ou ayant été pré-traitées. Cependant, par rapport aux modules plans et tubulaires, cette géométrie a l'avantage d'être plus compacte et moins onéreuse.

2.2.2.2. Structure des membranes

Les membranes peuvent présenter différentes structures : isotropes (ou symétriques) ou (asymétriques et composites). Contrairement aux membranes symétriques qui sont constituées d'une seule couche filtrante, les membranes asymétriques sont constituées d'une couche superficielle très mince (0,1 à 0,5 μm) de très fine porosité et d'une sous-couche plus épaisse de porosité plus large. La séparation a lieu dans la couche superficielle tandis que la sous-couche confère une résistance mécanique à la membrane. Les deux couches peuvent être faites de matériaux différents comme c'est le cas pour les membranes composites.

Les membranes peuvent également être classées selon le type de matériau qui les compose. Les membranes peuvent ainsi être :

- organiques à base de polymères naturels (acétate de cellulose, acétobutyrate de cellulose, cellulose régénérée, nitrate de cellulose). Ces membranes résistent mal aux oxydants, à des températures supérieures à 50°C, et ne conviennent qu'à la filtration de solutions dont le pH est compris entre 3 et 8,
- organiques à base de polymères synthétiques (polyamides, polyfuranes, polybenzimidazole, polyéthylène, polysulfone, polyéther sulfone, polycarbonates, polymères vinyliques) : elles sont chimiquement plus résistantes que les précédentes,
- minérales (à base de polyélectrolytes complexes, de silice, de carbone, d'oxyde de graphite, de dioxyde de titane, de zirconium ou d'alumine) : elles ont de bonnes tenues chimiques (pH 1 à 14), mécanique (pression de 1 à 100 bars) thermique et bactériologique. Cependant, le coût de ces membranes est beaucoup plus important. La résistance de ces membranes leur permet de

maintenir une bonne hygiène au système , nécessaire dans des secteurs tels que les industries agroalimentaires.

2.2.2.3. Circulation des fluides dans les modules d'ultrafiltration

En UF, les membranes sont de type poreux, le transport de matière est ainsi effectué par capillarité, suivant la loi de Poiseuille. Le flux de solvant à travers la membrane est alors déterminé par la relation suivante :

$$J = \frac{\pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta} \cdot N \cdot \frac{PTM}{\Delta x} \quad \text{Équation 4}$$

Avec :

J : débit de solvant par unité de surface ($\text{m}^3/\text{m}^2/\text{s}$)

r : rayon de pore (m)

N : nombre de pores par unité de surface (m^{-2})

PTM : Pression transmembranaire (Pa)

η : viscosité dynamique du solvant (Pa.s)

Δx : épaisseur effective de la membrane (m)

La pression transmembranaire est définie comme suit :

$$PTM = \frac{P_e - P_s}{2} - P_p \quad \text{Équation 5}$$

Avec :

P_e : pression en entrée du module de filtration (Pa)

P_s : pression en sortie coté rétentat (Pa)

P_p : pression en sortie coté perméat (Pa)

Le solvant est alors considéré comme un fluide Newtonnien et son écoulement à travers la membrane est laminaire. La perméabilité de la membrane est définie en fonction de son épaisseur, du nombre de pores par unité de surface et du rayon de ces derniers. En pratique, la loi de Darcy (Équation 6) sera utilisée pour permettre de s'affranchir des approximations sur le diamètre des pores, tout en définissant les caractéristiques globales de la membrane : perméabilité ou résistance hydraulique à l'écoulement.

$$J = L_p \cdot PTM = \frac{PTM}{\eta \cdot R} \quad \text{Équation 6}$$

Avec :

L_p : perméabilité hydraulique de la membrane (m/s/Pa)

R_t : Résistance hydraulique totale de la membrane (m^{-1})

Dans le cas d'un solvant pur, la perméabilité hydraulique et la résistance constituent l'état de référence de la membrane. Pour un fluide réel, l'évolution du flux de perméation est différente. En effet, des solutés dissous ou des particules en suspension peuvent être retenus par la membrane, d'où un flux de perméation plus faible qui n'augmente plus linéairement avec la pression mais tend vers une valeur limite, le gain de flux supplémentaire au-delà d'une certaine limite est minime par rapport à la quantité d'énergie nécessaire. Il est donc important de définir une pression de travail optimale pour obtenir un rapport flux de perméation / dépense énergétique élevé (Figure 28).

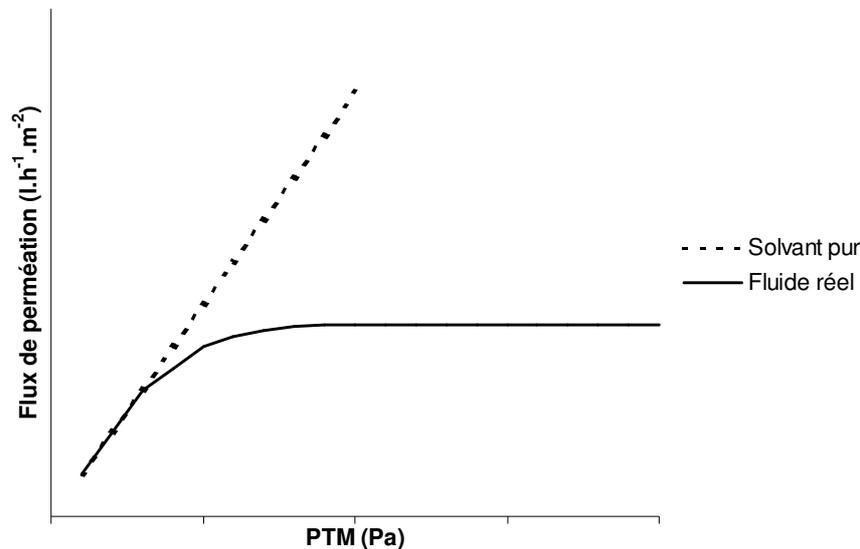


Figure 28 : Représentation schématique des différences de perméabilité entre un solvant pur et un fluide biologique. *Permeability of pure solvent and real fluid*

La pression de travail optimale dépend des caractéristiques du couple membrane / colmatant. Il est nécessaire de la définir pour chaque nouvelle utilisation. Ainsi, l'accumulation de matière à la surface membranaire et les phénomènes de colmatage affectent négativement le flux de perméation et peuvent modifier son taux de rétention, la couche colmatante jouant le rôle de membrane supplémentaire.

2.3. Nettoyage des membranes

2.3.1. Couche de polarisation et colmatage

La pression appliquée induit au sein de la solution un mouvement convectif qui entraîne vers la membrane les espèces présentes dans la solution à traiter, d'où une accumulation locale au niveau de l'interface membrane/solution. Cette zone d'accumulation, appelée couche de polarisation, disparaît dès que la pression redevient nulle. Ce phénomène peut être représenté par le modèle du film, où la surconcentration en soluté à l'interface serait à l'origine d'une rétrodiffusion vers le centre de la veine fluide et donc d'une baisse du flux de perméation transmembranaire.

Le colmatage se manifeste par une diminution du flux de perméation au cours de la filtration et une modification de la sélectivité de la membrane vis-à-vis d'un soluté. Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette baisse : l'adsorption, le bouchage de pores ou encore la formation d'un dépôt à la surface de la membrane (Figure 29). Tous ces phénomènes diffèrent de la polarisation de concentration car le fait de ramener la pression à zéro ne restitue pas les capacités initiales de la perméation de la membrane.

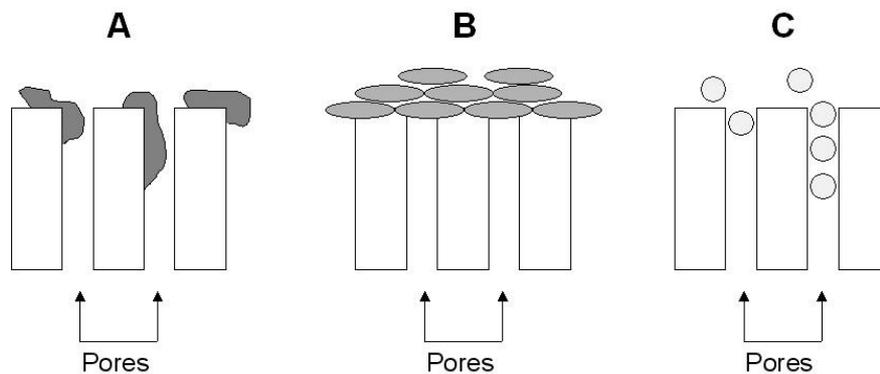


Figure 29 : Différents phénomènes de colmatage. A : Adsorption, B : formation d'un gâteau, C : obstruction des pores. Fouling phenomena : A : adsorption, B : cake formation, C : pore obstruction

L'adsorption est un phénomène de rétention de constituants par un support solide. Ce phénomène est observé du fait de l'existence de forces d'interactions réciproques (interactions physico-chimiques). Ce type d'interaction concerne en particulier les macrosolutés tels que les protéines (Jaouen - 1989), ou les microorganismes présents dans un milieu contenant des polysaccharides (Jaouen - 1989). Ce phénomène peut se produire à la surface de la membrane, voire même, si la géométrie des pores le permet, à l'intérieur des pores. Dans la plupart des cas, les liaisons sont fortes (liaisons hydrogènes ou ioniques), conduisant à des couches

stables. La taille et le nombre des pores sont ainsi réduits, ce qui conduit une augmentation de la résistance à l'écoulement. Pour une restauration partielle du flux de perméation, un nettoyage chimique est nécessaire.

L'autre mode de colmatage est appelé colmatage particulaire. Les particules contenues dans une suspension sont susceptibles de former un dépôt, diminuant ainsi le flux de perméation. En filtration tangentielle, ce phénomène est limité grâce au balayage permanent de la membrane. Deux types de colmatage particulaire peuvent avoir lieu : la formation d'un gâteau et l'obstruction des pores (Figure 29). La formation d'un gâteau se rencontre surtout dans le cas où les particules ne peuvent traverser la membrane. Le nombre de pores est donc diminué, ce qui limite les performances de la membranes. Dans ce type de colmatage, un rinçage, voire un arrêt de la pression peut permettre le nettoyage de la membrane. Lorsque les particules sont plus petites, elles peuvent se loger à l'intérieur même des pores, il s'agit alors d'une obstruction des pores. Ce type de colmatage est plus difficile à éliminer et un nettoyage chimique est nécessaire.

2.3.2. Comment nettoyer les membranes d'ultrafiltration ?

Le phénomène de colmatage peut être limité, par le biais de méthodes physiques (application d'un champ électrique, ajout de promoteurs de turbulences, génération d'écoulement particuliers ou de tourbillons...) ou chimiques (modification de la composition ionique, de la charge...) (Rossi - 2005) mais une étape de régénération périodique des membranes est indispensable. L'enjeu est d'obtenir un nettoyage optimal en limitant la consommation et donc le coût de cette étape, coût également représenté par l'immobilisation du matériel (période improductive). Quatre paramètres sont susceptibles d'avoir une incidence sur l'étape de nettoyage des membranes :

- l'action chimique (type de réactif et concentration),
- la durée du nettoyage,
- la température,
- l'action mécanique.

Une régénération type en industrie pour des colmatants d'origine organique se décompose ainsi :

- rinçage (pousse à l'eau),
- nettoyage chimique alcalin,

- rinçage,
- nettoyage chimique acide,
- rinçage.

D'autres agents chimiques peuvent être utilisés et les industriels proposent des produits plus élaborés tels que l'Ultrasil™ qui combine pouvoirs alcalin et surfactant. La mise en œuvre de ces agents de nettoyage doit prendre en compte les compatibilités avec l'équipement, que ce soit chimique (éviter le chlore en présence d'inox) ou physique (seuils de temps ou de température, concentration des agents de nettoyage en fonction de la résistance de la membrane, des joints...). La conduite de la régénération a aussi son importance : choix de la vitesse de circulation, à PTM nulle ou non, qualité de l'eau (Cabero *et al.* - 1999). Malgré les connaissances acquises dans le domaine, nombreuses sont les études expérimentales qui visent à identifier la procédure optimale de nettoyage au cas par cas, en fonction du fluide à traiter, du type d'équipement, de la durée de fonctionnement, etc. (Rossi – 2005).

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1. Préparation des co-produits solides de sardine (*Sardina pilchardus*)

Les co-produits de sardine ont été prélevés lors de deux essais de production de surimi base effectués au laboratoire. Pour chaque essai, environ 45 kg de sardines fraîches ont été commandés au Marché d'Intérêt National (MIN) de Nantes. Les poissons ont été fournis par les Pêcheries Océanes (Nantes, France). Pêchées dans la journée et conservées sous glace, les sardines sont alors filetées dans la salle de mareyage (+ 4°C) du centre Ifremer de Nantes : les têtes et les viscères sont séparés des filets et collectés séparément (Figure 30).



Filet



Têtes



Viscères

Figure 30 : Photographies des différentes parties obtenues après filetage de sardines (*Sardina pilchardus*) : filet, têtes et viscères. *Sardine parts obtained after fileting ; filet, heads and viscera*

Environ 9 kg de têtes et 6 kg de viscères sont collectés lors de chaque essai. Des aliquotes de 500 g environ sont réalisées pour chaque matrice. Chaque aliquote est placée dans un sac sous vide d'air et conservée à -80°C.

Les co-produits utilisés pour cette étude viennent de deux campagnes de prélèvement différentes dans le but de s'affranchir au maximum des variations biochimiques induites par la saison, le sexe ou la taille des individus (Silva - 2003; Caponio *et al.* - 2004). Ainsi, la première campagne de prélèvement a été effectuée en avril 2004 avec des poissons provenant des côtes Nord Espagnoles. La seconde campagne a, quant à elle, été effectuée en juin 2004 et les sardines ont été pêchées près des côtes vendéennes. Les deux campagnes de pêches ont été réalisées dans la zone de pêche FAO 27 (Figure 31).

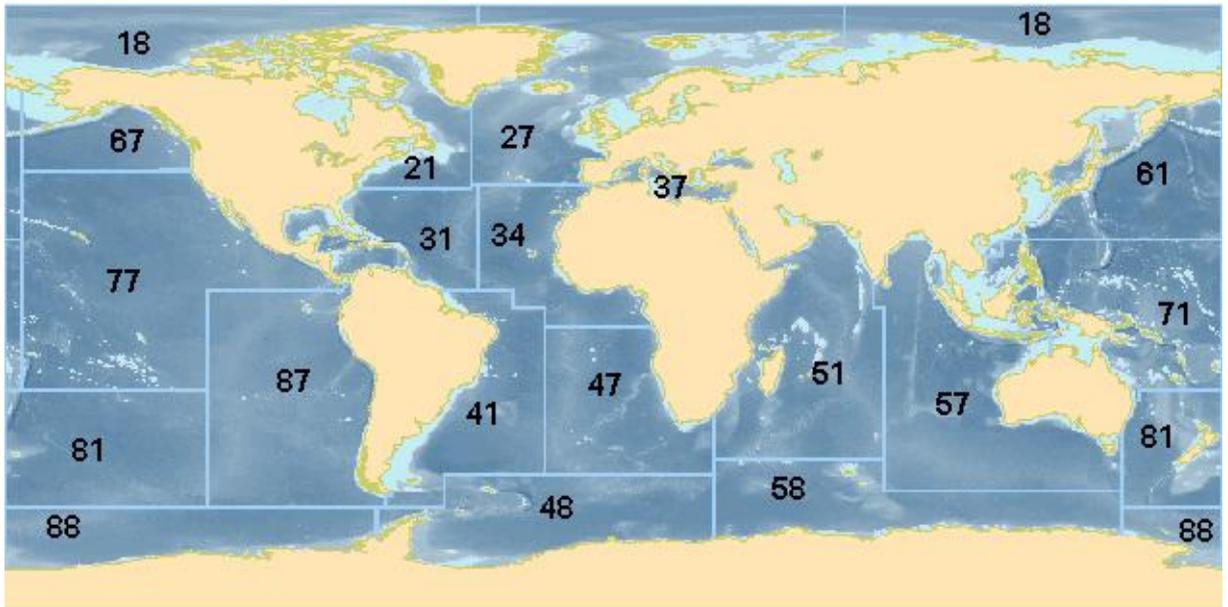


Figure 31: Localisation de la zone de capture des sardines utilisées pour l'étude selon la répartition des zones de pêches classées par la FAO (www.fao.com). *FAO fishing areas*

1.2. Homogénéisation et broyage des matrices

Pour chaque étude, un lot provenant de la première campagne est mélangé avec un lot provenant de la seconde. Le broyage des co-produits est réalisé à l'aide d'un Blender (Waring Commercial, USA) pendant 1 min. Une homogénéisation minutieuse à la spatule est ensuite réalisée avant de placer des aliquotes de 100g environ dans des pots qui sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1.3. Obtention des co-produits liquides

Les effluents issus de la chaîne de fabrication du surimi base sont également récupérés en vue de leur valorisation. Ces effluents correspondent à l'eau de lavage récupérée lors de la première étape de lavage / essorage du procédé (Figure 1). Cette eau est ensuite centrifugée dans une écrémeuse industrielle. Le culot résultant de cette centrifugation est stocké à -20°C . Le surnageant est ensuite soumis à une seconde centrifugation (4000 g, 30 min, 20°C) permettant la récupération de 3 phases : un culot de faible volume, une fraction liquide et une fraction huileuse. La fraction liquide résultant de cette seconde centrifugation est conservée sous atmosphère inerte (azote) à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant une courte période avant son utilisation en filtration membranaire.

La Figure 32 schématise le procédé de traitement des effluents de la chaîne de surimi.

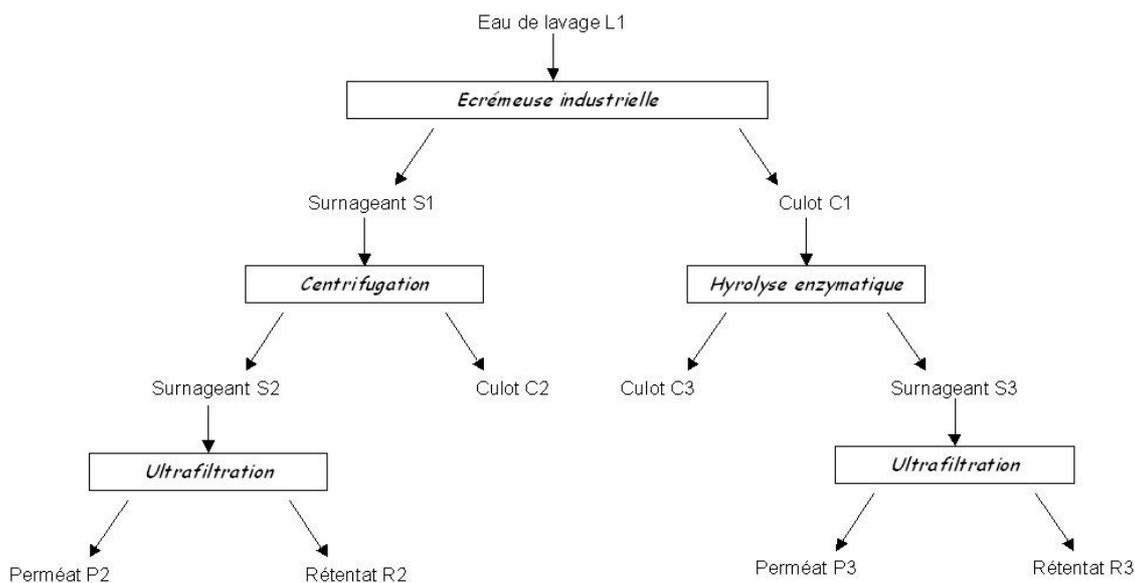


Figure 32 : Schéma de traitement des effluents issus de la première eau de lavage de la production de surimi. *Effluents from first surimi production waste water treatment*

Etant donnée la difficulté d’obtention de cette eau (moyens humains, matière première, moyens techniques), la production de ces effluents peut être réalisée à l’échelle du laboratoire. Pour ce faire, une plus faible quantité de sardines (5 kg soit 9 fois moins que lors des essais sur la chaîne pilote) est étêtée et éviscérée. Les filets sont ensuite broyés à l’aide d’un blender puis sont mélangés à l’eau du réseau pendant 30 min. L’ensemble est alors centrifugé (4000 g, 30 min, 20°C). Le surnageant résultant de cette étape est filtré sur toile afin d’éliminer tout déchet qui ne pourrait pas passer au travers des membranes utilisées. Les lipides contenus dans ce surnageant sont ensuite éliminés par décantation et le surnageant est utilisé pour la filtration.

2. MATERIEL ENZYMATIQUE

Les enzymes utilisées pour cette étude ont été fournies gracieusement par la société Novozymes AS (Danemark).

2.1. Protamex

Protamex est une enzyme industrielle produite par génie génétique par Novozymes AS. C’est un complexe peptidique de la classe des hydrolases développé par plusieurs espèces de *Bacillus* pour l’hydrolyse des protéines destinées à l’industrie alimentaire. Contrairement à d’autres endoprotéases, Protamex a été élaborée de façon à ne pas générer de peptides amers, même lorsque les degrés d’hydrolyses sont faibles. Protamex correspond à un mélange des

enzymes Alcalase et Neutrase. Du fait du mélange enzymatique présent dans ce complexe, Protamex possède les numéros enzymatiques suivants : EC 3.4.21.62 et EC 3.4.24.28. Protamex est standardisée d'après le fournisseur en unité Anson par g (AU/g). L'activité déclarée de Protamex est de 1,5 AU/g. Les conditions optimales sont un pH compris entre 5,5 et 7,5 et une température comprise entre 35 et 60°C.

Protamex peut être inactivée par chauffage à 85°C pendant 10 min lorsque le pH est de 8.

2.2. Alcalase

Alcalase 2,4 L FG est produite par fermentation à partir d'une souche sélectionnée de la bactérie *Bacillus licheniformis*. Son principal constituant enzymatique est la Subtilisine A (Subtilisine Carlsberg), une endopeptidase qui possède les résidus sérine comme site catalytique. Cette enzyme possède les autorisations FAO pour être utilisée à des fins alimentaires. Les numéros enzymatiques de l'alcalase sont EC 3.4.21.62, 3.4.21.19 et 3.4.22.31. Les conditions optimales pour Alcalase sont une température comprise entre 55 et 70°C et un pH compris entre 6,5 et 8,5. L'activité déclarée de Alcalase est de 2,4 AU/g

Alcalase peut être inactivée par chauffage à 85°C pendant 10 min lorsque le pH est de 8.

2.3. Flavourzyme

Flavourzyme 500MG est un complexe peptidique qui hydrolyse les protéines dans des conditions neutres ou acides. Elle est de la classe des hydrolases. Flavourzyme est produite par fermentation d'*Aspergillus oryzae* et possède des activités endoprotéase et exopeptidase. Son numéro enzymatique est EC 3.4.11.1. Les conditions optimales de travail de Flavourzyme sont une température avoisinant 50°C et un pH pouvant varier de 4 à 10. Flavourzyme est composée de au moins 4 endopeptidases et 5 exopeptidases. Flavourzyme est souvent utilisée dans le but de diminuer l'amertume des peptides. L'activité spécifique de cette enzyme est donnée cette fois-ci en unités Leucine Amino Peptidase par g (LAPU/g). Flavourzyme 500 MG possède une activité de 500 LAPU/g.

Flavourzyme est inactivée à partir de 75°C pendant 10 min.

Remarque : Protamex, Alcalase et Flavourzyme sont tous les trois des complexes enzymatiques. Cependant, dans un but de lisibilité, le terme enzyme sera utilisé pour chacun de ces complexes durant tout le manuscrit.

2.4. Papaïne

La papaïne est l'enzyme utilisée pour l'hydrolyse du culot issu de la centrifugation des effluents.

La papaïne est une enzyme végétale issue de la papaye et classée parmi les hydrolases de la classe des cystéines endopeptidases. Son principal numéro EC est 3.4.22.2 mais d'autres numéros peuvent être trouvés en fonction des fournisseurs (Tableau I). Les conditions optimales de travail de cette enzyme sont une température allant de 40 à 80°C et un pH compris entre 5 et 8. La papaïne est de plus grande efficacité lorsqu'un catalyseur est ajouté, la cystéine, à raison de 0,025% lorsque la papaïne est ajoutée à raison de 2% du poids frais de la matrice à hydrolyser. L'activité spécifique de la papaïne donnée par le fournisseur est 6500 NFPU/g (Nuclear Floating Power Unit). Cependant, la papaïne étant utilisée seule et pour une étude spécifique, cette enzyme n'a pas été caractérisée comme les trois autres.

Tableau VIII : Spécificité des Protéases utilisées. Les acides aminés entre parenthèse indiquent une activité moins prononcée de l'enzyme. *Proteases specificities*

	Hydrophobes							Souffrés		Basiques			Acides		Aminés		-OH		Gly	Ala
	Trp	Iso	Pro	Phe	Tyr	Leu	Val	Met	Cys	Lys	Arg	His	Glu	Asp	Gln	Asn	Ser	Thr		
Alcalase	x	x	x	x	x	x	x						x	x						
Protamex	x	x	x	x	x	x	x			x	x									
Flavourzyme	x	x		x	x	x	x			x	x		(x)	(x)	(x)	(x)	x	x		x
Papaïne				x	x	x	x			x	x									

3. DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DES ENZYMES ET DES MATRICES

3.1. Activités spécifiques des enzymes commerciales

Malgré le fait que les trois complexes enzymatiques proviennent du même fournisseur, les unités données pour les activités spécifiques sont différentes (AU/g pour Protamex et Alcalase et LAPU/g pour Flavourzyme). Il convient alors de calculer les activités de chaque enzyme de façon similaire afin de pouvoir par la suite comparer les enzymes entre elles. Les complexes enzymatiques seront calibrés selon la méthode décrite par Stoknes *et al.* (Stoknes I. *et al.* - 1993).

Pour chaque complexe, différentes conditions de pH, de température et de concentration en enzymes sont testées dans le but de définir les plus favorables à l'hydrolyse d'un substrat modèle : l'hémoglobine. Ainsi, 4 températures (30, 40, 50 et 60°C) et 5 valeurs de pH (5, 6, 7, 8 et 9) sont testées pour les 3 complexes. Concernant les concentrations, les indications données par le fournisseur (Novozymes - 2001a; Novozymes - 2001b; Novozymes - 2001c) nous suggèrent de tester différentes concentration en fonction des complexes. Protamex et Alcalase, ayant des activités du même ordre de grandeur (1,5 et 2,4 AU/g pour Protamex et Alcalase respectivement) vont être testées aux concentrations suivantes : 0,1 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5% et 1% (p/p). Flavourzyme qui semble posséder une activité moindre est testée à ces concentrations : 1,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 et 15% (p/p).

Tous les essais sont réalisés 3 fois. Pour travailler aux pH souhaités, des tampons phosphate citrique sont réalisés à l'aide de solutions de Na_2HPO_4 0,2 M et d'acide citrique 0,1 M. Les proportions nécessaires de ces deux solutions pour chaque valeur de pH sont reportées dans le Tableau IX. Pour chaque tampon ainsi constitué, le pH est ajusté si besoin avec des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique.

Pour chaque essai, 1,2 mL de tampon et 0,4 mL d'hémoglobine 1% (p/v) sont placés dans un bain marie à la température souhaitée. Les échantillons de référence sont réalisés en ajoutant 2 mL de TCA 5% (v/v). Lorsque le système est à la température souhaitée, 0,4 mL de solution enzymatique est ajouté. Les échantillons sont ensuite placés de nouveau dans le bain-marie et l'hydrolyse est ainsi conduite pendant une heure. L'objectif de cette étude n'étant pas de déterminer le comportement de chaque complexe enzymatique mais de pouvoir déterminer, dans les mêmes conditions, les activités de chacun à un temps donné, aucune cinétique enzymatique n'est réalisée. Il s'agit ici de pouvoir comparer les complexes entre eux.

Tableau IX : Tampons phosphate citrique utilisés pour la détermination de l'activité spécifique des enzymes. *Phosphate citric buffer used for the specific activity of enzymes*

pH	Na_2HPO_4 0,2 M	Acide citrique 0,1 M
5	98 mL	102 mL
6	126 mL	74 mL
7	161 mL	39 mL
8	193 mL	7 mL
9	200 mL	0 mL

Au bout des 60 min, 2 mL de TCA 5% sont ajoutés dans les tubes n'en ayant pas reçu avant l'hydrolyse. Les échantillons sont ensuite laissés à température ambiante puis sont filtrés sur papier cellulose standard. La quantité de protéine contenue dans chaque perméat est ensuite déterminée selon la méthode de Lowry (Lowry *et al.* - 1951).

L'activité spécifique de chaque complexe est exprimée en unité enzymatique à laquelle correspond la quantité de BSA hydrolysée en 1h (Équation 7).

$$1 \text{ U} = 1 \text{ mg de BSA coupée / h.} \quad \text{Équation 7}$$

3.2. Activité protéolytique des co-produits de sardine

Les matrices vivantes contiennent naturellement des enzymes endogènes indispensables pour leur métabolisme. De façon générale, pour ne pas que cette machinerie enzymatique vienne interférer avec les enzymes exogènes, les tissus à hydrolyser sont préalablement cuits de façon à inactiver les enzymes endogènes. Cependant, de tels traitement thermiques peuvent altérer la qualité des composés biochimiques présents. En effet, une récente étude portée sur l'hydrolyse des co-produits de morue a montré que l'inactivation des enzymes endogènes conduisait à la formation de complexes entre les protéines et les lipides, essentiellement les lipides polaires (comme les phospholipides) qui seront retrouvés après hydrolyse dans la fraction insoluble. Il a également montré que l'inactivation des enzymes endogènes rend plus difficile l'accès des protéines aux enzymes (Šližyte *et al.* - 2005b). Cette étude a donc pour objectif de considérer l'activité endogène de façon à ce que les hydrolyses soient conduites sur des matrices crues.

Les extraits enzymatiques des co-produits de sardine sont obtenus en mixant 50 g de tissus homogénéisés avec 100 mL d'eau distillée pendant 20 s à l'aide d'un ultraturax et à +4°C. Après 10 min de repos, les échantillons sont centrifugés (30 min à 10400 g et à +4°C). Le surnageant est ensuite filtré à travers de la laine de verre et l'extrait enzymatique est collecté. L'activité protéolytique de ces extraits est mesurée de la même façon que pour les enzymes commerciales.

4. HYDROLYSES ENZYMATIQUES

4.1. Equipement et installation

Le but de cette étude est de déstructurer les matrices par le biais de protéases de façon à libérer les lipides, la fraction protéique est également récupérée en vue d'une valorisation ultérieure. La genèse de produits d'intérêt doit donc être répétable et le procédé maîtrisé. Il est donc important de travailler dans des conditions précises et contrôlées de température et de pH adaptées à l'enzyme utilisée. C'est pourquoi la méthode du pHstat est utilisée dans cette étude pour réaliser toutes les hydrolyses enzymatiques.

Les échantillons sont placés dans un réacteur à double enveloppe avec 1 volume d'eau milliQ. Les système est mis en agitation (300 rpm pour les viscères et 700 rpm pour les têtes) et est amené à la température voulue à l'aide de la circulation d'éthylène glycol dans la double enveloppe du réacteur. La température à l'intérieur du système est mesurée à l'aide de la sonde de température du pHstat. Le pH initial est mesuré puis l'ajout manuel de soude (1 ou 2 M) est réalisé jusqu'à l'obtention du pH voulu pour réaliser l'hydrolyse. L'enzyme est ajoutée après stabilisation du système et le pH est contrôlé par l'électrode et régulé par la pointe d'addition. (Figure 33).

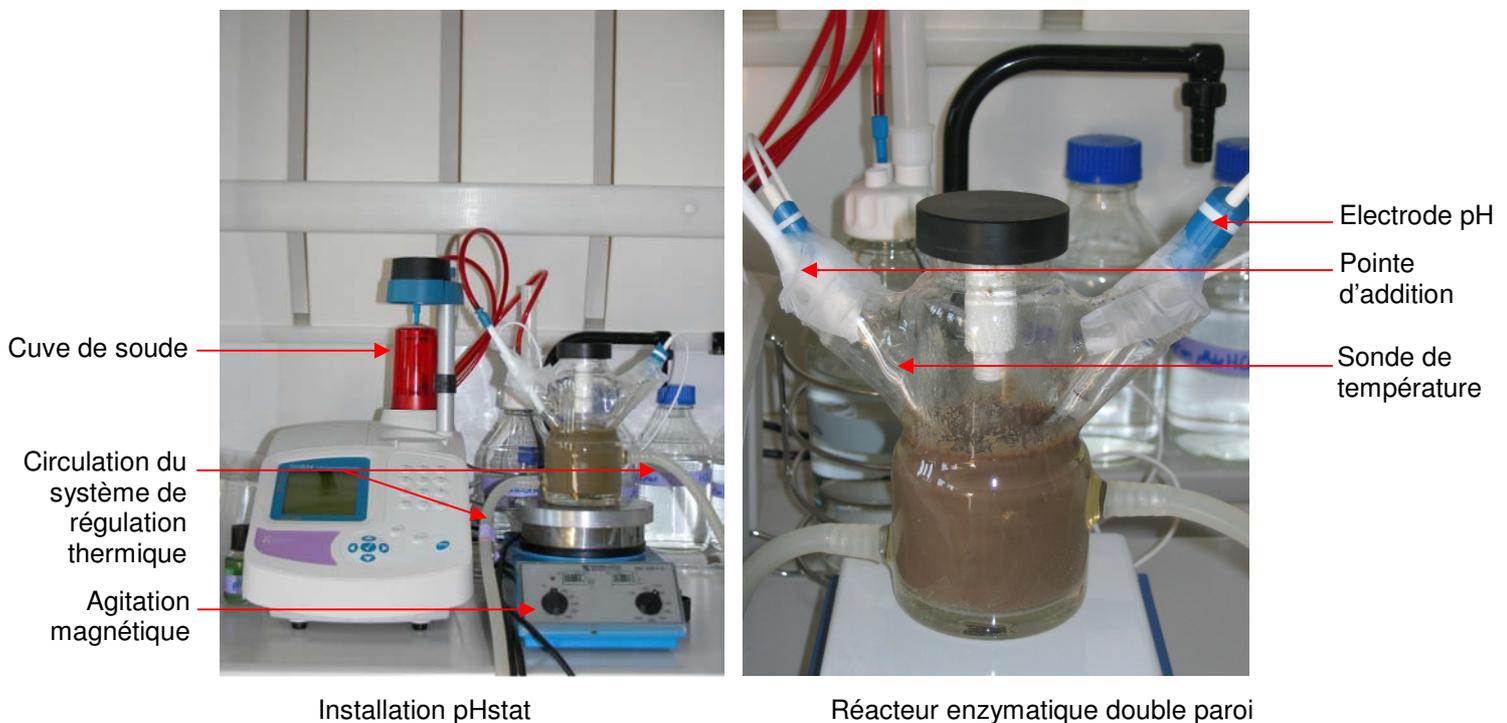


Figure 33 : Installation réalisée au laboratoire pour l'hydrolyse enzymatique contrôlée. *pHstat installation for enzymatic hydrolysis*

4.2. Suivi de la cinétique des hydrolyses

Chaque hydrolyse est suivie en temps réel grâce au volume de soude versé au cours du temps. Cependant, la quantité de soude versée varie en fonction de la libération des protons H⁺ au cours de l'hydrolyse mais également en fonction des conditions physico-chimiques dans lesquelles sont réalisées les expériences. Ainsi, le volume de soude versé est différent en fonction de la température de travail. En effet, le pK varie de façon significative avec la température (Kristinsson et Rasco - 2000c) :

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 T} \cdot 240 \quad \text{Équation 8}$$

Le facteur de dissociation des ions α -NH₂, nécessaire au calcul du DH est fonction du pK et peut être exprimé par la formule :

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1+10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad \text{Équation 9}$$

Le Tableau X recense les différentes valeurs du coefficient de dissociation α en fonction de différentes températures.

Tableau X : Facteurs de dissociation α des groupements aminés obtenus en fonction de la température et du pH. *Dissociation factors of amino groups according to the temperature and pH*

pH	Température				
	25°C	30°C	40°C	50°C	60°C
6,5	-	-	-	0,20	0,29
7,0	-	0,20	0,33	0,44	0,56
7,5	0,39	0,44	0,61	0,71	0,80
8,0	0,67	0,71	0,83	0,88	0,93
8,5	0,86	0,88	0,94	0,96	0,97
9,0	0,95	0,96	0,98	0,99	0,99
9,5	0,98	0,99	0,99	1,00	1,00
10,0	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00
10,5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Ainsi, de façon à normaliser nos données, surtout lors de la conduite des plans d'expériences, l'évolution de l'hydrolyse est exprimée à l'aide du degré d'hydrolyse (DH), dont l'équation, déterminée par Adler Nissen (Adler-Nissen - 1986) est la suivante :

$$DH = \frac{V.N}{\alpha.Mp.h_{tot}} .100 \quad \text{Équation 10}$$

Avec :

V = Volume de soude consommée durant l'hydrolyse

N = Normalité de la soude

α = Facteur de dissociation des groupements α -NH₂

Mp = Masse de protéines dans la matière fraîche

h_{tot} = nombre total de liaison peptidiques dans la protéine soit 8,6 eq.g.Kg⁻¹ protéine
(recommandé par Novozymes pour le poisson)

Remarque : Ce mode de calcul du DH nous permet de pouvoir donner une estimation du DH mais les valeurs obtenues ne sont pas exactes dans la mesure où les facteurs α et h_{tot} sont estimés à partir de standards et non directement à partir de nos échantillons.

4.3. Hydrolyses longue durée

Dans un premier temps, des hydrolyses de longue durée ont été réalisées de façon à observer le comportement des matrices en contact avec les enzymes. Environ 100 g de matière première sont utilisées. Les hydrolyses ont été conduites pendant 24 h. Deux types d'hydrolyses ont été réalisées : avec une seule enzyme ou en utilisant 2 ou 3 enzymes. Ainsi, pour chaque co-produit, 4 hydrolyses ont été effectuées.

4.4. Optimisation des hydrolyses

Les conditions d'hydrolyse utilisées dans la première partie de ce travail ont été définies à partir d'une optimisation réalisée sur un substrat modèle, l'hémoglobine. La biochimie complexe et différente de chaque matrice incite à optimiser l'hydrolyse de chaque matrice de façon séparée. Nous avons vu précédemment que plusieurs facteurs indépendants peuvent affecter les hydrolyses enzymatiques. Pour optimiser les hydrolyses de nos matrices la méthodologie des plans d'expériences va être utilisée.

4.4.1. Principe de la méthodologie des plans d'expériences

La méthode des plans d'expériences a été mise au point au début du siècle, dans les années 1920, par Ronald A. Fischer, dans le cadre d'études agronomiques. Elle a pris un essor considérable avec le développement de l'informatique et la puissance de calcul qui l'accompagne. La grande nouveauté de la méthode des plans d'expériences est qu'elle

propose une expérimentation factorielle, c'est-à-dire que tous les facteurs varient simultanément. Le traitement des résultats se fait à l'aide de régressions multiples et l'analyse de variance (Goupy - 1988). Le fait de faire varier tous les facteurs à la fois n'est pas un inconvénient mais offre au contraire de nombreux avantages :

- Diminution du nombre des essais
- Possibilité d'étudier un grand nombre de facteurs
- Détection des interactions entre facteurs
- Détection des optimaux
- Meilleure précision sur les résultats
- Optimisation des résultats
- Modélisation des résultats

Les plans d'expériences permettent l'étude de nombreux facteurs tout en maintenant le nombre d'essais à des hauteurs raisonnables, c'est pourquoi l'une de leurs applications principale est la recherche des facteurs influents.

Les plans d'expériences utilisés dans ce travail sont des plans centraux composites, développés dans la méthodologie des surfaces de réponses. Ces plans permettent l'étude d'un modèle quadratique. Les facteurs doivent tous être quantitatifs et maîtrisés avec précision, car les valeurs des niveaux sont données par le plan. Tous les facteurs pour lesquels l'influence quadratique est testée possèdent 5 niveaux.

Le point central (0 ;0 ;0) est le seul point répété. Il est utilisé pour estimer la variance de répétabilité, supposée ensuite constante dans tout le champ expérimental. La robustesse aux valeurs aberrantes et la possibilité de détecter des influences du troisième ordre dépendent également du nombre de répétitions du point central. Le plan orthogonal combine des facteurs à deux niveaux (-1 et +1). C'est lui qui permet l'analyse des interactions, il détermine le modèle. A ces points peuvent être ajoutés des points en étoile. Ces points représentent 2 essais par facteur (dans notre cas, -1,68 et +1,68), chaque facteur prend alors au total 5 niveaux différents dans le plan. Cette séquence permet de tester l'effet quadratique des facteurs (Benoist et Tourbier - 1994) Le schéma d'un tel plan est représenté sur la Figure 34. Le calcul des niveaux des facteurs est indiqué dans le Tableau XI.

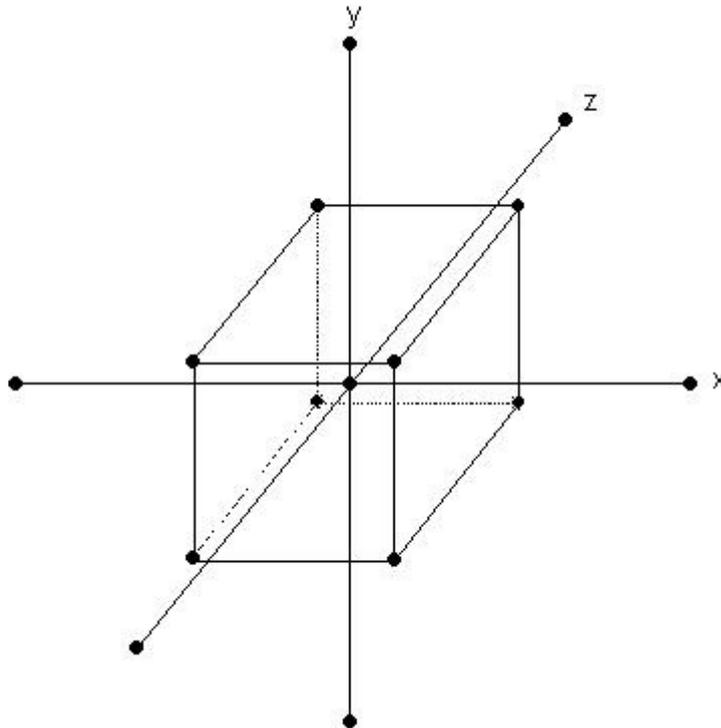


Figure 34 : Représentation d'un plan central composite en 3 dimensions

Tableau XI : Calcul du niveau des facteurs utilisés pour la réalisation des plans d'expériences. *Factor level calculation for the experimental design*

Niveaux	Valeurs réelles
$-\alpha$	Min
-1	$\frac{Min + Max}{2} - \frac{1}{\alpha} \left(Max - \frac{Min + Max}{2} \right)$
0	$\frac{Min + Max}{2}$
+1	$\frac{Min + Max}{2} + \frac{1}{\alpha} \left(Max - \frac{Min + Max}{2} \right)$
$+\alpha$	Max

Dans notre cas, α est égal à 1,68.

4.4.2. Paramètres étudiés

Comme cité plus tôt, plusieurs paramètres sont influents lors de la conduite d'hydrolyses enzymatiques (la concentration du substrat et de l'enzyme, le pH, la

température, la force ionique, la présence ou l'absence de substances inhibitrices/activatrices, la quantité d'eau ajoutée). Lors de notre étude, seules la concentration en enzyme, la température et la durée d'hydrolyse seront optimisées. Les autres paramètres influents seront quant à eux maintenus constants pour ne pas créer d'interférence. Le Tableau XII indique les conditions utilisées pour mailler le domaine expérimental utilisé pour l'optimisation de l'hydrolyse des têtes de sardine.

Tableau XII : Matrice expérimentale de l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex concernant la durée de l'hydrolyse, la température et la concentration en enzyme. *Experimental matrix for the hydrolysis optimisation of sardine heads with Protamex*

Numéro de l'expérience	Temps d'hydrolyse	Température	E/S ratio
1	+1	-1	+1
2	0	0	+1,68
3	0	0	0
4	+1,68	0	0
5	-1,68	0	0
6	0	0	-1,68
7	-1	+1	-1
8	0	0	0
9	-1	-1	+1
10	0	-1,68	0
11	-1	-1	-1
12	0	+1,68	0
13	+1	-1	-1
14	+1	+1	+1
15	-1	+1	+1
16	+1	+1	-1
Niveaux des variables	Temps d'hydrolyse min	Température °C	E/S ratio % (p/p)
-1,68	29	31	0,02
-1	358	36	0,07
0	840	43	0,15
+1	1322	50	0,23
+1,68	1651	55	0,28

Lors de cette optimisation, nous nous sommes rendus compte que la température maximale était peut-être un peu faible. C'est pourquoi les conditions utilisées pour l'optimisation des viscères sont différentes (Tableau XIII). De plus, il est plus robuste d'utiliser un plus grand nombre de points centraux. Aussi, pour cette deuxième optimisation, 4 points centraux seront réalisés.

Tableau XIII :Matrice expérimentale de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex concernant la durée de l'hydrolyse, la température et la concentration en enzyme. *Experimental matrix for the hydrolysis optimisation of sardine viscera with Protamex*

Numéro de l'expérience	Temps d'hydrolyse	Température	E/S ratio
1	+1,68	0	0
2	0	0	0
3	+1	+1	+1
4	0	0	0
5	+1	-1	+1
6	-1	-1	+1
7	-1	+1	-1
8	-1	+1	+1
9	0	0	+1,68
10	0	+1,68	0
11	0	0	-1,68
12	+1	+1	-1
13	0	0	0
14	+1	-1	-1
15	-1,68	0	0
16	-1	-1	-1
17	0	-1,68	0
18	0	0	0
Niveaux des variables	Temps d'hydrolyse min	Température °C	E/S ratio % (p/p)
-1,68	29	30	0,02
-1	358	37	0,07
0	840	48	0,15
+1	1322	58	0,23
+1,68	1651	65	0,28

Après avoir conduit toutes ces hydrolyses, différentes réponses sont étudiées : le degré d'hydrolyse, la quantité de lipides recueillie dans la fraction huileuse, la quantité de lipides recueillie dans les fractions liquides (fraction huileuse + fraction soluble), les quantités de phospholipides recueillies dans la fraction huileuse d'une part, et dans les fractions liquides d'autre part. Les données obtenues sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Statgraphic 5 + (Magnugistic, USA).

5. ULTRAFILTRATION

5.1. Filtration de l'hydrolysate de têtes de sardine

Cette étape a été réalisée entièrement avec des membranes en polyéther sulfone (PES) commercialisées par la société PALL dont la morphologie est représentée par la Figure 35.

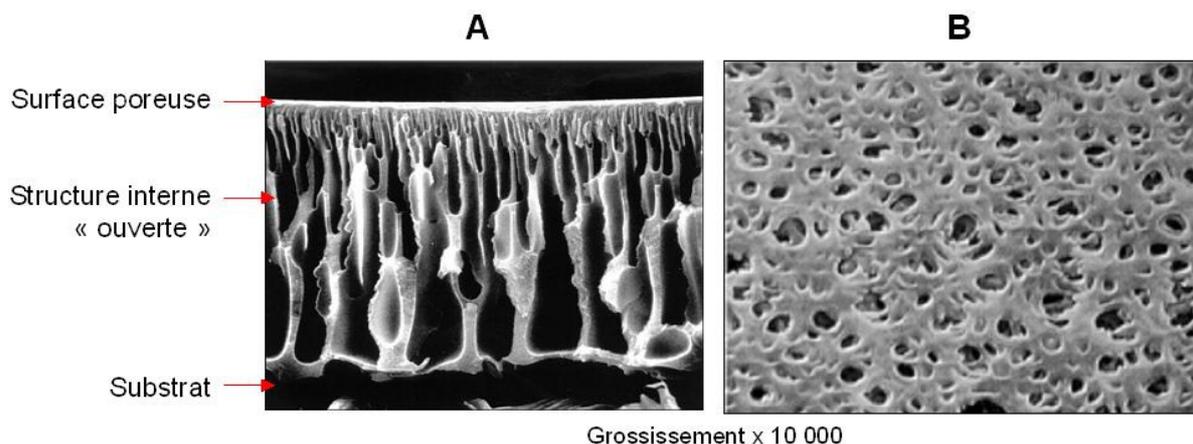


Figure 35 : Morphologie de la membrane Omega m-PES PALL®. A : vue de face ; B : vue de dessus. PES membrane morphology

5.1.1. Essais préliminaires : choix du seuil de coupure

L'objectif de cette étude est de trouver une membrane permettant la concentration des lipides et la transmission des peptides, avec un colmatage minimum. Afin de trouver le meilleur seuil de coupure, des tests préliminaires sont réalisés à l'aide d'un petit pilote d'UF. Les échantillons utilisés pour cette analyse proviennent des hydrolyses réalisées pendant 24 h avec les enzymes combinées.

5.1.1.1. Equipement

Cette étape a été réalisée avec le pilote 10 mL stirred cell Omega fourni par la société Pall. Le matériau utilisé est du PES modifié et différents seuils de coupure peuvent être testés (1, 3, 5, 30, 50, 100 et 300 kDa). Ce matériau est spécialement conçu par la société Pall pour traiter des solutions protéiques (faible affinité du matériau avec les protéines). Ce matériau est également utilisé dans la production d'huiles, notamment dû au fait de sa forte rétention des phospholipides (Kartika - 2005). Les cellules utilisées sont à usage unique. Le mode de filtration de ce pilote consiste en une filtration frontale. La capacité de ces unités est de 10 mL (schéma représenté sur la Figure 36). Les principales caractéristiques de cette petite unité de laboratoire sont données dans le Tableau XIV.

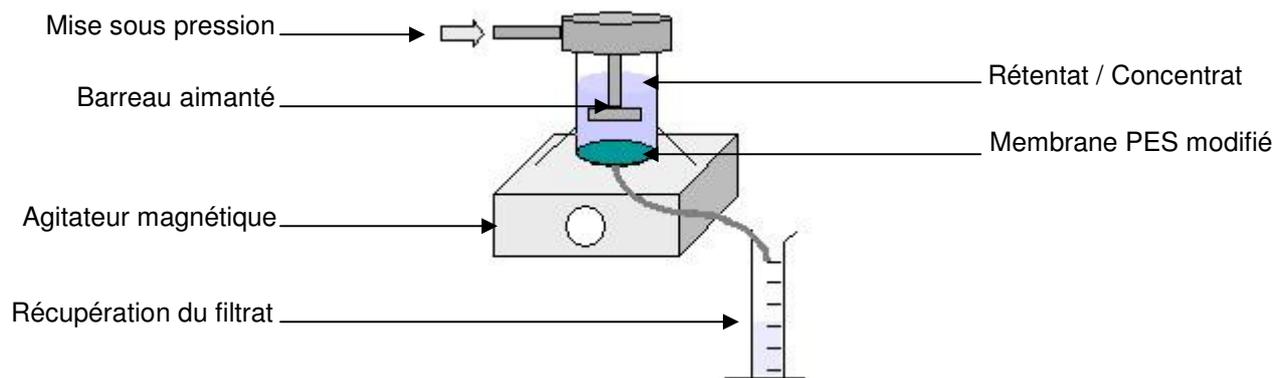


Figure 36 : Schéma de fonctionnement du pilote Omega (PALL®). *Operating scheme of Omega pilot*

Tableau XIV : Caractéristiques du pilote Omega fournies par le fabricant. *Omega pilot characteristics*

Matériau	PES modifié
Surface membranaire utile	5,58 cm ²
Pression de fonctionnement	0 à 3,7 bars
Plage pH	1-14

5.1.1.2. Mode opératoire

Après hydrolyse, 10 mL de surnageant sont prélevés pour être introduits dans les cellules de filtration. Lorsque le système est installé, une pression de 2 bars est exercée, amorçant la filtration. Le débit de perméat est calculé et le perméat recueilli. La filtration est arrêtée lorsque le volume perméat atteint 5 mL. Le perméat et le rétentat sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à ce que les lipides totaux et les protéines solubles soient analysés.

5.1.2. La filtration avec le pilote Minim®

Cette étape est réalisée après que l'hydrolyse a été optimisée. Pour réaliser la filtration, une hydrolyse de plus grande capacité (de 500 à 700 g de co-produits broyés) est menée de façon à avoir des quantités suffisantes de surnageant. Après centrifugation, le surnageant est clarifié sur fritté (n°3) avant passage en ultrafiltration.

5.1.2.1. Equipement

Le pilote Minim® (Figure 37) nous a été fourni par la société PALL, ainsi que les membranes nécessaires. Le pilote Minim® est un petit système pour le développement de procédés de filtration tangentielle à l'échelle laboratoire.

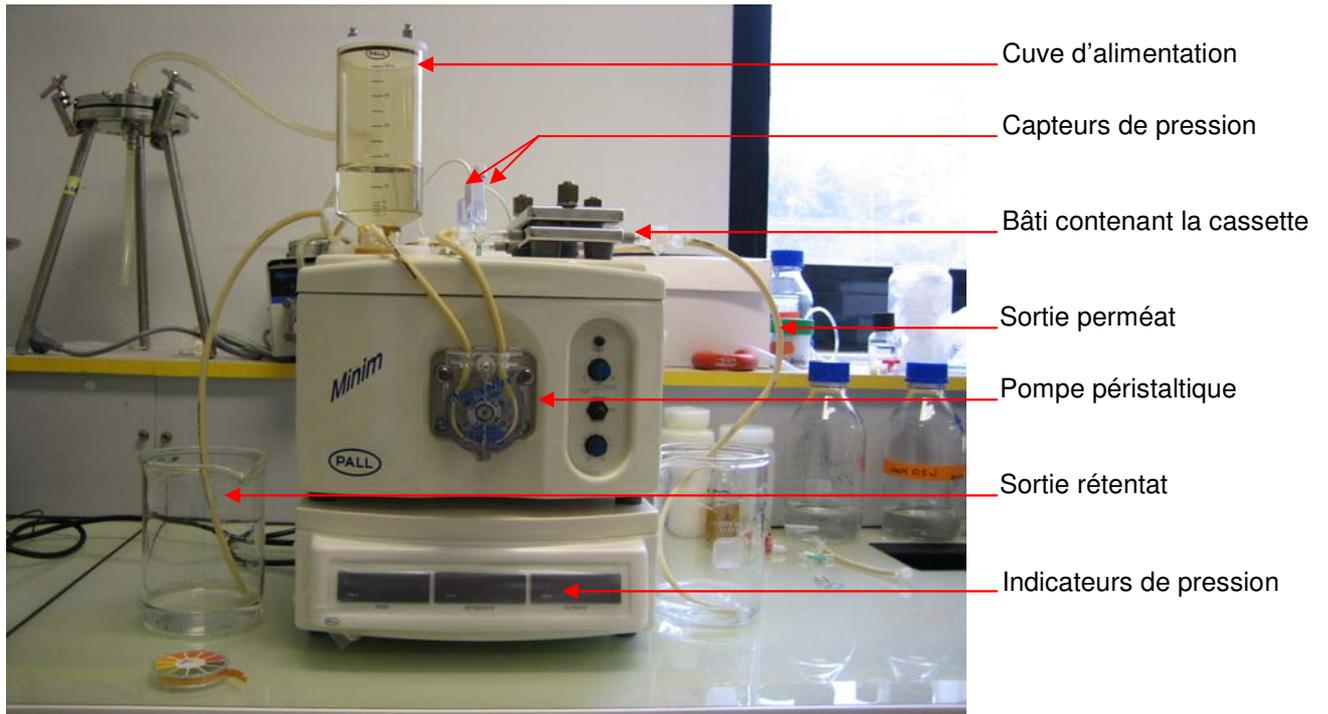


Figure 37 : Installation du pilote de filtration Minim®. *Minim® pilot installation*

Le fonctionnement de l'installation est détaillé sur la Figure 38.

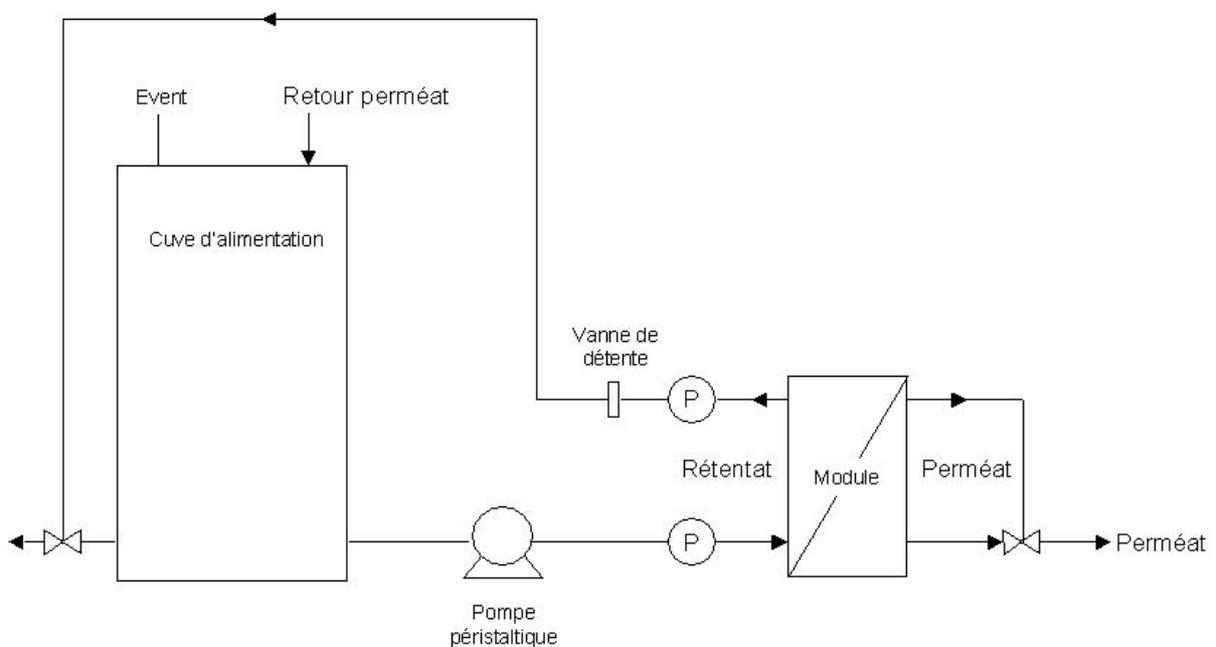


Figure 38 : Schéma de fonctionnement du système d'ultra-filtration avec le pilote Minim®. *Operating scheme of Minim® ultrafiltration system*

Nous avons travaillé avec des cassettes Pall Omega PES OS300C12P2 (Figure 39). Comme pour les essais précédents, le matériau utilisé ici est spécialement développé pour avoir une faible affinité avec les protéines, une sélectivité et une résistance chimique élevée avec de hauts débits et rendements. Le seuil de coupure auquel cette étape a été réalisée est celui déterminé lors de l'étape préliminaire. La surface de contact de cette cassette est de 0,019m².

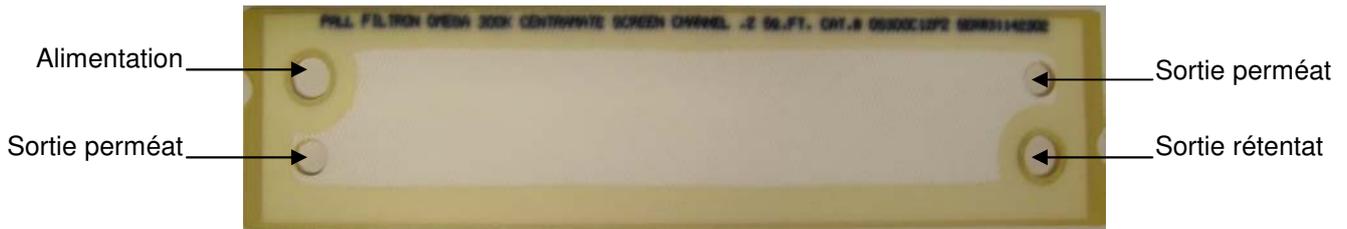


Figure 39 : Cassette d'ultrafiltration Centramate screen channel PALL®. *Centramate screen channel ultrafiltration cartridge*

La structure particulière de ces cassettes (Figure 40) est conçue pour reproduire des cheminements liquides et une géométrie des canaux identiques à ceux des cassettes utilisées en production industrielle. Ceci nécessite d'avoir de part et d'autre du canal une membrane et les séparateurs sont identiques à ceux contenus dans les cassettes industrielles.

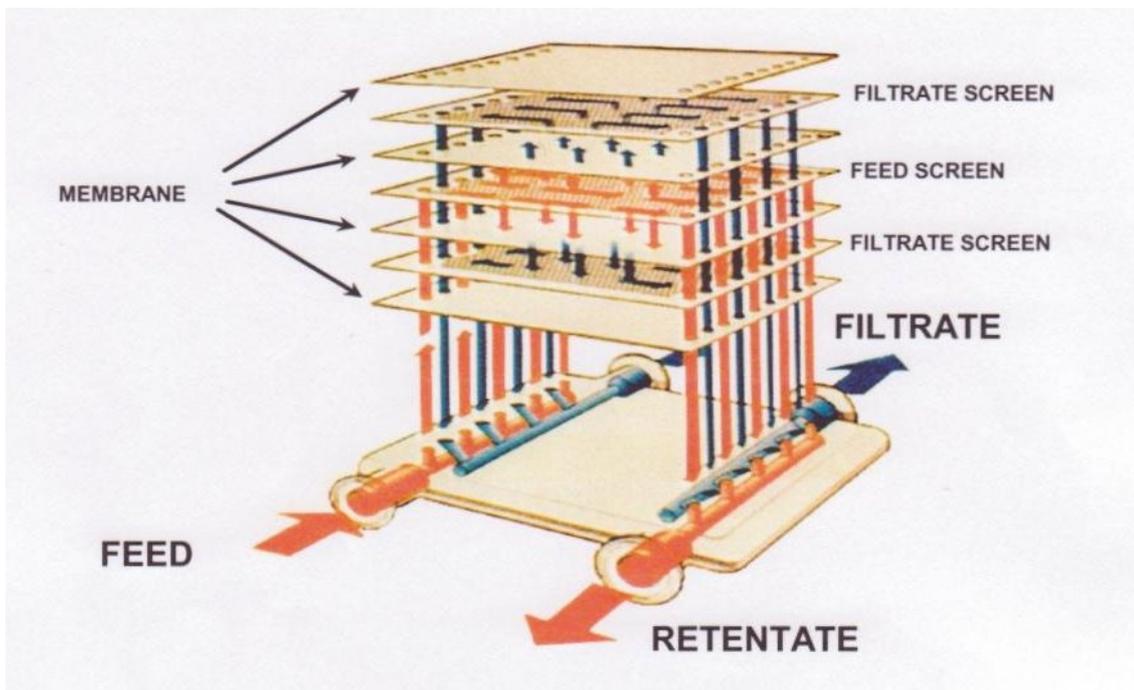


Figure 40 : Structure de la cassette OMEGA Centramate Screen Channel PALL®. *Omega centramate screen channel cartridge structure*

5.1.2.2. Normalisation des données

Le système utilisé dans notre étude ne permet pas une régulation de la température. La loi de Darcy (Équation 11) indique que le débit est inversement proportionnel à la viscosité du fluide. La Figure 41 montre que la température va influencer sur la viscosité de ce dernier (le cas de l'eau est ici présenté). Aussi, il est nécessaire, de façon à pouvoir comparer les données recueillies lors de cette étape, de normaliser les données à une certaine température à l'aide d'un facteur de correction défini à partir de la loi de Darcy (Tableau XV).

$$J = \frac{B.PTM}{\eta.e} \quad \text{Équation 11}$$

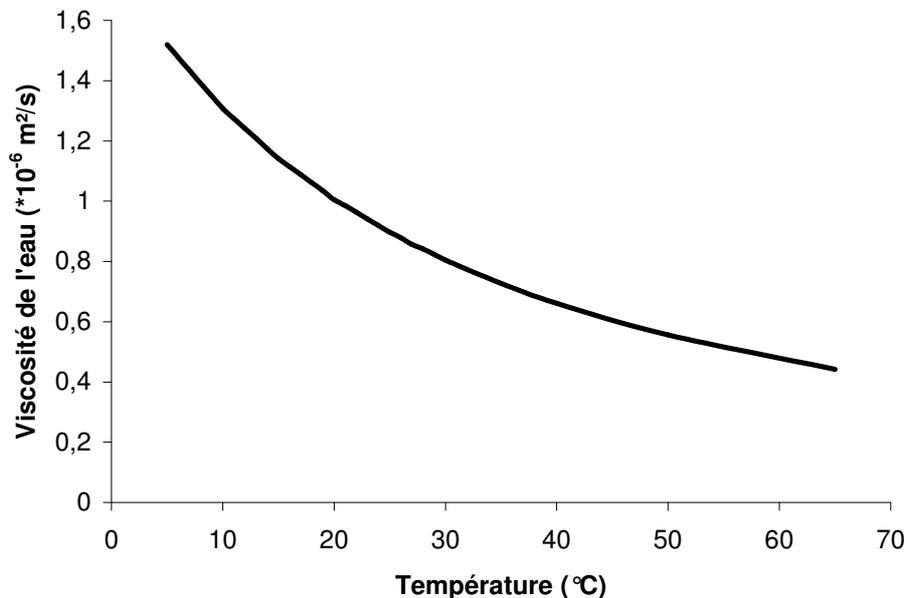


Figure 41 : Variation de la viscosité de l'eau en fonction de la température. Water viscosity variation according temperature

Tableau XV : Facteurs de Correction de la Température à appliquer pour normaliser les valeurs à 20°C (FCT_{20°C}). Temperature correction factors in order to data normalisation

Température	FCT _{20°C}						
11	1,271	21	0,978	31	0,781	41	0,641
12	1,235	22	0,955	32	0,765	42	0,629
13	1,202	23	0,933	33	0,749	43	0,618
14	1,169	24	0,911	34	0,734	44	0,607
15	1,139	25	0,89	35	0,719	45	0,596
16	1,109	26	0,871	36	0,705	46	0,586
17	1,081	27	0,851	37	0,692	47	0,576
18	1,053	28	0,833	38	0,678	48	0,566
19	1,027	29	0,815	39	0,665	49	0,556
20	1,000	30	0,798	40	0,653	50	0,547

5.1.2.3. Nettoyage de la cassette

Le nettoyage des membranes est une étape cruciale dans les procédés de séparation à membrane. Sans un nettoyage efficace, les propriétés de la membrane changent, diminuant ainsi les performances du procédé.

Pour des membranes en PES, plusieurs solutions de nettoyage peuvent être utilisées. Les caractéristiques de ces solutions de nettoyage sont résumées dans le Tableau XVI.

Tableau XVI : Caractéristiques des solutions de nettoyage pour des membranes en PES. *Cleaning solutions for PES membranes*

Solution de nettoyage	Mode d'action	Agents colmatants
Alcalins	Hydrolyse, pH, solubilisation, saponification	Biomolécules, graisses, protéines, amidon
Acides	Solubilisation	Sels minéraux
Oxydants	Oxydation, dégradation	Biomolécules, protéines, polysaccharides
Surfactants	Mouillage, émulsification, suspension, dispersion, solubilisation	Biomolécules, graisses, huiles, protéines, peptides
Solvants	Solubilisation, dissolution	Huiles, graisses, protéines, biomolécules
Enzymes	Hydrolyse enzymatique	protéines

Toutes ces solutions de nettoyages ne seront pas testées. Les solutions de nettoyage de la membrane ont été choisies en fonction de la nature des agents colmatants (contenus dans le produit) et les solutions utilisées ont été scrupuleusement choisies de façon à respecter les éventuelles applications des fractions résultantes de la filtration (agroalimentaire, nutraceutique...). Ainsi, seules des solutions de nettoyage alcalines (couplées ou non à un oxydant), acides et un surfactant ont été utilisées. Les conditions préconisées pour ces solutions sont reportées dans le Tableau XVII.

Lors de la première utilisation d'une cassette, ou après un essai, le processus de nettoyage est le suivant :

Avant l'ajout de la solution de nettoyage alcaline, le système est rincé avec un peu de perméat ou avec de l'eau milliQ de façon à éliminer une bonne partie des contaminants ou les agents de conservation. La solution de nettoyage est ensuite introduite dans la cuve, les sorties perméat et rétentat sont raccordées à l'égout. La pompe est démarrée progressivement jusqu'à ce qu'il y ait un écoulement par les deux sorties. En bridant la vanne de rétentat, une pression

de 0,3 à 1,0 bar est appliquée. La solution circule ainsi jusqu'à ce que toutes les bulles d'air du perméat aient disparu. La vanne de rétentat est de nouveau ouverte ; le perméat est fermé. Le débit de recirculation doit alors être compris entre 180 et 240 mL/min. La solution doit ainsi circuler pendant environ 1 min. Vanne de perméat ouverte, une contre-pression est effectuée à l'aide de la bride de rétentat de façon à ce que le débit du rétentat atteigne environ 10% du débit d'alimentation. La pression d'alimentation doit être comprise entre 1,6 et 2,8 bars. La solution de nettoyage circule ainsi pendant 30 à 120 min en fonction des différents essais et solutions de nettoyage.

Le système est ensuite rincé minutieusement avec de l'eau milliQ avant l'ajout éventuel d'une solution de nettoyage acide. Au moins 800 mL d'eau milliQ doivent recirculer dans le système.

Concernant le nettoyage acide, le processus est le même mais le temps de contact est généralement plus court.

Après rinçage, le système est prêt pour réaliser des essais.

Tableau XVII : Conditions requises pour le nettoyage de la membrane d'ultrafiltration. *Cleaning conditions for ultrafiltration membranes*

	Type	Agents colmatants	Conditions
Acide	Acide nitrique	Minéraux	0,1 N, 35 - 45°C, pH 1
	Acide phosphorique	Minéraux, acides organiques	0,1 N, 35 - 45°C, pH 1
	Acide citrique	Fer	1%, 35 - 45°C, pH 1
Alcalin	Hydroxyde de sodium (NaOH) Ultrasil 11 Ultrasil 25	Protéines, enzymes, vaccins, virus, lysats et cellules bactériennes, polysaccharides, colloïdes organiques, pyrogènes, lipides	0,1 - 0,5 N, 35 - 45°C, pH>13
	Solution alcaline avec hypochlorite de sodium ou hydroperoxyde	Fort colmatage sur les agents colmatants ci-dessus, lysats et cellules bactériennes	0,3 - 0,5 N NaOH + 200-400 ppm NaOCl, 25-45°C, pH>12
Surfactant	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Triton X100, Tween 80	Lysats et cellules bactériennes, lipides, graisses, anti-mousses, polysaccharides, protéines précipitées	0,1%, 35 - 45°C, pH 4-9

5.1.2.4. Détermination de la perméabilité à l'eau

Dans le but de connaître le comportement à l'eau de la membrane et de pouvoir évaluer l'efficacité des nettoyages, la perméabilité de la membrane va être déterminée (Équation 12). La première perméabilité de la membrane, déterminée avant la première utilisation est appelée perméabilité initiale. Elle sera utilisée en tant que valeur de référence pour déterminer le taux de régénération de la membrane, c'est-à-dire l'efficacité du nettoyage pour retrouver l'état initial (Équation 13).

$$\text{Perméabilité à l'eau} = \frac{\text{Flux de perméat}}{\text{PTM}} \quad \text{Équation 12}$$

$$\text{Taux de régénération} = \frac{\text{Perméabilité à l'eau après UF}}{\text{Perméabilité initiale}} \quad \text{Équation 13}$$

La perméabilité à l'eau est déterminée en portant sur un graphe le débit de perméat à l'eau à différentes pressions transmembranaires (en faisant varier la vitesse de rotation de la pompe).

5.1.2.5. Détermination des conditions de filtration

L'objectif de cette étape est de déterminer les conditions (PTM, flux de recirculation) les plus rentables (performances de l'UF liées à la demande énergétique) afin de se placer dans les conditions préconisées par un cahier des charges industriel.

La cuve d'alimentation est remplie avec la solution à filtrer. Le débit de recirculation est mesuré en fermant la vanne de perméat pour une vitesse de pompe donnée. Les pressions d'entrée et de sortie, le débit de rétentat et la température sont relevés lorsque le régime est stable. Le débit de recirculation doit être compris entre 100 et 160 mL/min. La perte de charge enregistrée est directement proportionnelle à la vitesse de circulation du fluide (Équation 14). Aussi, pour les essais en filtration, le débit de recirculation voulu est indiqué par la PdC affichée.

$$PdC = \frac{\lambda \cdot v^2}{2 \cdot g \cdot D} \cdot L \quad \text{Équation 14}$$

Cette étape est réalisée rétentat bridé et perméat ouvert, tous deux en recirculation dans la cuve d'alimentation. Pour une PdC donnée, les comportements de filtration pour différentes

PTM vont être étudiés. Le système est entièrement nettoyé entre deux mesures de façon à toujours se placer dans des conditions initiales.

5.1.2.6. Diafiltration/concentration

Ces deux étapes sont réalisées à la suite l'une de l'autre. Deux tests seront effectués :

- Diafiltration puis concentration
- Concentration puis diafiltration

Lors de la diafiltration, les diavolumes d'eau sont ajoutés en continu grâce à la mise en place d'un système de pompage sous vide. Le volume de perméat récupéré est compensé par le même volume d'eau en continu.

Après avoir réalisé des tests succincts les facteurs de diafiltration et de réduction volumique (FRV) ont été définis, à savoir :

- 4 diavolumes d'eau seront ajoutés
- $FRV = 3$

5.2. Traitement des effluents de la chaîne de production de surimi

5.2.1. Equipement

5.2.1.1. *Le module*

Le module de filtration utilisé dans cette étude est le module Rayflow[®] 100 (Rhodia Orelis, Miribel, France). c'est un module plan à membranes organiques spécialement étudié pour les essais de faisabilité sur des faibles quantités de produit. Les références du pilote utilisé sont consignées dans le Tableau XVIII. Le support utilisé est en méthacrylate.

Tableau XVIII : Caractéristiques du pilote Rayflow® 100 fournies par le fabricant. *Rayflow® 100 characteristics*

Surface membranaire utile	2 x 100 cm ²
Pression de fonctionnement	0 à 3 bars
Débits de circulation	0 à 700 L/h
Epaisseur de la veine liquide	0,5 à 1,5 mm
Vitesse linéaire moyenne	1,7 m/s pour 250 L/h et joint 0,5 mm 3.5 m/s pour 500 L/h et joint 1,5 mm
Température de travail maxi	50°C (20°C à 4 bars)
Température d'autoclavage	121°C
Volume interne du module :	
Compartiment rétentat	2 x 22 mL
Compartiment perméat	2 x 8 mL

La Figure 42 est une photographie du module de filtration utilisé. Le montage de ce système est expliqué plus précisément sur la Figure 43.

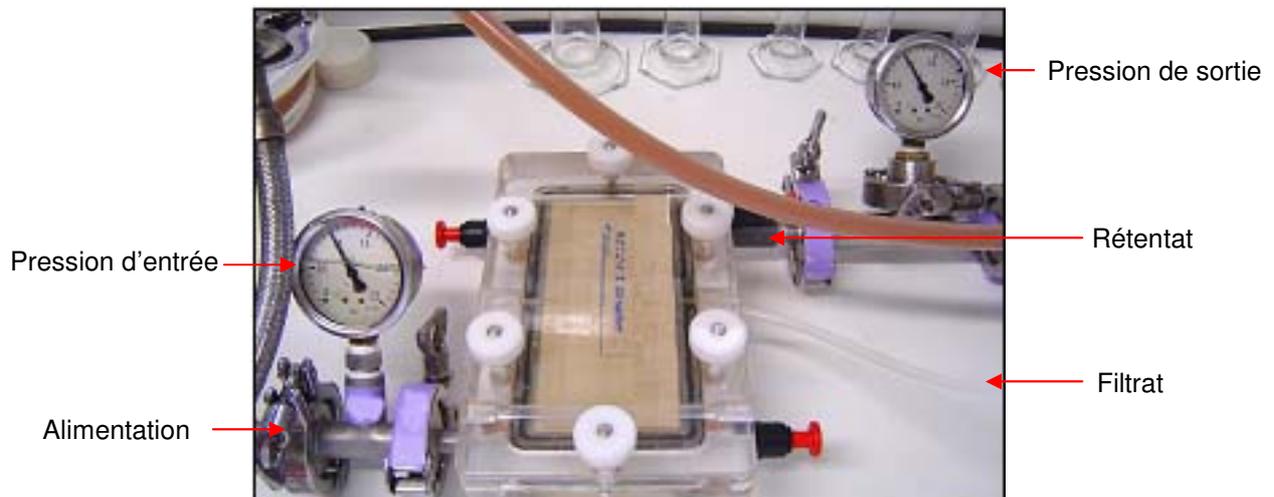


Figure 42 : Installation du module Rayflow® 100. *Rayflow® 100 installation*

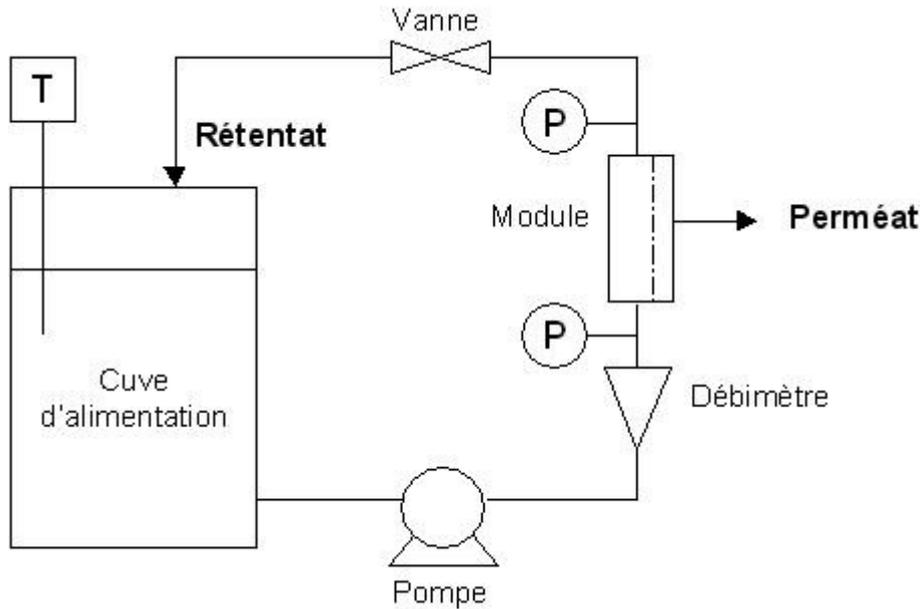


Figure 43 : Schéma de fonctionnement du système Rayflow® 100 (T : sonde de température, P : capteur de pression). *Rayflow® 100 operating scheme*

5.2.1.2. Les membranes

Plusieurs membranes de matériaux et de seuils de coupure différents ont été utilisées, leurs caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau XIX.

Tableau XIX : Caractéristiques des membranes utilisées pour la filtration des co-produits liquides. *Membranes characteristics used for liquid by-products filtration*

Caractéristiques	Membranes								
	Iris 3028				Iris 3038	Iris 3042	Iris 3050	Iris 3065	RC 70 PP
Géométrie	-----Plane-----								
Surface (m ²)	-----0,01-----								
Matériau	-----PES-----		-----PAN-----				PVDF		RC
Seuil de coupure (kDa)	3	10	40	100	40	50	50	40	10
Température maximale	-----50°C-----								60°C
Gamme de pH	-----3 à 14-----		-----3 à 10-----						1 à 11.5
Fournisseur	-----Rhodia Orelis-----								Alfa Laval Naskov

PES: PolyEther Sulfone ; PAN: PolyAcridoNitrile, la membrane de référence 3042 est anionique alors que celle de référence 3050 est cationique ; PVDF : PolyVinyliDeneFluoride ; RC : Regenerated Cellulose (acétate de cellulose régénérée)

5.2.1.3. Protocole de nettoyage des membranes

Un débit à l'eau ultra pure est systématiquement réalisé avant et après une opération d'ultrafiltration ou de nettoyage chimique pour s'assurer que la membrane retrouve son débit initial. La mesure du débit à l'eau pure est effectuée à 15°C, à une pression transmembranaire moyenne de 1 bar.

La procédure de nettoyage chimique, conduite à une pression de 0,5 bar à 50°C, comporte deux étapes : une solution alcaline de soude (NaOH), 40°C, 0,4 g/L, 20 min puis une solution d'acide nitrique (HNO₃), 40°C, 1 g/L, 20 min.

Un rinçage à l'eau pure est effectué après chaque étape (eau perdue).

5.2.1.4. Protocole d'évaluation des effets de l'adsorption sur les différents matériaux des membranes et seuils de coupure

Après avoir mesuré le flux à l'eau de référence (J₀) des membranes neuves chacune d'elle est mise en contact statique (pendant 20h à 15°C) dans un bêcher de 500ml avec l'eau de lavage S2. Après la phase d'adsorption les membranes sont ensuite insérées dans le module et le flux à l'eau (J_a) est mesuré à T=15°C, et PTM =1 bar.

Une fois cette mesure effectuée le flux de perméation est déterminé au bout de 5h de filtration du surnageant S2 (le perméat est redirigé vers la cuve d'alimentation).

5.2.1.5. Solubilisation de la matière solide contenue dans le culot C1 par hydrolyse enzymatique

Le culot C1 récupéré lors de la phase d'écémage représente une part non négligeable de la charge de l'eau de lavage. L'hydrolyse enzymatique de ce culot va permettre de solubiliser une partie de la matière qui pourra ensuite être traitée par ultrafiltration selon les conditions déterminées précédemment.

Dans un réacteur thermostaté de 2L, 700 g de culot et 700 mL d'eau sont mélangés et amenés à 60°C. Lorsque la température est atteinte et que le pH atteint 6,5, 14 g de Papaïne (soit 2% E/S) et 175 mg de cystéine (catalyseur) sont ajoutés. La papaïne est ici utilisée du fait de son utilisation classique dans les processus de fabrication d'hydrolysats de protéines marines et du fait de son coût restreint. L'hydrolyse est conduite à pH constant (par ajout de soude 1 M) et à température constante durant 2h. Après inactivation de l'enzyme, l'hydrolysats est centrifugé, comme précédemment, à 4000 g, 20°C pendant 30 min. Le surnageant S3 sera ensuite soumis à une phase d'ultrafiltration.

6. ANALYSES BIOCHIMIQUES

6.1. Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau des échantillons est déterminée par pesée après lyophilisation. Par ce biais, toute l'eau n'est pas extraite de l'échantillon. Cependant, la lyophilisation s'est avérée indispensable pour notre étude et la non destruction des échantillons en utilisant ce procédé s'est révélée être un atout majeur, les quantités d'échantillon parfois obtenues étant très faibles. De plus, la détermination de la teneur en eau a été réalisée de façon identique tout au long de l'étude, permettant ainsi une comparaison des échantillons entre eux.

6.2. Analyse des lipides

6.2.1. Extraction des lipides

Les lipides sont extraits selon la méthode de Folch (Folch *et al.* - 1957). Cette technique repose sur le principe d'extraction à froid des lipides par un mélange de solvants méthanol/chloroforme (1/2, v/v). L'addition d'une solution aqueuse de NaCl à 0,9% (p/v) favorise l'obtention d'un système biphasique. Les extractions sont réalisées 3 fois. Un mélange de solvants est utilisé afin d'extraire la totalité des lipides, des lipides les plus polaires au moins polaires.

Les échantillons secs (correspondant aux fractions lyophilisées) doivent être préalablement réhydratés avant extraction. La teneur en eau des co-produits de sardine avoisinant 80%, 4 volumes d'eau sont ajoutés aux extraits secs.

Pour tous les échantillons (secs et humides), 6,66 volumes de méthanol, solvant polaire, sont ajoutés au système pour une homogénéisation pendant 30 min. Puis, 13,33 volumes de chloroforme, solvant apolaire, sont ajoutés et le mélange est mis sous agitation pendant 30 min également. A ce stade, les lipides sont majoritairement passés en solution. Par filtration sur verre fritté, les composés solides non lipidiques et non solubilisés dans le mélange de solvant sont éliminés. Chaque perméat est versé dans une ampoule à décanter et dans laquelle est ajoutée 0,2 volume d'eau salée (0,9% NaCl ; p/v). Les ampoules à décanter sont ensuite placées à + 4 °C à l'abri de la lumière pendant une nuit.

La phase organique (phase inférieure) contient les lipides neutres (LN), les glycolipides (GL) et les phospholipides (PL) tandis que la phase aqueuse (phase supérieure) contient les

gangliosides (Gg), les lipides très ionisés et les autres composés solubles non lipidiques (protéines, sucres, sels...). A l'interface se trouvent majoritairement des protéines.

La phase organique est récupérée dans un ballon taré puis évaporée à l'évaporateur rotatif (Rotavapor Heidolph 94200 Bioblock Scientific – Pompe Ilmvac commercialisé par Avantec) puis sous azote pour éliminer toute trace de solvant ; la phase aqueuse et l'interface sont quant à elles éliminées. Après évaporation totale du solvant, les lipides sont repris dans un certain volume de chloroforme en fonction de la masse obtenue pour les conserver. Ils sont ensuite stockés à l'abri de la lumière à - 80 °C.

6.2.2. Fractionnement des lipides en chromatographie liquide

Les lipides totaux sont fractionnés en différentes classes en fonction de leur polarité par chromatographie solide/liquide sur colonne ouverte. Cette méthode est basée sur la différence de degré d'adsorption de composés lipidiques sur des phases mobiles et fixes. Dans le cas présent, les composés lipidiques vont réagir différemment en fonction de la polarité du solvant d'élution. Cette technique est une extraction en phase solide, appelée également Solid Phase Extraction (SPE).

Dans une colonne (diamètre interne : 8-10 mm ; longueur : 20 cm) contenant de la laine de verre est introduite de la silice activée (une nuit à 100°C). La quantité de silice introduite est calculée de façon à ce que le rapport silice / extrait lipidique soit de 30/1. Le gel de silice est introduit dans la colonne à l'aide de chloroforme. Ce gel est ensuite drainé avec une faible quantité de chloroforme afin de le rincer et de stabiliser la colonne. Le solvant récupéré lors de cette étape est jeté. L'extrait lipidique est ensuite introduit dans la colonne en utilisant le chloroforme comme éluant. Différents éluants sont ensuite introduits dans la colonne en générant ainsi un gradient de polarité négatif (du plus polaire au moins polaire). Les fractions correspondant à l'élution de ces solvants sont ensuite récupérées et quantifiées par évaporation du solvant. Les fractions sont ensuite conservées dans un volume connu de chloroforme et stockées à -80°C. Les solvants, les classes de lipides associées et les volumes utilisés sont consignés dans le Tableau XX.

Tableau XX : Solvants utilisés en fonction des classes de lipides en chromatographie liquide sur colonne ouverte. Solvents used for lipid class fractionation

Classe de lipide	Solvant	Ratio solvant / extrait lipidique (mL/mg)
Lipides neutres (LN)	Chloroforme	1
Glycolipides (GL)	Acétone / méthanol (9/1, v/v)	1,5
Phospholipides (PL)	Méthanol	1

6.2.3. Dosage des Phospholipides

Le dosage des phospholipides est basé sur une méthode colorimétrique (Stewart - 1980). Le réactif, composé de chlorure de fer III et de thiocyanate d'ammonium, va se complexer avec le phosphore contenu dans les phospholipides et donner une coloration plus ou moins intense suivant la quantité de phosphore présente dans l'échantillon. Les quantités de phospholipides sont calculées en fonction d'une gamme étalon établie avec de la phosphatidylcholine (PC, Avanti polar lipid, AL, USA) et sont donc exprimées en équivalent PC (Figure 44).

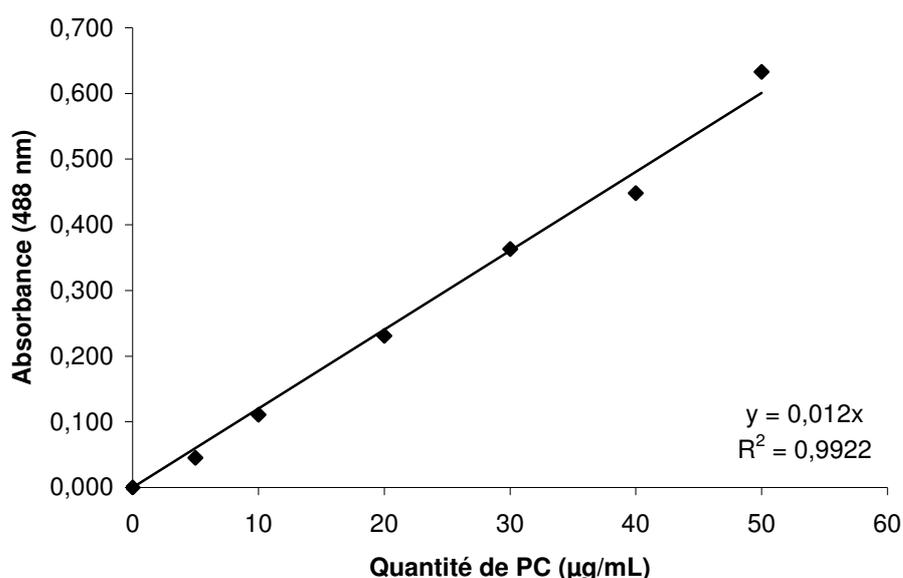


Figure 44 : Courbe étalon du dosage des PL par la méthode au ferrothiocyanate d'ammonium. Calibration curve for phospholipid assay

Deux millilitres de chloroforme et 1 mL de réactif au ferrothiocyanate d'ammonium sont ajoutés à l'extrait lipidique sec (la quantité est estimée de façon à entrer dans la gamme). Après agitation au vortex jusqu'à l'obtention d'une émulsion complète, les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 750 g (Centrifugeuse Hettich Rotanta) afin de séparer les deux

phases. La phase inférieure est récupérée et la densité optique est mesurée à 488 nm au spectrophotomètre (UNICAM UV/VIS Spectrometer UV 2).

6.2.4. Analyse des classes de lipides par CCM-FID

L'analyse des classes de lipides sur chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CCM-FID, ou en anglais TLC-FID) a été réalisée en partenariat avec le Centre technologique des produits aquatiques du Ministère des pêches et de l'aquaculture du Québec.

Chaque classe de lipides est déterminée par migration de l'extrait lipidique sur de la silice, selon des solvants de polarité différente, suivie d'une détection par ionisation de flamme. La méthode est adaptée des méthodes décrites par Parrish et Ackman *et al.* (Parrish - 1987; Ackman *et al.* - 1990). En fait, la technique TLC-FID est semblable à la chromatographie sur couche mince où la plaque de silice utilisée est remplacée par une série de dix rodes de quartz enrobées de silice du nom commercial de Chromarodes-SIII[®] montées sur un support métallique.

L'échantillon, soit 1 µl de concentration inférieure à 25 mg d'huile/ml, est déposé sur une chromarode puis séché au-dessus d'une plaque chauffante à basse température pendant deux minutes. Les chromarodes sont déposées par la suite dans une chambre de migration de 15 x 19 cm. Il est à noter qu'un papier buvard est ajouté dans la chambre de migration pour favoriser sa saturation en vapeur de solvant. Dans le protocole utilisé, un volume de 70 ml des mélanges de solvants appropriés selon les classes de lipides à doser est ajouté à chaque chambre. Ainsi, la migration se produit sur les chromarodes suivant les mêmes principes que la chromatographie sur couche mince.

La détermination des classes de lipides se fait en trois migrations successives. La première chromatographie consiste à déterminer des hydrocarbures (HC), les esters de stérols et de cires (SE-WE) ainsi que les cétones (KET). La migration se produit à l'aide d'un mélange de diéthyl éther et d'hexane (1/99 ; v/v). Une première étape consiste à déposer les chromarodes dans la chambre de migration pendant 25 min suivi d'un séchage de 2 min et d'une deuxième migration de 15 min dans le même mélange.

La deuxième chromatographie permet de séparer les triglycérides (TAG), les acides gras libres (FFA), les diglycérides (DAG) ainsi que les stérols (ST). Le solvant utilisé est un

mélange d'acide acétique, de diéthyl éther et d'hexane (0,21/21,00/78,79 ; v/v/v). La durée de cette migration est de 30 min.

La troisième migration isole les lipides polaires mobiles dans l'acétone (Acetone-mobil polar lipids, AMPL) tels que les pigments et les monoglycérides (MAG) ainsi que les phospholipides (PL) par un mélange d'eau, de méthanol et de chloroforme (2,85/40,00/57,15 ; v/v/v). Le développement chromatographique est de 30 min.

À l'aide du détecteur FID, les rodes sont brûlées à 80% de leur longueur pour le premier et deuxième développements puis à 100% pour le dernier. Il est à préciser que l'appareil débute sa lecture des chromarodes sur la partie opposée à celle où l'échantillon a été déposé permettant ainsi de conserver les composés qui n'ont pas migré pour poursuivre l'analyse par la suite.

Le Iatroscan MK-6[®] est un appareil qui permet de déterminer la quantité des composés séparés selon les aires des pics enregistrées grâce au détecteur FID qui est couplé à une interface et le logiciel Peak 2000[®].

La quantification des classes de lipides est effectuée en comparaison à des courbes standard d'étalons externes. Les composés utilisés sont représentatifs de la famille du composé à identifier. La gamme d'étalons utilisée se situe entre 0,25 et 2,5 mg/mL.

Le Tableau XXI regroupe les différentes classes de lipides analysables par ce procédé, ainsi que les standards utilisés pour chaque calibration.

Tableau XXI : Classes de lipides, abréviations et standards utilisés pour la CCM-FID des extraits lipidiques. *Lipid classes, abbreviations and standards used in TLC-FID*

Classes de lipides	Abréviation	Standard utilisé
Hydrocarbure aliphatique	HC	Nonadécane
Ester de stérol et cires	SE-WE	Cholestéryl palmitate
Cétone	KET	Hexadécane
Tri-acyl glycéride	TAG	Tripalmitin
Acide gras libre	FFA	Acide palmitique
Stérol	ST	Cholestérol
Di-acyl glycéride et alcool	DG	Dipalmitin-1,3
Lipides polaires mobiles dans l'acétone	AMPL	Monopalmitoyl- <i>rac</i> -glycérol
Phospholipides	PL	Phosphatidylcholine

6.2.5. Analyse des acides gras par CPG-FID et CPG-SM

6.2.5.1. Dérivation des acides gras

Pour être analysés en chromatographie en phase gazeuse, les acides gras doivent être dérivés. Plusieurs dérivations sont possibles, différant selon le type de résidu greffé sur la fonction ester de l'acide gras. Ces transformations vont nécessiter des coûts, des installations, des durées de préparation et d'analyse différents. Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont aisés à préparer et à analyser, et possèdent de plus l'avantage de pouvoir être analysés avec plusieurs types de détection. Plusieurs méthodes de méthylation peuvent être employées (trifluorure de bore (BF_3), acide ou basique) (Christie - 1989). La méthode au BF_3 est la plus employée dans les laboratoires mais des méthanolyses plus douces permettent une méthylation simultanée de toutes les classes de lipides sans altérer les groupements fonctionnels potentiels des acides gras (ramifications, groupements hydroxy, cycles...).

La méthode de dérivation utilisée ici est une méthylation par le méthanol sulfurique. Nous utiliserons un standard interne, l'acide margarique (C17 :0, Sigma, France) afin de s'affranchir des pertes occasionnées pendant la dérivation et l'injection. Environ 300 μg de lipides totaux auxquels et 16 μg de standard interne vont être séchés sous azote puis 5 mL d'une solution de méthanol anhydre contenant 2% d'acide sulfurique concentré seront ajoutés et les tubes fermés hermétiquement. Après une nuit à + 50°C, 1 mL d'eau distillée puis 2 mL d'hexane seront ajoutés. Le système est alors biphasique. Après agitation du mélange et décantation, la phase hexanique (phase supérieure) sera prélevée pour être injectée en CPG.

6.2.5.2. Analyse des esters méthyliques d'acides gras par CPG

Nous utiliserons dans le cadre de ce travail la détection à ionisation de flamme (FID) et la détection en spectrométrie de masse (MS).

6.2.5.2.1. CPG-FID

La méthode la plus répandue de détection des acides gras et la détection à ionisation de flamme. En fin de colonne, une flamme obtenue par combustion d'un mélange d'hydrogène et d'air reconstitué va ioniser les composés organiques. Ces ions ainsi formés seront collectés par deux électrodes créant ainsi une différence de potentiel. Il en résulte un courant électrique recueilli par un électromètre qui le transforme en tension mesurable. Pour les composés organiques, l'intensité du signal est sensible au débit massique de l'échantillon. L'aire du pic reflète donc la masse du composé élué (Rouessac et Rouessac - 1997). Cette détection

possède donc l'avantage d'être quantitative mais l'identification est basée sur le temps de rétention de chaque composé. Un travail récent réalisé dans le laboratoire a permis la l'identification et la quantification de 45 acides gras (Dumay - 2003)

L'appareillage utilisé est un chromatographe Auto System Gas Chromatography (Perkin Elmer, France). Le système d'injection est un système à large volume d'injection fonctionnant en split/splitless (ouverture de vanne : système PSSI). Avec cet équipement, les volumes injectés peuvent varier de 0,1 à 50 μL suivant les seringues utilisées. Cette souplesse d'injection possède l'atout majeur de permettre de modifier les quantités injectées sans avoir recours à la dilution ou à la concentration des échantillons. Les échantillons sont ainsi injectés dans une chambre de mélange thermostatée à 55°C. Cette chambre est sous la forme d'un liner de longueur 8,5 cm et de diamètre interne de 2 mm comprenant de la laine de verre sylanisée pour permettre l'homogénéisation de l'échantillon lors de sa vaporisation et avant son entrée dans la colonne.

La colonne est une colonne capillaire très polaire (BPX 70, SGE) de 60 m de long et avec un diamètre interne de 0,25 mm. La phase stationnaire est composée de cyanopropylsiloxane modifié à 70% (épaisseur 0,25 μm). Le gaz vecteur circulant à l'intérieur de la colonne est l'hélium et la pression en tête de colonne est de 1,72 bar. La température du détecteur placé en sortie de colonne est de 300°C et reste fixe pendant toute la durée de l'élution. Le détecteur est relié à un système d'acquisition et de traitement du signal (Galaxie, Varian, CA, USA). Les gradients de température réalisés au cours de la chromatographie d'une durée de 60 min sont reportés dans le Tableau XXII.

Tableau XXII : Programmation des températures pour la CPG-FID. FID-GC temperature program

	Température (°C)	Temps (min)
Injecteur	55	0,00
	55	2,00
	350	3,48
	350	11,48
	70	11,48
	70	60,00
	Four	50
50		2,00
150		7,00
230		53,33
70		53,33
70		60,00

Les profils chromatographiques sont traités à l'aide du logiciel Galaxie dans lequel sont calibrés 45 acides gras standard rencontrés fréquemment dans les matrices marines. De cette façon, les quantités d'acides gras pourront être déterminées par rapport à la quantité totale d'acides gras présents, par rapport à l'extrait lipidique ou à la matière première.

6.2.5.2.2. CPG-SM

La détection par spectrométrie de masse permet quand à elle une identification certaine des composés en identifiant la nature des ions des composés. Aussi, il convient d'analyser plusieurs échantillons d'une série en spectrométrie de masse de façon à s'assurer de l'identité des acides gras. Les EMAGs peuvent-être directement injectés et analysés. La méthode d'analyse des EMAGs par couplage CPG-SM a été optimisée au sein du laboratoire (Dubois - 2005).

Après élution en CPG, le composé entré dans le spectromètre de masse va être vaporisé puis bombardé et accéléré par un faisceau d'électrons produits par un filament incandescent (ionisation). Durant cette étape, les molécules vont se briser en différents fragments parmi lesquels se trouvent des ions positifs dont l'analyse donnera le spectre de masse caractéristique de la molécule. Ces derniers sont ensuite transmis dans la partie analyseur du spectromètre qui les séparera en fonction de leur rapport masse/charge par l'application et le balayage d'un champ magnétique ou électrique. L'ensemble est enfin dirigé vers le détecteur qui est constitué d'un collecteur d'ions et d'un ensemble électronique de mesure et d'amplification des signaux associés aux ions de différentes masses. Durant l'analyse, le vide est maintenu de 10^{-4} à 10^{-6} Pa dans les parties de la source, de l'analyseur et du détecteur. Ce vide est indispensable pour que les ions produits par la source ne subissent aucune collision avec des molécules résiduelles durant leur parcours (ce qui aurait pour conséquence de modifier leur trajectoire ou de changer leur masse moléculaire). Le système informatique relié au détecteur va assurer le traitement des données et un spectre de masse pour chaque composé est obtenu. Un chromatogramme représentant le courant ionique total de l'échantillon injecté pourra également être disponible. Cependant, la différence des colonnes utilisées ne permettra pas de comparaison directe entre le chromatogramme obtenu en FID et celui obtenu en SM. La Figure 45 schématise l'acquisition des données pour les deux modes de détection.

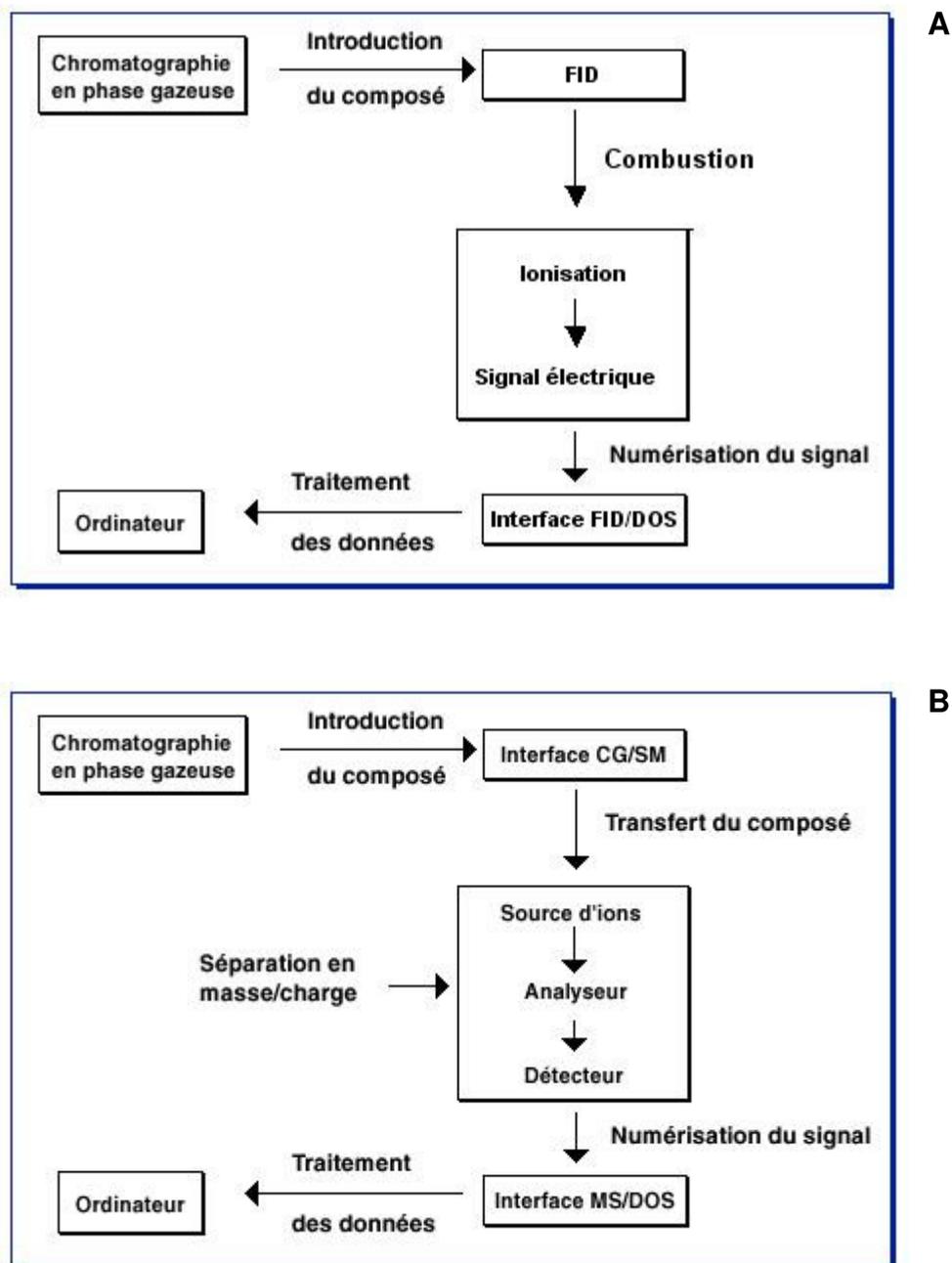


Figure 45 : Comparaison des modes de détection FID (A) et SM (B) de la chromatographie en phase gazeuse. *Comparison between FID (A) and MS (mass spectrometry)(B) detection*

L'appareillage utilisé est un chromatographe Agilent 6890 series II (Agilent, CA, USA).

Le système d'injection est un système similaire à celui utilisé pour la CPG-FID. Seules les caractéristiques du liner sont différentes à savoir une longueur de 3 mm et un diamètre interne de 2 mm. La colonne est reliée à la chambre d'injection par une pré-colonne de 5 m de longueur et 0,32 mm de diamètre interne. La température de l'injecteur est maintenue constante à 250°C.

La colonne est une colonne capillaire apolaire (CPSil 5 CB, low bleed, Varian, CA, USA) de 60 m de long avec un diamètre interne de 0,25 mm. La phase stationnaire est composée de silicone (épaisseur 0,25 µm). Le gaz vecteur utilisé est également l'hélium et la vitesse de circulation de ce gaz est maintenue constante à 1,5 mL/min avec une pression en tête de colonne de 1,86 bar. La température du four varie de 140 à 270°C avec un gradient de 2,2°C/min. Le temps d'analyse d'un échantillon est de 60 min.

Le spectromètre de masse est un appareil Agilent 5973 series network mass selective detector (Agilent, CA, USA). L'acquisition et le traitement des données sont réalisés par le logiciel Agilent 5973 MS/TOP Enhanced (Agilent, CA, USA).

6.3. Analyse des protéides

6.3.1. Dosage des protéines totales

Les protéines totales sont estimées à partir du taux d'azote total dosé par minéralisation selon la méthode de Kjeldhal (Crooke et Simpson - 1971).

Si les protéines sont attaquées par H₂SO₄ en présence d'un catalyseur convenable (K₂SO₄/CuSO₄, 5/2 ; p/p), l'azote protéique est intégralement transformé en sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) puis est par la suite libéré sous forme d'ammoniac par l'action de NaOH concentré (10 M). L'ammoniac fixé par l'acide borique est ensuite dosé par HCl 1 M.

Le pourcentage d'azote est donné par la relation :

$$\%N = (1,4 \times V \times [HCl]) / M \quad \text{Équation 15}$$

Où V est le volume de HCl versé

[HCl] la concentration en HCl

M la masse d'échantillon introduite dans les tubes

Le taux de protéines brutes est déterminé en multipliant la quantité d'azote par le facteur 6,25, facteur utilisé pour la conversion de l'azote en protéine dans le muscle de poisson.

Environ 1 g de matière sèche (MS), ou 10 g de matière fraîche (MF), est introduite dans des tubes prévus à cet effet. Une pastille de minéralisation et 20 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans les tubes. Puis les tubes coiffés de leurs capteurs de fumée sont mis à chauffer progressivement jusqu'à 450°C. Lorsque la solution est devenue vert pâle, la

minéralisation est arrêtée. Après refroidissement des tubes, les capteurs de fumée sont rincés avec de l'eau milliQ récupérée dans les tubes. Le contenu des tubes est mis en suspension avec 20 mL d'eau milliQ, puis installé dans l'unité de distillation.

Dans un erlenmeyer de 250 mL, 20 mL de solution d'acide borique 3% contenant un indicateur coloré sont versés. L'erlenmeyer est également installé dans l'unité de distillation en prenant bien soin à ce que la tige plonge dans la solution.

La solution est neutralisée avec de la soude 10 M de façon à avoir un volume total de 80 mL. La solution est alors entraînée à la vapeur. Lorsque le volume de distillat atteint les 150 mL, la distillation est arrêtée et la titration de l'azote par l'acide chlorhydrique est alors réalisée. Le volume ajouté est noté V (en mL).

6.3.2. Dosage des protéines solubles

Les protéines solubles sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford - 1976). Ce dosage est basé sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. Ce réactif, rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et par conséquent possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique très sensible. C'est une méthode sensible et rapide. Elle est aussi assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes de dosage des protéines. Son principal défaut est sa réactivité très différente face à diverses protéines. L'albumine sérique bovine (ou BSA) a la particularité de réagir très fort avec le bleu de Coomassie, pouvant ainsi donner des valeurs plus hautes que la réalité. Cependant, la BSA s'avère être une protéine peu chère et facile d'utilisation (bonne solubilité). Ce test est utilisé dans le but de comparer les échantillons entre eux. Nous utiliserons donc la BSA pour établir la gamme étalon et les résultats sont exprimés en g de protéine eq BSA/ g de matière.

Les échantillons à doser sont mis en suspension (s'il s'agit d'échantillons lyophilisés) dans des tubes Eppendorf puis centrifugés à 10 000 rpm pendant 10 min de façon à faire précipiter les éléments insolubles. Les surnageants sont ensuite dilués de façon à entrer dans la gamme. Dans chaque puits de la micro-plaque, 160 µL d'échantillons sont introduits puis 40 µL de réactif Biorad (Sigma, France). Le système est laissé à température ambiante pendant 5 min, puis l'absorbance de chaque puits est lue au spectrophotomètre à 595 nm. Tous les essais sont réalisés en triple. La gamme étalon de BSA va de 0,5 à 10 µg/mL. La

gamme étalon est réalisée pour chaque micro-plaque. La Figure 46 présente un exemple de courbe obtenue par cette méthode.

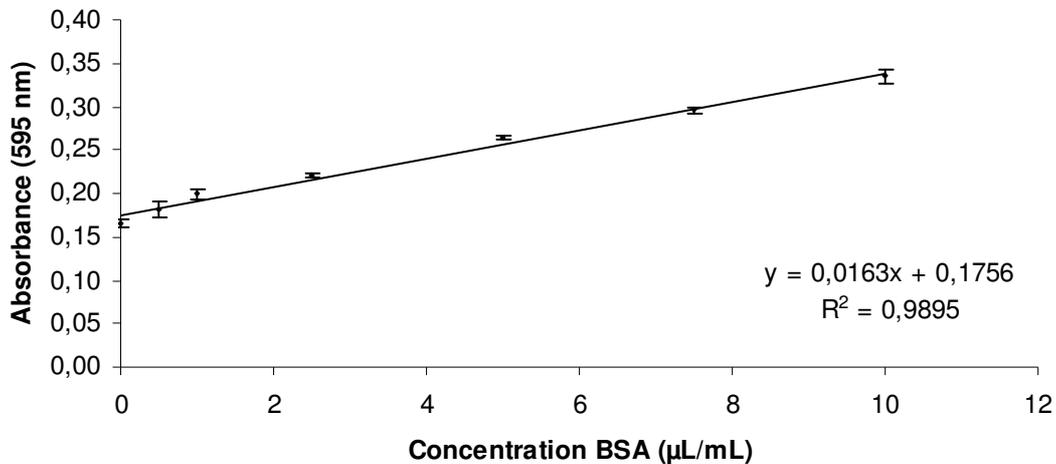


Figure 46 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Bradford. *Calibration curve for Bradford protein assay*

6.3.3. Analyse des poids moléculaires des peptides solubles par FPLC

La distribution des poids moléculaires des peptides contenus dans les fractions solubles est déterminée par filtration sur gel (colonnes Pharmacia Superdex). La matrice de la colonne est composée d'un gel poreux réticulé d'agarose et de dextran. La colonne Superdex 75 HR possède un domaine de fractionnement allant de 3000 à 70000 Da et les standards utilisés sont les suivants : Albumine (67000 Da); Ovalbumine (43000 Da); Chymotrypsinogène A (25000 Da); Ribonucléase (13700 Da). Cette colonne a été utilisée pour le fractionnement des peptides issus des hydrolyses longues durées. La colonne Superdex peptide possède quant à elle un domaine de fractionnement compris entre 0 et 7000 Da. Cette colonne a été utilisée pour le fractionnement des peptides issus de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine.

Ces colonnes sont montées sur un système de chromatographie FPLC[®] (Fast Protein Liquid Chromatography) commercialisé par Amersham Pharmacia Biotech. L'échantillon (200 µL) est élué par une phase mobile constituée d'un tampon NaOH 50 mM contenant 5% d'acétonitrile et 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Le débit d'élution est de 0,5 mL/min et les composés sont détectés par une lecture de la densité optique à 214 nm. Les données sont ensuite collectées grâce au logiciel Diamir (JMBS software).

RESULTATS ET DISCUSSION

1. OBTENTION DES CO-PRODUITS DE SARDINE GENERES PAR LE PROCEDE DE FABRICATION DE SURIMI BASE

Les co-produits utilisés lors de cette étude proviennent de la transformation de la sardine en surimi base. Le surimi est un concentré de protéines myofibrillaires de goût et d'odeur relativement neutres. Grâce à sa teneur élevée en protéines et sa faible teneur en glucides et lipides, le surimi est un ingrédient qui présente un réel intérêt sur le plan nutritionnel et diététique. Le surimi est un produit alimentaire intermédiaire (PAI), utilisé comme ingrédient de base dans la fabrication de très nombreux produits tels que les analogues de produits de la mer : coquille Saint-Jacques, crabes, bâtonnets de poisson...(Eymard - 2003).

Ce chapitre a pour objectif d'établir un bilan massique des différents effluents, produits et co-produits issus de la chaîne de transformation de la sardine en surimi base puis de caractériser d'un point de vue biochimique les co-produits utilisés tout le long de cette étude. Les résultats obtenus lors de cette étape serviront de référence pour comparer l'efficacité des procédés développés au cours de l'étude.

By-products used studied in this work originated from sardine transformation in surimi base product. Surimi is composed of myofibrillar proteins devoid of strong taste and smell. Due to its high protein content and its low fat and carbohydrate contents, surimi is an ingredient of interest in nutrition and dietetic fields. Surimi is an intermediate food product (IFP) used as a base ingredient in the manufacturing of numerous sea products analogues (scallop, crab, fish stick...) (Eymard - 2003).

The purpose of this step was to establish the mass balance of the different effluents, products and by-products obtained from the sardine transformation process in surimi base. By-products are then biochemically characterized. Results obtained at this step will be used as a reference allowing a useful comparison between the efficiency of the processes developed during this work.

1.1. Bilan massique de la chaîne de transformation

La chaîne pilote de fabrication de surimi base est développée au centre Ifremer de Nantes en collaboration avec la société EuroSeafood Trading (Hayange-Marspich, France).

La Figure 47 schématise les différentes étapes unitaires du procédé de fabrication. Les co-produits solides (en rouge) sont récupérés après les étapes de filetage (têtes et viscères), de pulpage (peaux et arêtes) et de raffinage (déchets résiduels). Les co-produits liquides (en bleu) sont quant à eux récupérés après les étapes d'essorage (L1) et de décantation centrifuge (L2).

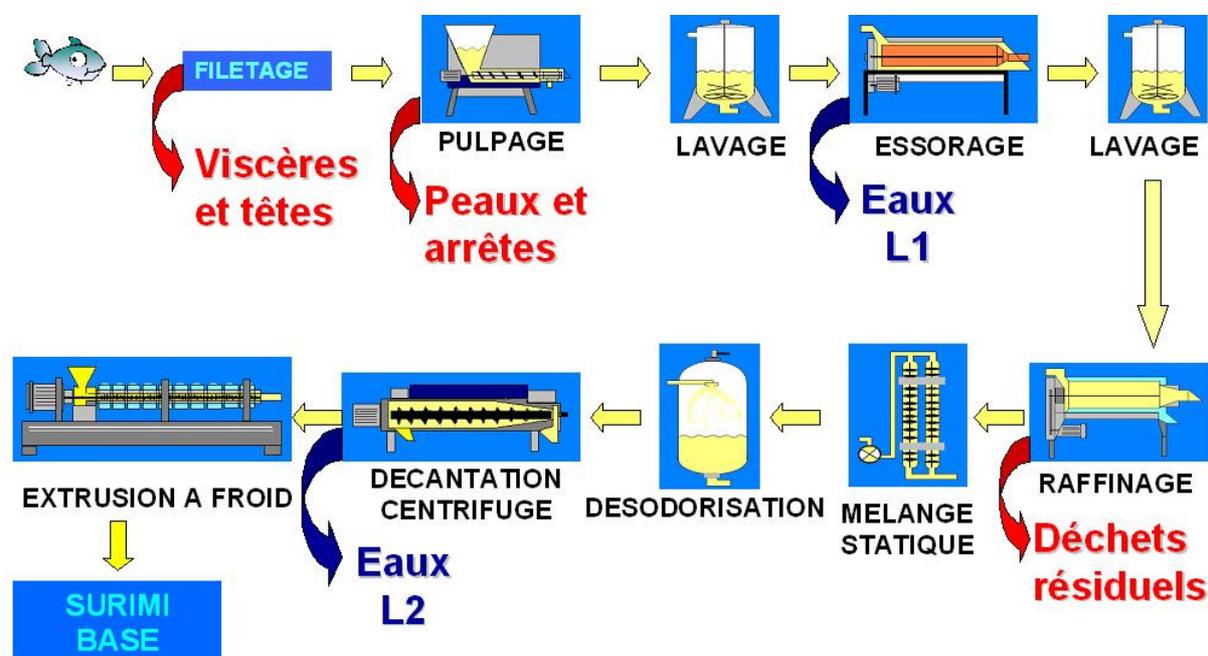


Figure 47 : Schéma des étapes unitaires de la chaîne pilote de fabrication du surimi mis en place par Ifremer et Euro Seafood Trading (Eymard - 2003) et visualisation des sorties des co-produits solides (en rouge) et liquides (en bleu) générés par ce procédé. *Sardine transformation process in surimi and visualization of by-products generated (red and blue arrows)*

Ces différents co-produits générés par la chaîne de transformation sont alors quantifiés. Le Tableau XXIII recense les différentes sorties des fractions solides générées par ce procédé.

Tableau XXIII : Bilan matière de la chaîne de production de surimi : matière première, co-produits et produit fini. *Weight balance of surimi production line : raw material, by-products and final product*

	Poids (kg)	Rendement par rapport au poisson entier (% en masse)
Sardine entière	45,6	-
Filets	30,6	67
Têtes	9,2	20
Viscères	5,8	13
		100
Peaux et arêtes	0,7	2
Déchets résiduels	2,6	6
Surimi base	8,0	18

Au cours des différents lavages, de l'eau du réseau est introduite dans le procédé. Lors des essais, aucun appareil de mesure n'était disponible pour mesurer les flux d'eau entrant

dans le procédé. C'est pourquoi un bilan massique global ne peut être réalisé. Nous parlerons alors de rendement massique à partir de la matière première (sardines entières).

Les quantités d'effluents obtenus après les deux étapes de lavage (appelées L1 et L2) sont respectivement de 19 kg et 98 kg et possèdent une charge totale (protéines, lipides et cendres) de 60,5 g/L pour L1 (soit 1,13 kg de matière) et 12,5 g/L pour L2 (1,22 kg de matière). Les effluents obtenus seront traités par ultrafiltration dans la dernière partie de ce travail. Cependant, la fraction L2 possède une si faible charge (98,75% d'eau) qu'elle ne sera pas prise en compte pour l'étude. C'est la raison pour laquelle seule la fraction L1 sera traitée par UF afin de réduire la charge polluante de l'effluent tout en récupérant des composés d'intérêt.

Les différents co-produits sélectionnés pour l'étude sont ensuite caractérisés (têtes et viscères de sardine et eau de lavage L1).

1.2. Caractérisation biochimique des matrices étudiées

1.2.1. Les co-produits solides : les têtes et les viscères de sardine

1.2.1.1. Protéines, lipides et cendres

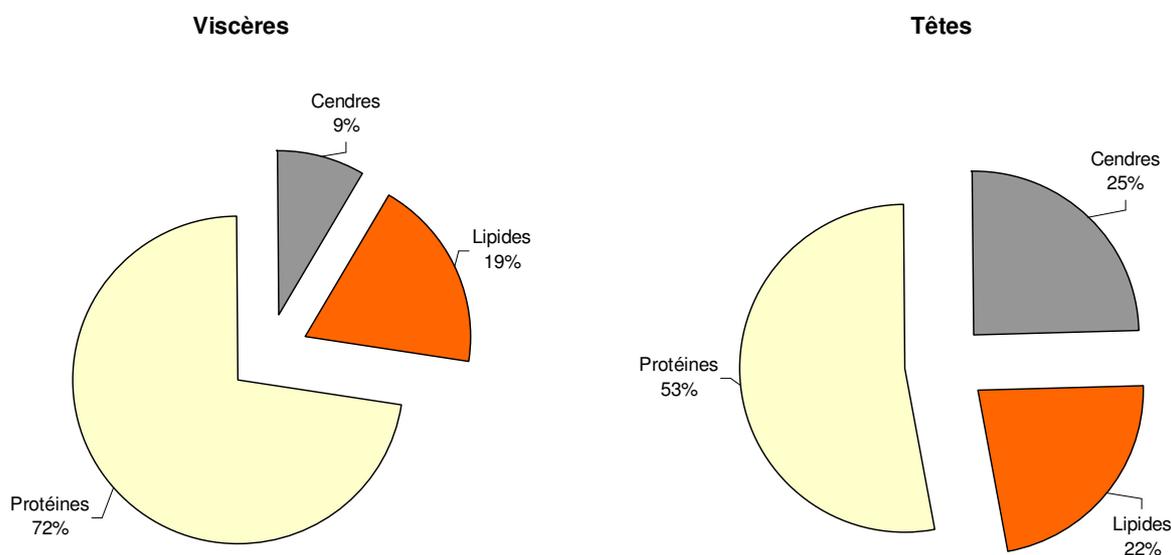


Figure 48 : Distribution des lipides, protéines et cendres dans les viscères et les têtes de sardine. *Lipid, peptide and ash distribution in sardine viscera and heads*

La Figure 48 représente la distribution en eau, lipides, cendres et protéines des viscères et têtes de sardine. A l'instar de la plupart des matrices vivantes, les viscères et têtes de sardine sont composées de environ 80% d'eau (78% pour les viscères et 75% pour les têtes). Les deux matrices ont une composition biochimique différente. Les protéines sont la classe biochimique la plus importante mais les proportions retrouvées dans les matrices sont différentes : 72% dans les viscères et 53% dans les têtes. Les lipides représentent environ 20% de la matière sèche des deux co-produits. Etant donné l'importance accordée aux lipides dans cette étude, une analyse plus fine des lipides est donnée plus loin. Enfin, les cendres représentent de 9% (viscères) à 25% (têtes) de la matière sèche.

1.2.1.2. Analyse des lipides

1.2.1.2.1. Lipides totaux

Les quantités de lipides retrouvées dans les co-produits par rapport à la matière sèche et à la matière fraîche sont données dans le Tableau XXIV. Ces valeurs, notamment celles obtenues par rapport à la matière sèche, serviront de référence pour toute la suite de l'étude, ces valeurs étant définies comme les quantités de lipides obtenues après extraction traditionnelle réalisée selon la méthode de Folch (par solvant).

Tableau XXIV : Teneur en lipides des viscères et têtes de sardine par rapport à la matière fraîche et à la matière sèche. *Lipid content in sardine viscera and heads according to raw and dry matter*

	quantité de lipides en g pour 100 g	
	de matière fraîche	de matière sèche
Viscères	4,1 ± 0,1	18,3 ± 0,3
Têtes	5,8 ± 0,2	22,9 ± 0,8

Une vingtaine d'acides gras ont été identifiés dans les lipides totaux des têtes et des viscères de sardine (Tableau XXV). Les acides gras saturés constituent la plus importante classe d'acides gras (plus de 40%) pour les deux matrices. Ils sont représentés par les acides myristique (C14 :0), palmitique (C16 :0) et stéarique (C18 :0). Les têtes de sardines possèdent une proportion en acide myristique beaucoup plus importante que les viscères. Les compositions en acides gras insaturés sont différentes en fonction du co-produit étudié.

Tableau XXV : Composition moyenne en acides gras des viscères et têtes de sardine (%). Fatty acids composition of sardine viscera and heads

Acides gras	Têtes	Viscères
C14:0	8,9 ± 0,3	3,7 ± 0,1
C16:0	25,8 ± 1,6	30,4 ± 0,9
C18:0	6,2 ± 0,4	6,4 ± 0,2
Σ AGS	40,8 ± 2,1	40,6 ± 1,2
C16:1 c ω7	5,5 ± 0,2	3,3 ± 0,0
C18:1 c ω12	1,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1
C18:1 c ω9	9,1 ± 0,4	7,1 ± 0,0
C18:1 c ω7	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,0
C20:1 c ω9	5,0 ± 0,1	2,3 ± 0,0
C22:1 c ω9	5,2 ± 0,7	1,9 ± 0,0
C24:1 c ω9	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,0
Σ AGMI	30,8 ± 0,8	20,5 ± 0,2
C16:2 c ω4	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0
C18:2 c ω6	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,0
C18:3 c ω4	1,1 ± 0,0	1,3 ± 0,0
C18:3 c ω3	0,5 ± 0,	- -
C22:3 c ω3	- -	1,4 ± 0,2
C20:3 c ω3	0,6 ± 0,0	0,9 ± 0,0
C18:4 c ω3	5,1 ± 1,2	2,5 ± 0,3
C20:4 c ω3	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,0
C20:5 c ω3	8,4 ± 1,1	11,1 ± 0,1
C22:5 c ω3	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,0
C22:6 c ω3	9,6 ± 2,2	17,5 ± 0,6
Σ AGPI	28,4 ± 2,8	39,0 ± 0,9

En ce qui concerne les têtes de sardine, les acides AGMI et les AGPI sont présents en quantité similaire (30,8% d'AGMI et 28,4% d'AGPI). Les acides gras de la famille des ω9 représentent la plus forte part des AGMI (67%) avec notamment l'acide oléique (C18 :1ω9), l'acide gadoléïque (C20 :1ω9) et l'acide érucique (C22 :1ω9). Les acides gras de la famille des ω3 représentent à eux seuls 25,6% des acides gras totaux, soit près de 90% des AGPI. Les ω3 sont représentés majoritairement par les acides gras d'intérêt EPA et DHA, avec respectivement 8,4% et 9,6% des acides gras totaux.

Concernant les viscères de sardine, les AGPI (~ 39%) sont présents en quantité deux fois plus importante que les AGMI (~ 20%). A la différence des résultats obtenus pour les têtes, peu d'AGMI C20 :1ω9 et C22 :1ω9 sont présents dans les viscères. Les acides ω3

représentent ~ 36% des acides gras totaux des viscères de sardine mais représentent toujours 90% des AGPI. L'EPA représente à lui seul 17,5% des acides gras totaux et le DHA, 11,1%.

1.2.1.2.2. Lipides neutres, glycolipides et phospholipides

Les lipides totaux sont constitués de trois classes principales : les lipides neutres (LN), les glycolipides (GL) et les phospholipides (PL). Sur la Figure 49 est reportée la répartition de ces trois classes de lipides dans les lipides totaux des co-produits étudiés.

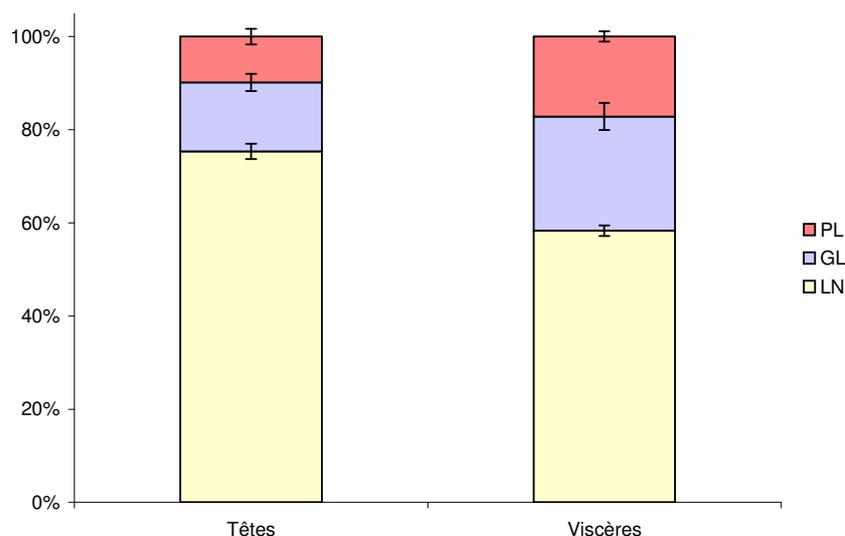


Figure 49 : Répartition des classes de lipides dans les co-produits de sardine. *Lipid class distribution in sardine by-products*

La composition en LN, GL et PL des deux matrices étudiées sont différentes, malgré la dominance des lipides neutres (56,5 ± 5,9% des lipides totaux pour les viscères et 75,4 ± 1,7% pour les têtes). Cependant, les quantités relatives restantes en glycolipides et phospholipides sont similaires (le reste des lipides *i.e.* GL +PL) à savoir 60% de GL et 40% de PL.

Enfin, du fait de leurs voies de valorisation potentielle, comme détaillé dans la première partie de ce travail (cf. p62), un intérêt particulier sera porté aux phospholipides, qui représentent 16,6 ± 1,1% pour les viscères et 9,8 ± 1,7% pour les têtes.

Dans cette optique, les acides gras des phospholipides des deux matrices ont été étudiés (Tableau XXVI). Les profils en acides gras des phospholipides des têtes et viscères de sardine sont différents. Alors que la différence principale entre les profils des lipides totaux résidait dans la proportions d'acides gras insaturés, la différence pour les phospholipides se situe entre

les proportions d'acides gras saturés et poly-insaturés. Les AGS sont majoritaires dans les deux matrices, mais les viscères possèdent plus de 10% d'AGS en plus par rapport aux têtes, au détriment des AGPI (~ 30% pour les têtes par rapport à ~20% pour les viscères).

Tableau XXVI : Composition moyenne en acides gras des phospholipides des viscères et têtes de sardine (%). Phospholipid fatty acid composition of sardine viscera and heads

Acides gras	Têtes	Viscères
C14:0	1,8 ± 0,1	4,6 ± 0,3
C16:0	31,6 ± 1,7	39,4 ± 0,6
C18:0	11,7 ± 0,6	12,4 ± 0,6
Σ AGS	45,1 ± 2,4	56,4 ± 1,0
C16:1 c ω7	2,7 ± 0,2	4,2 ± 0,1
C18:1 c ω12	1,0 ± 0,1	5,4 ± 0,3
C18:1 c ω9	14,9 ± 1,7	3,6 ± 0,4
C18:1 c ω7	2,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2
C22:1 c ω9	0,3 ± 0,3	- -
C24 :1 c ω9	3,1 ± 0,2	8,4 ± 0,1
Σ AGMI	24,7 ± 1,5	22,2 ± 0,3
C16 :2 c ω4	- -	2,4 ± 0,1
C18:2 c ω6	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,2
C18:3 c ω3	0,3 ± 0,3	0,9 ± 0,1
C22:3 c ω3	0,7 ± 0,4	1,6 ± 0,1
C20:3 c ω3	1,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
C18:4 c ω3	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,0
C22:4 c ω6	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2
C20:5 c ω3	5,5 ± 0,1	4,3 ± 0,2
C22:5 c ω3	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2
C22:6 c ω3	18,5 ± 1,1	8,1 ± 0,4
Σ AGPI	30,3 ± 1,0	21,5 ± 0,6

Dans les phospholipides de têtes de sardine, les acides palmitique et stéarique représentent la quasi-totalité des acides gras saturés (96%). Comme pour les acides gras présents dans les lipides totaux, les AGMI les plus fréquemment rencontrés appartiennent à la famille des ω9 (près de 75% des AGMI). Enfin, les AGPI représentent environ un tiers des acides gras des phospholipides de têtes de sardine. Les acides gras ω3 sont les AGPI majoritaires (28,4% des acides gras totaux, soit environ 94% des AGPI). Cette dominance des ω3 est essentiellement due à la forte teneur en DHA (18,5% des acides gras totaux, soit 65% des acides gras de la famille des ω3). L'EPA est le deuxième AGPI majoritaire, mais en quantité bien moindre (4,5% des AG totaux).

Dans les phospholipides de viscères de sardine, les AGS sont largement majoritaires avec plus de 56% des AG totaux. L'acide palmitique est une fois de plus l'acide gras le plus important (39,4% des AG totaux). L'acide stéarique est le second acide gras le plus important. Concernant les AGMI, les acides gras $\omega 9$ ne représentent plus que 54% de cette classe d'acides gras, malgré la forte présence de l'acide nervonique (C24 :1 c $\omega 9$). Les AGPI sont les acides gras les moins présents dans les phospholipides de viscères de sardine (21,5% des AG totaux). Cependant, les acides gras $\omega 3$, même s'ils ne représentent que 16,9% des acides gras totaux, participent à plus de 78% de la composition des AGPI. Dans cette classe d'acides gras, le DHA est majoritaire (8,1% des AGT), suivi par l'EPA (4,3% des AG totaux).

L'étude des acides gras des lipides neutres des deux co-produits n'est pas détaillée ici car leur distribution est quasi-identique à celle des lipides totaux (Tableau XXV).

1.2.2. Les effluents de la chaîne de production

La fraction L1 est l'unique effluent utilisé pour l'étude, l'eau de lavage L2 étant peu chargée en protéines, lipides et cendres. La charge lipidique de cette fraction L1 est importante ($13,7 \pm 0,1\%$ par rapport à la matière sèche). Il est alors nécessaire de réaliser une étape de centrifugation sur cette fraction pour minimiser les risques de colmatage. Cette étape permet de plus de récupérer une fraction huileuse qui pourra être valorisée séparément. Ainsi, la teneur en lipides de la fraction L1 passe de 13,7% par rapport à la matière sèche à 4,8% après centrifugation (dans S2, Figure 50). La teneur en eau de la fraction S2 est de 96%. L'eau de lavage centrifugée S2 est composée en grande majorité de protéines (83%), les cendres représentent 13% de la matière sèche et enfin, les lipides, après centrifugation, représentent 4% de la matière sèche.

Le culot C1 est obtenu à partir de l'écémage de 25 L d'eau L1 (Figure 32). Ce culot correspond à 12% de la charge totale de l'eau L1. L'eau représente 74% de la matière totale. La forte teneur en protéines contenues dans le culot (73% de la matière sèche) justifie la recherche de voies de valorisation de ces composés. En effet, les protéines contenues dans cette fraction solide sont essentiellement des protéines insolubles ou complexées (avec des lipides par exemple). Une hydrolyse enzymatique de cette fraction pourrait ainsi permettre la libération de la partie protéique qui pourra ensuite être récupérée par techniques de filtration. Les autres fractions biochimiques sont présentes en plus faibles quantités : 4% de lipides et 23% de cendres.

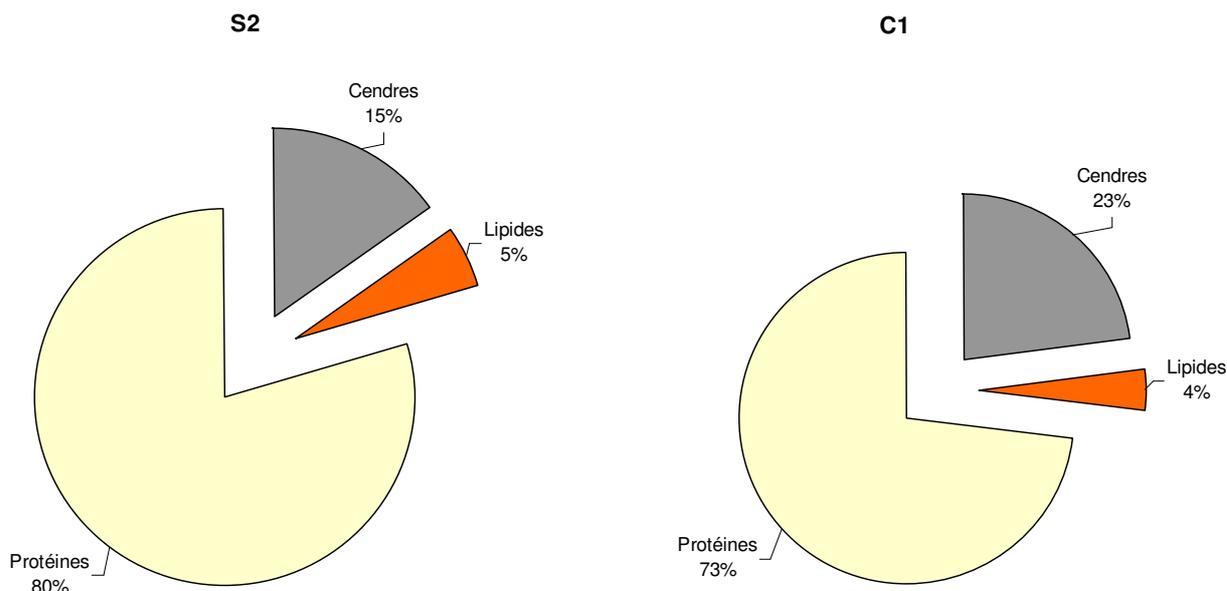


Figure 50 : Distribution de la charge en lipides, protéines et cendres dans l'eau de lavage S2 et dans le culot C1 issus de la chaîne de fabrication de surimi de sardine. *Lipid, protein and ash content in the washing water S2 and in the sludge C1 from surimi production*

1.3. Discussion

L'objectif de cette partie consistait à caractériser les matrices qui seront étudiées tout au long de ce travail.

Le bilan effectué sur la chaîne de transformation des sardines en surimi base nous a permis de sélectionner les matrices les plus abondantes pour la suite du travail. Ainsi, les co-produits solides obtenus dès le début de ce procédé (têtes et viscères) seront récupérés pour être valorisés. **Par ce choix, 33% de la matière première et plus de 80% des co-produits solides vont être étudiés. Les effluents de cette chaîne de transformation seront soumis aux techniques de séparation membranaire afin de réduire leur charge polluante tout en récupérant des composés d'intérêt (essentiellement des protéines).** Cependant, les autres co-produits solides (peaux et arêtes et déchets résiduels) restent une matière première intéressante et l'étude de leur valorisation pourrait être envisagée dans le cadre d'un travail ultérieur.

La caractérisation des têtes et viscères de sardine a permis de dresser un profil biochimique des matrices. A notre connaissance, aucune étude antérieure n'a porté sur la

caractérisation biochimique des co-produits de sardine, rendant ainsi difficile toute comparaison de nos résultats. Cependant, les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par différents auteurs sur la composition des filets de sardine (Beltrán et Moral - 1991; Esquível *et al.* - 1997; Tanakol *et al.* - 1999; Caponio *et al.* - 2004; De Leonardis et Macciola - 2004). La principale différence dans la composition biochimique de ces deux matrices est la teneur en cendres. Cette différence est due à la présence dans les têtes de tissus osseux et cartilagineux, quasiment absents dans les viscères.

La richesse en protéines de ces deux co-produits en font deux candidats intéressants pour l'hydrolyse enzymatique à l'aide de protéases. Les travaux portant sur les hydrolysats de sardine (cf. partie bibliographique) permettent de se tourner vers l'utilisation de ces enzymes pour obtenir une fraction peptidique intéressante (Quaglia et Orban - 1987b; Quaglia et Orban - 1990; Ravallec-Plé - 2000; Rousseau *et al.* - 2001; Ravallec-Plé *et al.* - 2001; Bordenave *et al.* - 2002; Kajimoto *et al.* - 2005a; Kajimoto *et al.* - 2005b). **Les têtes et les viscères de sardine sont également riches en lipides, fractions potentiellement intéressantes notamment du fait de leurs compositions en acides gras.** En effet, les acides gras de la famille des ω_3 , dont les intérêts ont également largement été décrits dans la littérature (Weisinger *et al.* - 2001; Mahadik *et al.* - 2001; Larsson *et al.* - 2004; Bergé et Barnathan - 2005; Bourre - 2005; Bassaganya-Riera et Hontecillas - 2006; Jacobson - 2006; Kris-Etherton *et al.* - 2006; Reiffel et McDonald - 2006; Brouwer *et al.* - 2006; Maroon et Bost - 2006; Cattaneo *et al.* - 2006; Kim et Mendis - 2006...) y sont représentés en grandes quantités (plus de 25% des acides gras présents dans les lipides totaux). Peu de références bibliographiques portent sur la caractérisation des acides gras des co-produits de sardine, néanmoins, les données trouvées dans la littérature sur la composition en acides gras des filets de sardine (Beltrán et Moral - 1991; Esquível *et al.* - 1997; Tanakol *et al.* - 1999; Caponio *et al.* - 2004; De Leonardis et Macciola - 2004) sont en accord avec les résultats présentés ici.

Les viscères sont des matrices relativement pauvres en lipides de réserve (essentiellement des LN). En effet, la sardine est considérée comme étant un poisson gras. La différence entre les poissons maigres et les poissons gras est la localisation des lipides de réserve. Les appellations « gras » et « maigre » sont données en fonction de la teneur en graisses des filets (partie destinée à la nutrition humaine). Ainsi, les poissons dits maigres (merlu, cabillaud, églefin, raie...) sont des poissons contenant moins de 5% de lipides dans les filets. Les lipides de réserve sont principalement logés dans un organe de stockage : le foie.

Dans le cas des poissons gras, les lipides sont stockés dans la partie sous-cutanée et dans le muscle. Ainsi, les poissons dits gras posséderont une teneur en lipides de l'ordre de 15% dans le muscle (sardine, maquereau, saumon, truite...). Les foies, et par extension les viscères dans le cas des petits poissons comme la sardine (où foies et viscères ne peuvent être dissociés), seront ainsi moins riches en lipides de réserve.

Les phospholipides, même présents en faible quantité, représentent tout de même un gisement important de molécules d'intérêt qui méritent une attention particulière. Les acides gras présents dans ces phospholipides sont également intéressants, essentiellement pour les têtes (qui possèdent une importante quantité d'acides gras $\omega 3$). De plus, bien que la composition en acides gras soit différente suivant les deux matrices, une corrélation qualitative peut être faite avec les acides gras trouvés dans la fraction phospholipidique des filets de sardine (De Leonardis et Macciola - 2004).

Compte tenu de leur forte richesse en protéines, le traitement des eaux de lavage est essentiellement dirigé vers la valorisation des protéines. Ainsi, un travail complémentaire de filtration membranaire est réalisé. L'objectif de ce travail est de valoriser la fraction protéique contenue dans les effluents générés par la chaîne de fabrication du surimi.

Ainsi, ces valeurs obtenues dans cette partie, qui pour les lipides ont été obtenues de façon chimique, permettront de pouvoir effectuer des comparaisons avec les quantités obtenues avec les procédés développés dans la suite de ce mémoire. Ces valeurs renseignent sur la nature des composés introduits dans de tels procédés de transformation.

The goal of this part was the characterization of the matrixes used during this work.

*The mass balance realized on the production line of sardine into surimi base has enabled to select the most abundant by-products, which will be used for the other parts of the present work. So, solid by-products obtained in the beginning of the process (heads and viscera) will be taken in view of their up-grading. **By this way, 33% of the raw material and more than 80% of the total solid by-products will be studied. Effluents coming from this line will be filtered through ultrafiltration membranes in order to minimize their polluting load and, in the same time , to obtain valuable products (essentially proteins).** Moreover, other solid by-products (skin and bones and residual waste) are also a valuable matter and their up-grading could be considered in a further study.*

The characterization of sardine's heads and viscera has enabled to establish their biochemical profile. To our knowledge, there is no studies about the biochemical composition of sardine by-product, with which our results could be compared. However, our results are similar than those obtained by several authors on the biochemical composition of sardine filet (Beltrán et Moral - 1991; Esquível et al. - 1997; Tanakol et al. - 1999; Caponio et al. - 2004; De Leonardis et Macciola - 2004). The main difference between the two by-products is their ash contents, due to the presence of bones and cartilage in sardine heads, which are not present in viscera.

Selected by-products are protein rich matrixes and it could be interesting to hydrolyse them with proteases. Results already reported in the literature (see the Bibliography part) suggest that hydrolysis of our by-products could conduct to an interesting peptidic fraction (Quaglia et Orban - 1987b; Quaglia et Orban - 1990; Ravallec-Plé - 2000; Rousseau et al. - 2001; Ravallec-Plé et al. - 2001; Bordenave et al. - 2002; Kajimoto et al. - 2005a; Kajimoto et al. - 2005b). ***Sardine's heads and viscera are also rich in lipids, which are potentially interesting due to their ω 3 fatty acid contents.*** Indeed, those fatty acids, with their specific activities largely mentioned in the literature (Weisinger et al. - 2001; Mahadik et al. - 2001; Larsson et al. - 2004; Bergé et Barnathan - 2005; Bourre - 2005; Bassaganya-Riera et Hontecillas - 2006; Jacobson - 2006; Kris-Etherton et al. - 2006; Reiffel et McDonald - 2006; Brouwer et al. - 2006; Maroon et Bost - 2006; Cattaneo et al. - 2006; Kim et Mendis - 2006...), are present in high amounts (more than 25% of the total fatty acids) in sardine by-products. Few studies have been performed on sardine by-products fatty acid composition. However, sardine filet fatty acid composition mentioned in the literature are in accordance with results presented here (Beltrán et Moral - 1991; Esquível et al. - 1997; Tanakol et al. - 1999; FAO fisheries departement - 2004; Caponio et al. - 2004; De Leonardis et Macciola - 2004).

Viscera have relatively low storage lipids (such as neutral lipids). Indeed, sardine is considered as a fatty fish. The difference between fatty and lean fish is the localization of the stock lipids and the lipid content in the muscle. In lean fish (hake, cod, haddock, ray...) , muscles contains less than 5% of lipids and their stock lipids are mainly concentrated in one organ: the liver. In fatty fish (sardine, mackerel, salmon, trout...), storage lipids are localized in the epidermis and in the muscle (lipid content is around 15%). So for this kind of fish, liver,

and extensively viscera (where liver and other digestive organ are not dissociated) possess less neutral lipids than other viscera species.

Phospholipids have to be carefully studied, even if they constitute a minor fraction, as those molecules are highly valuable. Fatty acids localized in those fractions are also interesting, essentially concerning heads (which possess a high $\omega 3$ fatty acid content). Moreover, even if the fatty acid composition is different according to the matrix, a qualitative correlation could be drawn with the phospholipid composition of sardine filet (De Leonardi et Macciola - 2004).

According to the high protein content of effluents, their up-grading will be essentially focused on protein recovery. Hence, a complementary work of membrane filtration, will be carried out.

So, values obtained during this work could be compared with those obtained further by the mean of the development of mild process. Lipid fractions are obtained here using solvent extraction only and the quantities obtained will be used as references. Those values also make enquiries concerning the nature of the compounds introduced in the process.

2. DETERMINATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES ENZYMES ET DES CO-PRODUITS SOLIDES DE SARDINE

Les trois enzymes choisies pour cette étude - Alcalase, Protamex et Flavourzyme - sont commercialisées par la société Novozymes AS (Danemark). Les fiches techniques fournies pour chacune des enzymes renseignent sur les conditions optimales de chacune et donne une indication de l'activité spécifique. Cette activité est calculée pour chaque enzyme en fonction d'un substrat modèle. Cependant, le substrat utilisé pour les trois enzymes étudiées n'est pas identique. Ainsi, l'activité spécifique de Protamex et Alcalase est donnée en unité Anson (AU), basée sur l'hydrolyse de l'hémoglobine, alors que l'activité de Flavourzyme est donné en unité Leucine Amino Peptidase (LAPU), basée sur l'hydrolyse de la L-leucine-p-nitroanilide. Dans le troisième chapitre de cette étude, l'efficacité des enzymes sera comparée en fonction des conditions opératoires, nécessitant une standardisation des activités.

Les co-produits de sardine, comme toute matrice vivante, possèdent une activité enzymatique endogène. Lors de la réalisation d'hydrolyses enzymatiques contrôlées à l'aide d'enzymes exogènes, deux modes d'actions peuvent intervenir : l'inactivation des enzymes, le plus souvent réalisé par traitement thermique, ou la conduite d'hydrolyse à l'aide conjointement des enzymes endogènes et exogènes. Dans le second cas de figure, il est alors important d'avoir connaissance de l'activité protéolytique des enzymes endogènes en fonction des conditions expérimentales déterminées.

L'objectif de ce chapitre est donc de caractériser les enzymes en fonction des conditions expérimentales, telles que la température, le pH et la concentration en enzyme. La première partie de ce travail consiste alors à déterminer les activités spécifiques des différentes enzymes commerciales. Une fois les conditions optimales déterminées, les activités protéolytiques des matrices (têtes et viscères de sardine) seront étudiées.

The enzymes chosen for this study, Alcalase, Protamex and Flavourzyme are commercialized by Novozymes AS (Denmark). Technical product sheets of these enzymes give indications about conditions required for each enzyme and their specific activity. This activity is defined for each enzyme with a model substrate. However, the substrate used by the manufacturer is different according to the enzyme. So, Alcalase and Protamex specific activities are given in Anson Unit (AU), based on the hemoglobin hydrolysis, while the specific activity of Flavourzyme is given in Leucine Amino Peptidase Unit (LAPU), based on the hydrolysis of L-leucine-p-nitroanilide. In the third chapter, enzymes efficiencies will be

compared according to the experimental conditions, requiring a standardization of enzymes activities.

Sardine by-products, as all matrixes from living beings, possess a specific enzymatic activity and especially proteolytic activity. During controlled hydrolysis with exogenous enzymes, two different ways could be followed: inactivation of endogenous enzymes, often conducted with high temperature treatment, or hydrolysis with both endogenous and exogenous enzymes. In this case, it is important to know about the proteolytic activity of the matrix under determined conditions.

The objective of this chapter is to characterize enzymes according to experimental parameters such as temperature, pH and enzyme concentration. The first step consist to determine the specific activities of commercial enzymes. After the determination of the optimal conditions, proteolytic activities of by-products (heads and viscera of sardine) will be studied.

2.1. Activité spécifique des enzymes commerciales

Comme évoqué dans la partie bibliographique, la concentration, la température et le pH sont trois des paramètres les plus influents sur l'activité des enzymes (cf. p 68).

2.1.1. Effet de la concentration en enzyme

L'évolution de l'activité enzymatique des enzymes Protamex (A), Alcalase (B) et Flavourzyme (C) en fonction de la concentration en enzyme est donnée sur la Figure 51. Les activités spécifiques sont données en mU où à 1 U correspond 1mg de BSA hydrolysée en une heure. Les activités présentées dans ces graphiques ont été mesurées à pH 8 et à 50°C pour Protamex et Alcalase et à pH 8 et 40°C pour Flavourzyme. D'autres essais ont été effectués pour d'autres conditions de températures et de pH. L'allure des courbes obtenues pour les trois enzymes est similaire.

L'activité du complexe enzymatique Protamex (courbe A) varie en fonction de la concentration, de façon linéaire au départ puis, très vite, la courbe prend une allure asymptotique (0,25% E/S). L'activité spécifique de ce complexe passe ainsi de 592 ± 53 mU pour une concentration de 0,1% à une activité de 2053 ± 110 mU à 1,0%, soit une augmentation de l'activité d'un facteur environ égal à 3,5 alors que la concentration a elle été augmentée d'un facteur 10.

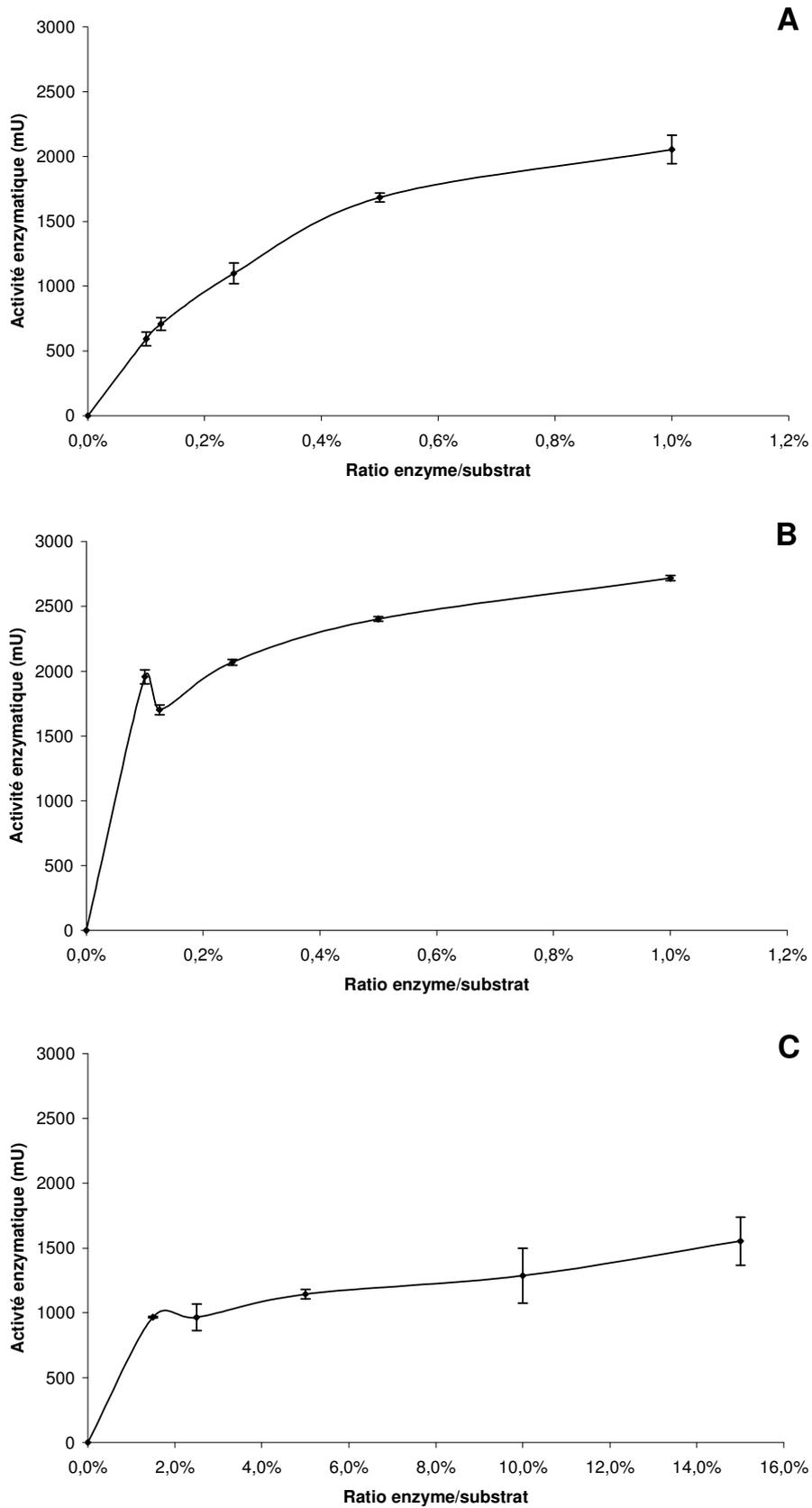


Figure 51 : Effet de la concentration en enzyme sur l'activité de Protamex à pH 8 et 50°C (A), Alcalase à pH8 et 50°C (B) et Flavourzyme à pH8 et 40°C (C). *Effect of enzyme concentration on Protamex (A), Alcalase (B) and Flavourzyme (C) activities*

L'allure de la courbe obtenue avec le complexe Alcalase (courbe B) est similaire à celle obtenue avec Protamex. Néanmoins, les activités obtenues avec ce complexe sont plus importantes. En effet, pour une concentration en Alcalase de 0,1%, l'activité protéolytique obtenue est de 1955 ± 53 mU (contre 592 ± 53 mU pour Protamex). L'augmentation des valeurs obtenues avec des quantités croissantes d'enzyme est par contre beaucoup moins importante. En effet, pour une concentration en enzyme de 1% par rapport au substrat, l'activité spécifique relevée est de 2717 ± 20 mU, ce qui correspond à une augmentation d'un facteur 1,4 pour une quantité d'enzyme 10 fois plus grande.

La courbe obtenue en fonction des différentes quantités de Flavourzyme (courbe C) est également de forme asymptotique. Cependant, le point le plus important à noter est la faiblesse des activités mesurées compte tenu des fortes concentrations en enzyme. En effet, pour pouvoir obtenir des activités suffisamment importantes, il a fallu augmenter d'un facteur 15 le ratio E/S pour Flavourzyme par comparaison avec les deux autres complexes. Le graphique présenté ici est de plus relatif à une expérience menée à 40°C. Nous verrons plus loin que, contrairement aux deux autres complexes étudiés, Flavourzyme possède une activité supérieure à 40°C qu'à 50°C. Avec une concentration en enzyme de 1,5%, l'activité spécifique de Flavourzyme est de 967 ± 7 mU. Pour un ratio E/S de 15%, cette activité passe à 1554 ± 184 mU, soit, pour une augmentation de la quantité d'enzyme d'un facteur 10, une augmentation de l'activité d'un facteur 1,6.

2.1.2. Effet de la température

L'évolution des activités enzymatiques en fonction de la température est indiquée, pour chacune des enzymes, sur la Figure 52. Les activités représentées sur ce graphe ont été obtenues avec les conditions expérimentales suivantes : pH 8 et un ratio E/S de 0,1% pour Protamex et Alcalase et de 1,5% pour Flavourzyme. Le domaine de température s'étend de 30°C à 60°C.

L'activité de Protamex en fonction de la température (courbe A) ne varie pas de façon importante. Aucune température ne semble avoir un effet néfaste sur l'activité. Cependant, plus la température est élevée, plus l'activité rencontrée sera forte (308 ± 31 mU à 30°C puis 728 ± 107 mU à 60°C). Une légère stabilisation est observée à partir de 50°C (592 ± 53 mU) où l'activité n'est pas significativement différente de celle mesurée à 60°C.

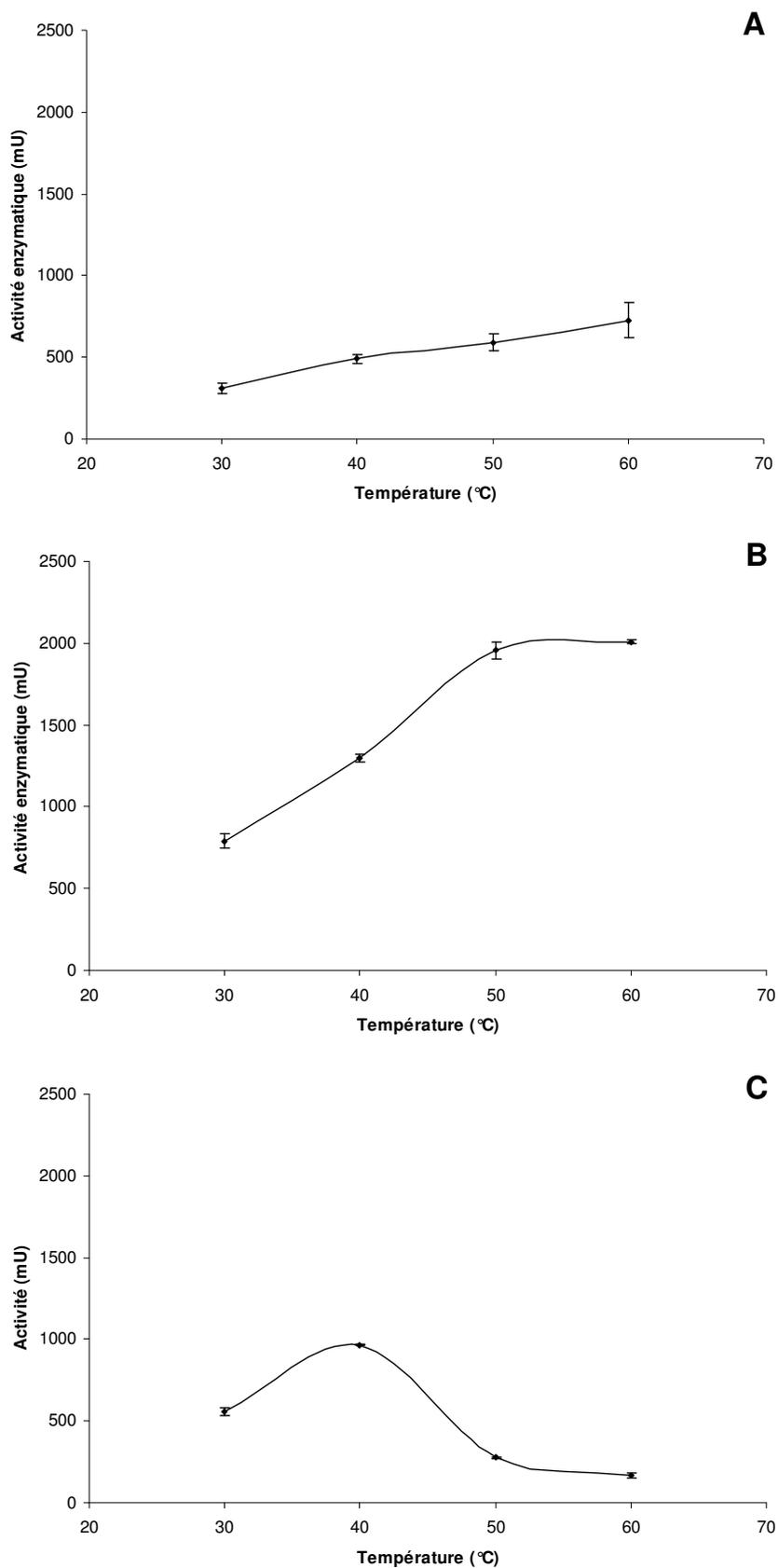


Figure 52 : Effet de la température sur l'activité de Protamex (A), Alcalase (B) et Flavourzyme (C). Tests réalisés à pH 8 pour des ratios E/S de 0,1% pour Alcalase et Protamex et de 1,5% pour Flavourzyme. Effect of temperature on Protamex (A), Alcalase (B) and Flavourzyme (C) activities

L'effet de la température est plus marqué lors de la mesure de l'activité d'Alcalase (courbe B). En effet, à 30°C, l'activité d'Alcalase est de 789 ± 44 mU et à 50-60°C, elle avoisine les 2000 mU. Une stabilisation est, une fois de plus, observée à partir de 50°C.

La température possède un effet plus inhibiteur sur l'activité de Flavourzyme (courbe C). La température optimale de Flavourzyme est 40°C où l'activité mesurée est de 967 ± 7 mU. A 30°C ou 50°C, cette activité est fortement en déclin (556 ± 25 mU à 30°C et 276 ± 4 mU à 50°C).

2.1.3. Effet du pH

L'évolution des activités enzymatiques en fonction du pH est indiquée, pour chacune des enzymes, sur la Figure 53. Les activités représentées sur ce graphe ont été obtenues avec les conditions expérimentales optimales déterminées précédemment, c'est-à-dire à 60°C et avec un ratio E/S de 0,1% pour Protamex et Alcalase et à 40°C et avec un ratio de 1,5% pour Flavourzyme.

Alors que de très faibles activités de Protamex (courbe A) sont mesurées à pH 5 (54 ± 20 mU) et pH 6 (156 ± 42 mU), l'activité commence à être plus importante à pH 7 (590 ± 164 mU) pour atteindre son maximum à pH 8 (728 ± 107). L'activité protéolytique de Protamex va ensuite décroître lorsque le pH est de 9 (458 ± 29 mU).

Le pH joue également un rôle très important sur l'activité enzymatique de l'Alcalase. Les mesures de l'activité augmentent de 269 ± 20 mU à pH5 à un maximum de 2009 ± 10 mU à pH 8. Cette activité diminue ensuite avec l'augmentation du pH (1346 ± 70 mU à pH 9).

Malgré un effet moins marqué que pour les deux autres enzymes, le pH va également influencer l'activité spécifique de Flavourzyme (courbe C). Le minimum est mesuré, comme pour les deux enzymes précédentes à pH 5 (589 ± 34 mU) pour atteindre son maximum à pH 8 (967 ± 7 mU). Une baisse de l'activité enzymatique est une nouvelle fois enregistrée à pH 9 (872 ± 77 mU). Cependant, cette baisse est moins importante que celle enregistrée pour Protamex ou Alcalase.

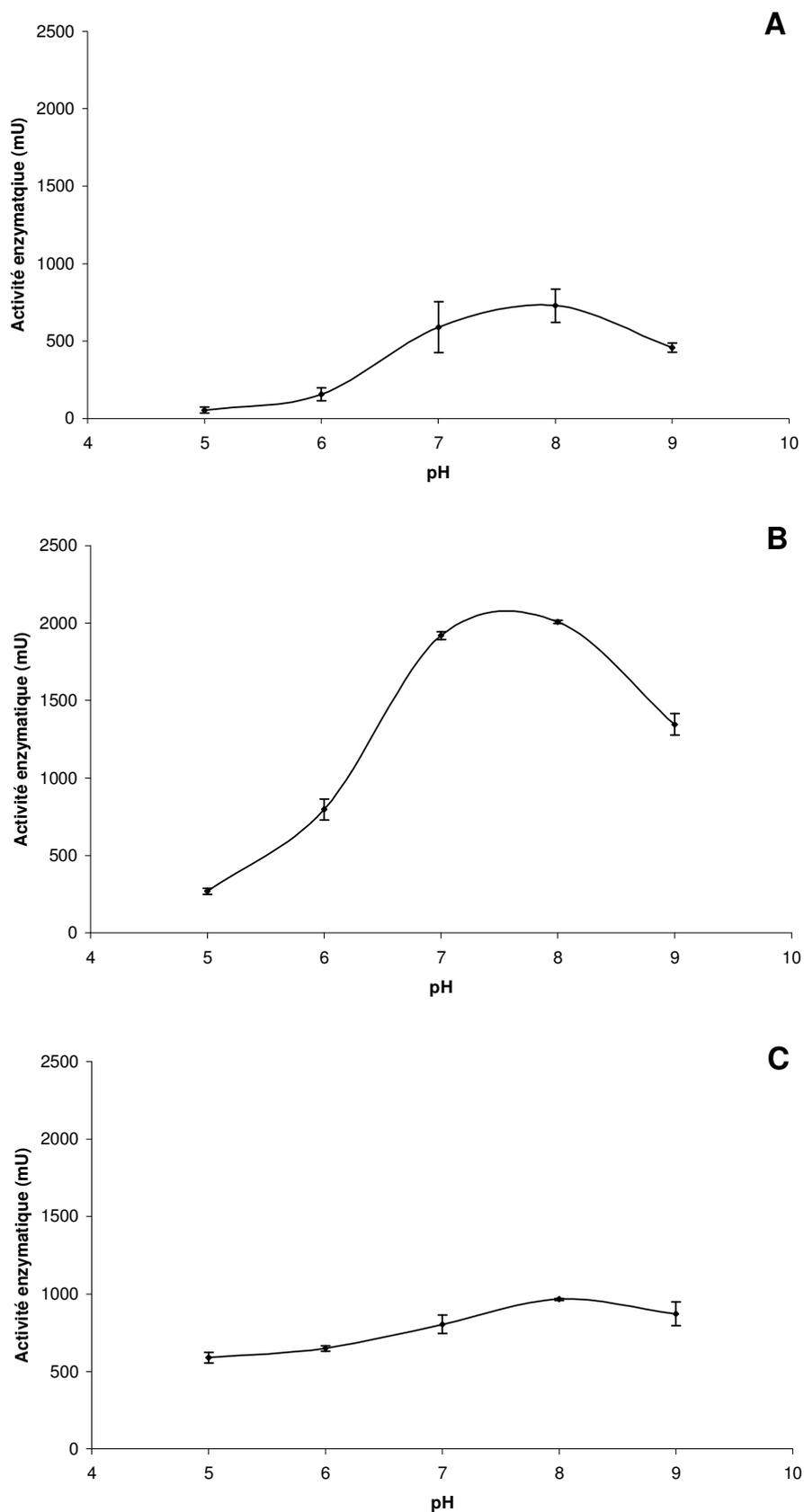


Figure 53 : Effet du pH sur l'activité de Protamex à 60°C, E/S=0,1% (A) ; Alcalase à 60°C, E/S=0,1% (B) et Flavourzyme à 40°C, E/S=1,5% (C). *Effect of pH on Protamex (A), Alcalase (B) and Flavourzyme (C) activities*

2.2. Activité protéolytique endogène

L'activité des enzymes endogènes a été mesurée à pH 8 et à 50°C. L'activité protéolytique des co-produits de sardine est exprimée en U où, comme pour la détermination de l'activité spécifique des protéases commerciales, 1 U correspond à 1 mg de BSA coupée par heure. Pour les enzymes commerciales, les activités ont été données en fonction de leur concentration dans le milieu. En ce qui concerne les enzymes endogènes, l'activité protéolytique est donnée en fonction de la concentration en protéines solubles dosées dans l'extrait enzymatique. Ainsi, l'activité protéolytique de l'extrait de tête de sardine est de $1895,8 \pm 36,1$ mU pour une concentration en protéines solubles de 8,8 g/L. L'activité protéolytique de l'extrait de viscères de sardine est, elle, de $37104,2 \pm 95,5$ mU pour une concentration en protéine soluble de 8,3 g/L.

2.3. Discussion

2.3.1. Activité spécifique des enzymes commerciales

Comme évoqué précédemment, les activités spécifiques des enzymes présentent une allure asymptotique en fonction de la concentration en enzyme (Cuvellier - 1999). Malgré une activité plus importante avec de fortes concentrations en enzyme, l'efficacité n'est pas proportionnelle. **Pour des raisons économiques, les enzymes étant l'élément le plus onéreux dans la mise en place d'un tel procédé (Quaglia et Orban - 1987a), il conviendra alors d'utiliser le moins possible d'enzyme, c'est-à-dire de se placer aux points les plus bas étudiés (0,1% pour Protamex et Alcalase et 1,5% pour Flavourzyme).** D'après les résultats obtenus, Alcalase est l'enzyme la plus active sur un substrat modèle (l'hémoglobine), suivie de Protamex puis Flavourzyme. L'étape suivante nous permettra de vérifier si Alcalase est également la plus efficace pour l'hydrolyse de matrices plus complexes et surtout si elle, et les deux autres enzymes, sont utilisables pour la récupération de lipides. La dominance de l'activité d'Alcalase par rapport à Protamex est en partie expliquée par les données du fournisseur. Ces deux enzymes (contrairement à Flavourzyme) ont été caractérisées avec le même substrat modèle et les activités sont données en AU. L'Alcalase utilisée pour cette étude est une Alcalase 2,4L, signifiant une activité de 2,4 AU (Novozymes - 2001a). Protamex est donnée par le fournisseur pour avoir une activité de 1,5 AU (Novozymes - 2001c), soit une efficacité 1,6 fois moindre, ce qui explique les différences obtenues avec nos méthodes. Enfin, il est important de noter que les prix de ces trois complexes enzymatiques est différent. En effet, Protamex et Alcalase ont des prix voisins, aux alentours de 20

à 30 €/kg, alors que Flavourzyme coûte environ 50 €/kg. **Ainsi, dans nos conditions, il coûterait environ 40 fois plus cher d'utiliser Flavourzyme que les deux autres enzymes.**

Le domaine fonctionnel de température varie de 30°C à 60°C. En plus du fait que ce domaine ait été préconisé par le fournisseur, nous n'avons pas voulu l'étendre étant donné qu'une augmentation ou une diminution de la température serait à l'origine d'une augmentation significative de l'énergie dépensée. La température optimale pour Protamex et Alcalase est 60°C. **Cependant, les activités obtenues à 50°C sont très proches et le coût engendré par une augmentation de 10°C de la température d'hydrolyse n'est pas justifié par une si petite augmentation de l'activité.** Aussi, il est plus profitable de travailler à 50°C. Concernant Flavourzyme, la température optimale est de 40°C. Cependant, en vue de comparer les différents produits formés au cours de l'hydrolyse, notamment les lipides (qui sont très sensibles à la température), il est préférable pour la suite de l'étude de travailler avec des conditions similaires de façon à faire varier le moins de paramètres possible. **Le pH joue également un rôle très important sur l'activité des enzymes. Dans notre cas, les trois enzymes possèdent une activité optimale à pH 8.**

Les résultats concernant les conditions optimales de travail de l'Alcalase sont en accord avec celles données par les fiches techniques du fournisseur (Novozymes - 2001a). Concernant Protamex, la température indiquée par le fournisseur est du même ordre de grandeur que celles trouvées lors de cet essai. Par contre, le fournisseur donne une activité maximale à pH 6,5 et une forte décroissance à pH 8 (Novozymes - 2001c), résultats contredits par notre méthode, d'où l'importance de calibrer les enzymes. En effet, les lots peuvent varier et les contraintes environnementales et expérimentales peuvent également influencer sur l'activité des enzymes. Un étalonnage individuel (au moins à l'échelle du laboratoire) apparaît ainsi primordial pour chaque lot différent. Le même constat a été relevé pour Flavourzyme, où l'optimum indiqué par la fiche technique était situé à pH 7 (Novozymes - 2001b).

Tableau XXVII : Activités protéolytiques des enzymes commerciales sur un substrat modèle obtenues à 50°C et à pH 8

	Activité protéolytique (mU)
Protamex 0,1%	592,3 ± 53,3
Alcalase 0,1%	1955,6 ± 53,5
Flavourzyme 1,5%	275,6 ± 3,9

Grâce à cette étude, les conditions optimales de travail pour les trois enzymes ont pu être définies. Il n'est pas nécessaire ni économiquement intéressant de travailler avec de fortes

concentrations. Aussi, pour la prochaine partie, les enzymes seront utilisées avec les quantités les plus faibles (0,1% pour Protamex et Alcalase et 1,5% pour Flavourzyme). Une température de 50°C apporte les avantages les plus intéressants : bonne activité protéolytique, dépense énergétique modérée et conservation des lipides plus importante qu'à 60°C. Enfin, le pH optimal pour les trois enzymes est le même. **Aussi, lors de la troisième partie de ce travail, toutes les hydrolyses seront réalisées à pH 8 et à 50°C.** Les activités des enzymes à ces conditions sont reportées dans le Tableau XXVII. Ces conditions de travail, obtenues par expérimentation, viennent confirmer celles utilisées par d'autres équipes ayant travaillé sur l'hydrolyse enzymatique de co-produits marins par des protéases (essentiellement Alcalase) (Hoyle et Merrit - 1994; Guérard *et al.* - 2001; Sathivel *et al.* - 2003). Par ailleurs, d'autres études portées sur l'optimisation des conditions d'hydrolyse de ces enzymes sur des matrices marines ont approuvé que des conditions similaires aux nôtres (pH8 et 50°C) étaient optimales (Shahidi *et al.* - 1995; Diniz et Martin - 1996).

*As indicated in the bibliography section, specific activities of enzymes according to the enzyme concentration have an asymptotic profile (Cuvellier - 1999). Despite a higher activity with high concentration, enzyme efficiency is not proportional to enzyme concentration. **Due to economic reasons, enzymes being the most expensive compound in a such process (Quaglia et Orban - 1987a), it seems better to use enzymes at low concentration level (0,1% for Protamex and Alcalase and 1,5% for Flavourzyme).** According to our results, Alcalase seems to be the most efficient enzyme on a model substrate (haemoglobin), followed by Protamex and then by Flavourzyme. The following step will allow to check if Alcalase is also the most efficient concerning hydrolysis of more complex matrixes and mostly if Alcalase, and the two others, are useful for lipid recovery. But the difference between Alcalase and Protamex activities can be explained by the data furnished by the manufacturer. Effectively, both enzymes, produced and commercialized by Novozymes AS, have been characterized with the same method (contrary to Flavourzyme) and activities are given in AU. Alcalase 2.4L, which has been used in this study has an activity of 2.4 AU (Novozymes - 2001a), while Protamex has an activity of 1.5 AU (Novozymes - 2001c), corresponding to a 1.6 less efficiency. Finally, it is important to note that prices for the three enzymes are different. Protamex and Alcalase have approximately the same, around 20 €/kg, while Flavourzyme is 5 times more expensive (around 50 €/kg). **Hence, in our condition, it will cost around 40 times more to use Flavourzyme than the two others enzymes.***

The temperatures used are ranged from 30°C to 60°C. This study area has been suggested by the manufacturer himself. Moreover, we do not want to extend this area due to the fact that higher or lower temperature require a higher energy consumption. **Optimal temperature for Protamex and Alcalase is 60°C. However, activities found at 50°C are close and the energy requirement to increase the temperature of 10°C is not justified by a slight enzyme activity.** So, a temperature of 50°C for Alcalase and Protamex should be suitable. Concerning Flavourzyme, highest activity is observed at 40°C. However, in order to compare results obtained with the three enzymes, it is preferable to work at the same conditions, the biochemical composition of the product obtained could vary with different conditions (especially lipids with temperature). pH has also an important role on the enzyme activity. **In all our trials, pH 8 gives the highest activities for each enzyme and in each conditions.**

Results on the optimal working conditions of Alcalase are in accordance with that given by the specification sheets furnished by the manufacturer (Novozymes - 2001a). The temperature suggested by Novozymes for Protamex is similar to the one found experimentally, but optimal pH is different. Novozymes suggests an optimal pH of 6.5 and a high decrease of activity at pH 8 and at 50°C (Novozymes - 2001c). This difference shows the importance to calibrate enzymes. Effectively, the lots could vary from each other and environmental and experimental constraints could change the enzymes activity. An individual calibration (at least at laboratory scale) appears important and should be done for every lot. The same conclusions have been drawn for Flavourzyme, where the predicted optimum was pH 7 (Novozymes - 2001b).

Table I : Proteolytic activities of commercial enzymes obtained at pH 8 and at 50°C

	<i>Proteolytic activities (mU)</i>
Protamex 0.1%	592.3 ± 53.3
Alcalase 0.1%	1955.6 ± 53.5
Flavourzyme 1.5%	275.6 ± 3.9

Thanks to this study, optimal working conditions for the three enzymes have been determined. It is not necessary and not economically interesting to work with high enzyme contents. So, in the next chapter, enzymes will be used at lowest concentrations (0.1% for Protamex and Alcalase and 1.5% for Flavourzyme). A temperature of 50°C provides the highest advantages : efficient proteolytic activity, low energy requirement, highest lipid preservation than at 60°C. Finally, optimum pH is found the same for the three enzymes. **Thus, during the third chapter of this work, all hydrolysis will be carried out at pH 8 and at**

50°C. Activities of each enzymes under those conditions are reported in Table I. These working conditions, obtained experimentally, confirm those used by other studies focused on marine by-product hydrolysis (essentially with Alcalase) (Hoyle et Merrit - 1994; Guérard et al. - 2001; Sathivel et al. - 2003). Other works have shown that optimization of hydrolysis conditions for marine material conducted to similar conditions than ours (pH8 and 50°C) (Shahidi et al. - 1995; Diniz et Martin - 1996).

2.3.2. Activité spécifique des enzymes endogènes

Les principales protéases trouvées dans les matrices marines sont les enzymes de type protéases acides (pepsine), protéases sériques (trypsine, chymotrypsine, élastase), protéases cystéiques (calpaine) et métallo protéases (collagénase) (Shahidi et Janak Kamil - 2001). Le Tableau XXVIII récapitule les différentes conditions d'utilisation de quelques unes de ces principales enzymes, enzymes spécifiquement trouvées dans les viscères de poisson (Shahidi et Janak Kamil - 2001; Castillo-Yañez *et al.* - 2004). Les numéros EC indiqués dans ce tableau sont donnés à titre indicatif, en particulier le 4^{ème} chiffre puisque, pour chaque exemple, plusieurs enzymes ont été décrites. Ainsi, la pepsine, dont deux formes ont été trouvées, aura les deux numéros EC suivants : 3.4.23.1 (pepsine A) et 3.4.23.2 (pepsine 2). Certaines enzymes, comme les collagénases, les élastases ou cathépsines sont encore plus diversifiées et peuvent appartenir à différentes classes d'enzymes. Certaines cathépsines sont des protéases sériques (cathépsine G), des protéases cystéiques (cathépsines B, L, H, T...), des protéases acides (cathépsines A, D...). Il est ainsi difficile de pouvoir classer certaines enzymes endogènes.

Tableau XXVIII : Classification et conditions opératoires optimales des principales enzymes endogènes des matrices marines

Enzyme	EC	pH	Température (°C)
Pepsine	3.4.23.1	2-4	35-40
Elastase	3.4.21.37	6,5-8	35-40
Trypsine	3.4.21.4	7-8	35-60
Chymotrypsine	3.4.21.1	6-8	25-40

Les activités spécifiques des enzymes endogènes ont été mesurées dans les conditions déterminées pour les enzymes commerciales. **A ces conditions (pH 8 et 50°C), les têtes possèdent peu d'activité protéolytique, comparée à celle retrouvée dans les viscères (près de 20 fois supérieure).** Les têtes de poisson ne sont généralement pas utilisées pour leur capacité de protéolyse et, à notre connaissance, peu d'études ont porté spécifiquement sur l'activité enzymatique des têtes de poisson. Néanmoins, une étude sur les têtes de truite a

montré une activité protéolytique de cette matrice sur une large plage de pH (de pH 2 à pH 11) indiquant la présence de plusieurs catégories d'enzymes, essentiellement des protéases de type sérine et des protéases acides (Michail *et al.* - 2006). **Dans nos conditions expérimentales, au vu des données du Tableau XXVIII, il s'agit sans doute de protéases sériques de type élastase, trypsine et/ou chymotrypsine.**

Les viscères par contre, possèdent une machinerie enzymatique diversifiée, due aux fonctions digestives, et de nombreuses études se sont tournées vers ces matrices (Gildberg - 1992; De Vecchi et Coppes - 1996). Bien que les activités trypsine et chymotrypsine soient les plus fréquemment caractérisées (Guizani *et al.* - 1991; Heu *et al.* - 1995; Kishimura *et al.* - 2005; Kishimura *et al.* - 2006), les activités pepsine (Gildberg et Raa - 1983; Castillo-Yañez *et al.* - 2004), cathépsine et collagénase (Sovik et Rustad - 2006) sont aussi fréquemment citées. D'autres activités ont également été mesurées sans être caractérisées (Noda et Murakami - 1981; Murakami et Noda - 1981; El-Beltagy *et al.* - 2005). Beaucoup d'études citent les activités protéolytiques de petits pélagiques gras, essentiellement sur la sardine du Japon, *Sardinops melanostictus* (Noda et Murakami - 1981; Murakami et Noda - 1981; Castillo-Yañez *et al.* - 2004; Kishimura *et al.* - 2006). Cependant, une étude récente s'est focalisée sur la sardine commune, *Sardina pilchardus* (Bougatef *et al.* - 2006), caractérisant l'activité tryptique des viscères. Comme décrit dans le Tableau XXVIII, mis à part pour la pepsine, la majorité des enzymes digestives sont actives à pH alcalin, malgré un pH natif acide (le pH des viscères de sardine est de 6,4), et pour des températures comprises entre 35 et 60°C (Castillo-Yañez *et al.* - 2004). **Compte tenu des conditions opératoires déterminées, les activités des enzymes protéolytiques des viscères de sardine seront donc maximales.** Cependant, malgré la forte présence des enzymes endogènes dans les viscères, une étude a prouvé l'importance de l'utilisation conjointe des enzymes endogènes et exogènes, surtout concernant la solubilisation de la matière (Aspmo *et al.* - 2005a).

The main proteases found in marine matrixes are acid proteases (pepsin), serine proteases (trypsin, chymotrypsin, elastase), cystine proteases (calpain) and metallo protease (collagenase) (Shahidi et Janak Kamil - 2001). Table II summarizes the different conditions used of some of the most frequent enzymes, specially found in fish viscera (Shahidi et Janak Kamil - 2001; Castillo-Yañez et al. - 2004). EC numbers given in this table are indicative, notably the 4th number, because for each example, several enzyme activities have been described. Thus, pepsin possesses 2 different forms, pepsin A (EC 3.4.23.1) and pepsin B (EC 3.4.23.2). Enzyme classes, such as collagenases, elastases or cathepsins are more diversified

and could belong to different enzymes classes. Some of the cathepsins are classified as serine proteases (cathepsin G) while others are cystein (cathepsins B, L H, T...) or acidic (cathepsins A, D...) proteases. Consequently, it is sometimes hard to classify some endogenous enzymes.

Table II : Optimal operating conditions and classification of the main endogenous enzymes from marine matrixes

Enzyme	EC	pH	Temperature (°C)
Pepsin	3.4.23.1	2-4	35-40
Elastase	3.4.21.37	6.5-8	35-40
Trypsin	3.4.21.4	7-8	35-60
Chymotrypsin	3.4.21.1	6-8	25-40

Specific activities of endogenous enzymes have been recorded in conditions determined for commercial enzymes. **At these conditions (pH 8 and 50°C), sardine heads do not possess a high activity compared to sardine viscera (20 times more).** Fish heads are generally not used for their proteolytic activity, and, to our knowledge, very few studies have mentioned the proteolytic activity of such matrixes. However, a study on trout heads has revealed that they have a proteolytic activity on a large pH scale (from pH 2 to pH 11), indicating the presence of several kinds of enzymes, as serine or acidic proteases (Michail et al. - 2006). **In our conditions, according to the conditions indicated in Table II, it might be serine proteases, like elastase, trypsin and/or chymotrypsine.**

At the opposite, viscera possess a high enzymatic disponibility, due to digestive functions, and a lot of papers have been written about it (Gildberg - 1992; De Vecchi et Coppes - 1996). Even though trypsin and chymotrypsine-like activities have been mostly characterized (Guizani et al. - 1991; Heu et al. - 1995; Kishimura et al. - 2005; Kishimura et al. - 2006), other activities have been reported, such as pepsin-like activity (Gildberg et Raa - 1983; Castillo-Yañez et al. - 2004) and cathepsin and collagenase activities (Sovik et Rustad - 2006). Other activities have been found, but their specificities have not been characterized (Noda et Murakami - 1981; Murakami et Noda - 1981; El-Beltagy et al. - 2005). A lot of papers have also focused on small fatty pelagics, especially on the Japanese sardine, *Sardinops melanostictus*, (Noda et Murakami - 1981; Murakami et Noda - 1981; Castillo-Yañez et al. - 2004; Kishimura et al. - 2006). Nevertheless, a recent work have studied endogenous enzymes from common sardine, *Sardina pilchardus* (Bougatef et al. - 2006), and has characterized a trypsine-like activity. As described in Table II, except for pepsin, the main part of endogenous enzymes are working at alkaline pH, despite a native acidic pH (sardine

viscera have a pH 6.36), and at temperature range of 35-60°C. According to the operating conditions determined, endogenous activities will be the highest as possible. However, despite the high endogenous activity found in viscera, a study has demonstrated that the use of both endogenous and exogenous enzymes in the same time gives great benefits, especially concerning the matter solubilization (Aspmo et al. - 2005a).

3. HYDROLYSE DES CO-PRODUITS SOLIDES : HYDROLYSE LONGUE DUREE, UTILISATION COMBINEE DES ENZYMES ET OPTIMISATION

Ce chapitre porte sur l'hydrolyse enzymatique des co-produits solides sélectionnés dans le Chapitre 1, les têtes et les viscères de sardine, à l'aide de protéases industrielles et sans inactivation des enzymes endogènes. Chaque matrice sera traitée séparément.

Dans un premier temps, des hydrolyses de longue durée (24 h) sont réalisées dans les conditions optimales déterminées dans le chapitre 2, c'est-à-dire à pH8 et à 50°C. L'objectif de ce travail est de pouvoir comparer les trois enzymes testées et, en conduisant les hydrolyses sur de longues durées, de prédire quelle pourrait être la récupération maximale de lipides après la protéolyse. L'effet combinatoire des enzymes est ensuite testé. Dans les mêmes conditions expérimentales, toutes les combinaisons possibles avec les 3 enzymes sont réalisées. Enfin, l'optimisation de l'hydrolyse des matrices est effectuée, selon la méthodologie des plans d'expériences, avec l'enzyme apparue comme étant la plus favorable.

This chapter is focused on the hydrolysis of solid by-products selected in Chapter 1, sardine heads and viscera, by the mean of industrial proteases without inactivation of endogenous enzymes. Each matrix will be treated separately.

In a first step, hydrolysis are conducted during a long time (24 h) under the conditions determined in the Chapter 2 (pH 8 and 50°C). The goal of this step is to compare the three enzymes and to estimate the maximum lipid recovery. Then, the combinatory effect of the enzymes is tested. In the same conditions than in the first step, all the possible combinations are performed. Finally, the enzyme which has been determined as the most efficient is chosen to optimize the hydrolysis with the experimental design methodology, in order to obtain the most important quantity of lipids.

3.1. Hydrolyse des têtes de sardine

3.1.1. Hydrolyses mono-enzymatiques

3.1.1.1. *Cinétique et répartition de la matière*

L'évolution du degré d'hydrolyse (DH) obtenue pour chaque traitement est représentée sur la Figure 54. La réaction d'hydrolyse débute sans phase de latence. Au bout de 2 h d'hydrolyse, les DH obtenus avec Protamex, Alcalase et Flavourzyme sont respectivement de 6, 8 et 6%. Ensuite, concernant Alcalase et Flavourzyme, l'hydrolyse continue mais la

cinétique de réaction est plus lente. Au bout de 24 h d'hydrolyse, les DH obtenus sont de 15% pour Alcalase et 17% pour Flavourzyme. Concernant Protamex, une légère diminution de l'activité est notée pendant 3 h puis l'hydrolyse reprend avec une vitesse assez importante. Au bout de 24 h d'hydrolyse, le DH obtenu pour cette hydrolyse est de 20%. L'inactivation des enzymes endogènes ne semble pas affecter les hydrolyses menées avec Alcalase et Flavourzyme, où les profils sont similaires avec ou sans enzyme endogène. L'inactivation des enzymes endogènes semble par contre modifier l'activité de Protamex. En effet, en inactivant les enzymes endogènes, l'évolution de l'hydrolyse par Protamex débute de façon identique à celle conduite avec les enzymes endogènes, puis l'allure de la courbe semble se rapprocher de celles obtenues avec les deux autres enzymes (où le DH obtenu est de 13%). Pour toutes ces expériences, la protéolyse semble terminée au bout de 22 h.

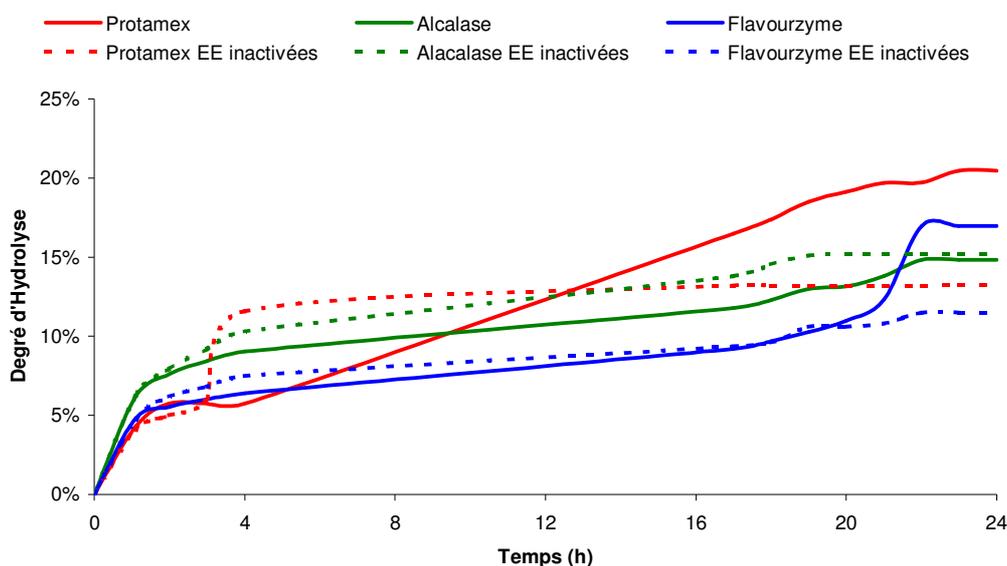


Figure 54 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C avec ou sans inactivation des enzymes endogènes (EE). DH evolution during 24 h hydrolysis of sardine heads with Protamex, Alcalase and Flavourzyme with or without endogenous enzyme inactivation

Les différentes répartitions de la matière au sein des trois fractions sont représentées sur la Figure 55. Sans hydrolyse, seuls 19% de la matière sèche sont sous forme soluble et la majeure partie de la matière est localisée dans le culot (76%). Après hydrolyse des têtes de sardine, les répartitions de la matière sèche sont radicalement différentes puisque environ 50% de la matière se retrouvent dans la fraction soluble et que la fraction huileuse comporte de 12 à 20% de la matière au lieu des 5% initiaux. Les fractions insolubles ne possèdent plus que 12 à 20% de la matière sèche. Les profils obtenus avec Alcalase et Flavourzyme sont identiques

alors que Protamex conduit à une plus forte proportion de matière dans la fraction insoluble au détriment de la fraction huileuse.

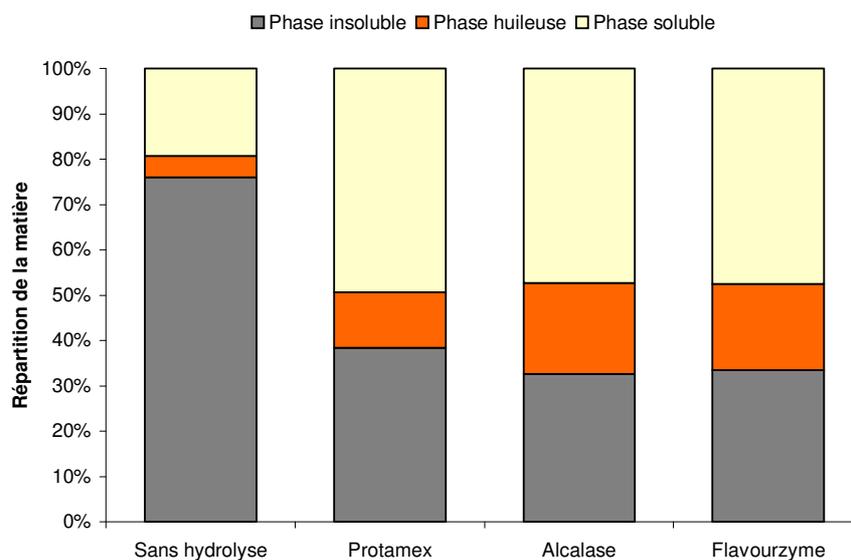


Figure 55 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les têtes de sardine non hydrolysées et hydrolysées (par Protamex, Alcalase et Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. Dry matter repartition among soluble, oily and insoluble fractions generated by sardine heads 24 h hydrolysis

Les teneurs en lipides contenus dans ces trois fractions (Tableau XXIX) indiquent que les phases insolubles obtenues après hydrolyse sont plus pauvres en lipides que la fraction insoluble initiale. En effet, la teneur en lipides de la fraction insoluble passe de $23,2 \pm 0,6$ g/100g de matière sèche à ~ 15 g/100g. Par contre, la phase huileuse se retrouve enrichie en lipides : les hydrolyses menées avec Protamex et Flavourzyme contiennent plus de 91 g de lipides pour 100g de matière alors que la phase huileuse initiale contenait environ 85 g/100g. Concernant la phase soluble, seule Protamex permet un enrichissement en lipides puisque la phase soluble, qui contenait initialement $5,6 \pm 0,9$ g de lipides pour 100g de matière sèche, contient avec Protamex $6,7 \pm 1,0$ g/100g. Les hydrolyses menées avec Alcalase et Flavourzyme conduisent à des fractions solubles plus pauvres en lipides que la fraction initiale.

Tableau XXIX : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse des têtes de sardine par Protamex, Alcalase et Flavourzyme à pH 8, 50°C et pendant 24 h. *Lipid content in the three fractions after 24 h sardine heads hydrolysis*

	Sans hydrolyse	Protamex	Alcalase	Flavourzyme
Phase insoluble	23,2± 0,6	15,8± 1,5	16,8 0,3	13,2± 2,0
Phase huileuse	84,6± 2,1	95,4± 7,4	81,9 7,4	91,97± 3,2
Phase soluble	5,6± 0,9	6,7± 1,0	4,2 0,3	4,1± 0,2

3.1.1.2. Libération des lipides

La libération des lipides correspond à la capacité qu'ont les hydrolyses enzymatiques de permettre la présence des lipides dans les fractions liquides (*i.e.* fraction soluble et fraction huileuse), rendant ainsi possible leur extraction sans avoir recours aux solvants. La distribution des lipides est indiquée sur la Figure 56.

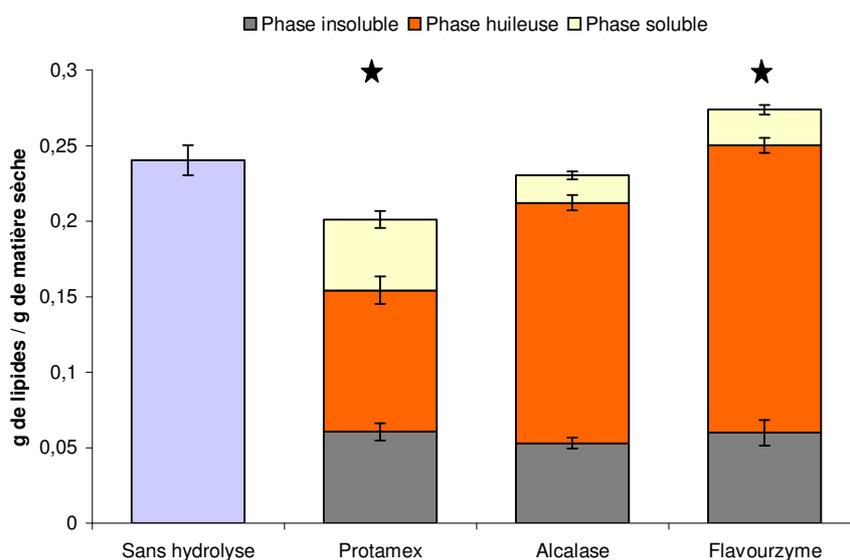


Figure 56 : Distribution des lipides parmi les phases insolubles, huileuses et solubles des hydrolyses réalisées sur les têtes de sardine en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Lipid distribution among the fractions generated after 24 h hydrolysis of sardine heads compared to the lipid content in the raw material (in blue)*

L'hydrolyse menée avec Alcalase ne permet pas de récupérer significativement plus de lipides que lors d'une extraction classique réalisée selon la méthode de Folch. La quantité de lipides extraits après hydrolyse avec Flavourzyme est quant à elle significativement plus importante (au seuil de 5%) et est 1,14 fois plus importante. A l'opposé, l'hydrolyse menée avec Protamex induit une extraction des lipides significativement moins importante que lors d'une extraction classique. Quoi qu'il en soit, pour chaque hydrolyse, la majeure partie des

lipides se retrouve dans les fractions liquides. En effet, 47% des lipides totaux sont localisés dans la fraction huileuse après hydrolyse avec Protamex, 69% après hydrolyse avec Alcalase ou Flavourzyme. Par contre, Protamex est la seule enzyme qui permette de récupérer des lipides dans la fraction soluble en quantité importante (23%). Ainsi, l'hydrolyse menée avec Protamex permet de récupérer dans les fractions liquides 58% des lipides extraits de façon chimique, Alcalase 74% et Flavourzyme 89%.

3.1.1.3. Distribution des phospholipides

Les quantités de phospholipides dosées sont significativement inférieures, après avoir conduit une hydrolyse, à celles dosées sans hydrolyse (Figure 57). Protamex permet tout de même la récupération de la plus grande quantité de phospholipides puisque 83% des phospholipides libérés par traitement classique sont également extraits. Alcalase ne permet de récupérer que 66% des phospholipides et Flavourzyme, bien qu'ayant permis la plus grande extraction de lipides, ne permet l'obtention que de 71% des phospholipides. Les fractions insolubles possèdent beaucoup de phospholipides (58% des phospholipides totaux pour Protamex, 46% pour Alcalase et 51% pour Flavourzyme). Protamex permet la plus importante libération des phospholipides dans la fraction soluble (30% des phospholipides totaux). Enfin, quel que soit le traitement effectué, ~ 35% des phospholipides obtenus par extraction classique sont récupérés dans les fractions liquides des hydrolyses.

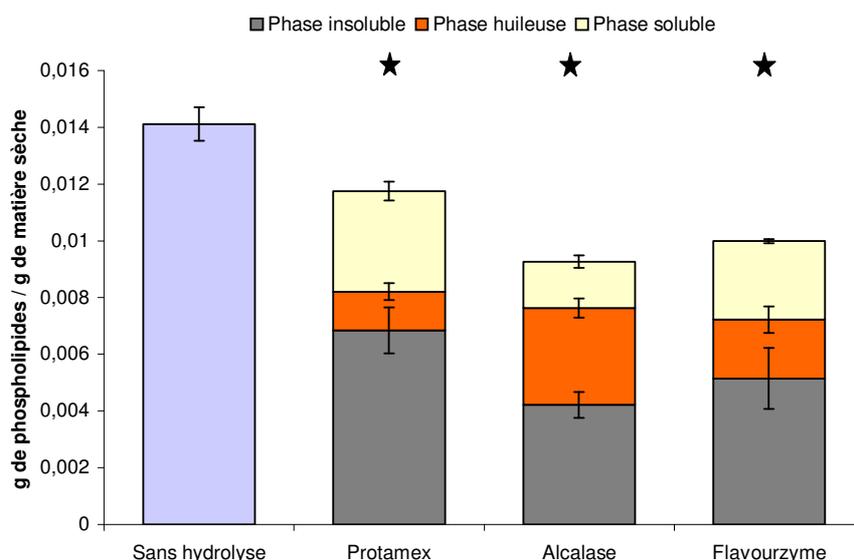


Figure 57 : Distribution des phospholipides parmi les phases insolubles, huileuses et solubles des hydrolyses réalisées sur les têtes de sardine en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. « * » indique que les résultats sont

significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Phospholipid distribution among the fractions generated after 24 h hydrolysis of sardine heads compared to the phospholipid content in the raw material (in blue)*

3.1.1.4. Répartition des acides gras

La distribution des acides gras au sein des fractions obtenues après hydrolyse des têtes de sardines est indiquée sur la Figure 58. La composition en acides gras de toutes ces fractions est détaillée en Annexe B.

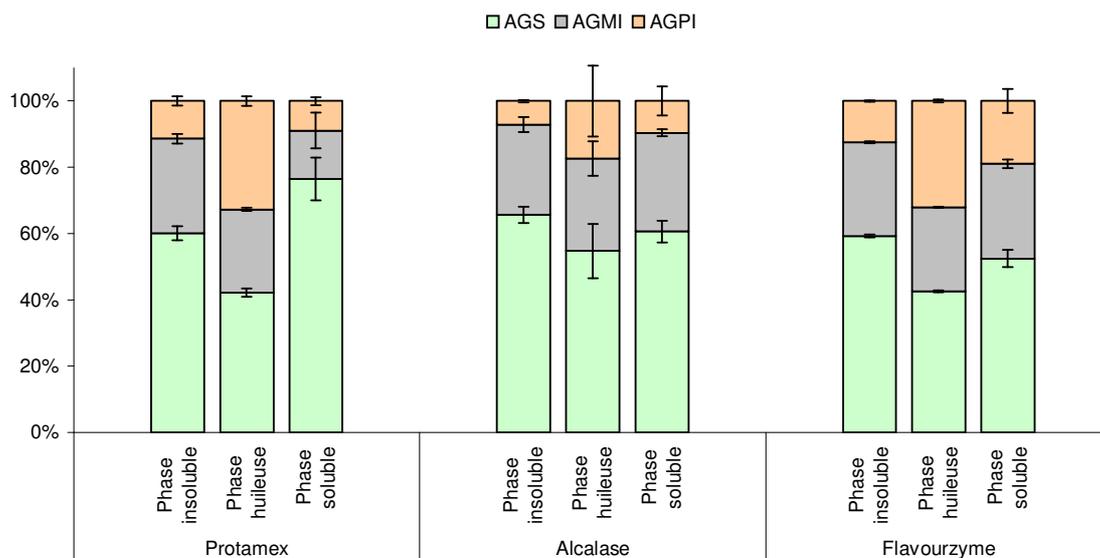


Figure 58 : Répartition des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) dans les différentes fractions obtenues après hydrolyse des têtes de sardine. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. Saturated (AGS), monounsaturated (AGMI) and polyunsaturated (AGPI) fatty acids distribution among fractions obtained after 24 h hydrolysis of sardine heads

Les profils d'acides gras des fractions insolubles obtenus avec les trois enzymes sont à peu près équivalents. En effet, la fraction insoluble des hydrolysats de tête de sardine est composée de 60% d'AGS, de 30% d'AGMI et de 10% d'AGPI. Les phases huileuses obtenues avec Protamex et Flavourzyme possèdent la même distribution des acides gras (42% d'AGS, 25% d'AGMI et 32% d'AGPI) alors que la même fraction obtenue avec Alcalase donne 55% d'AGS, 28% d'AGMI et 11% d'AGPI. Par contre, les lipides localisés dans les fractions solubles diffèrent en fonction du traitement. En effet, avec Protamex, les AGS constituent 76% des acides gras totaux, suivis par les AGMI (15%) puis les AGPI (9%). Avec Alcalase, la proportion d'AGS diminue (61%) à la faveur des AGMI (30%), les AGPI représentant toujours moins de 10% des acides gras totaux. Cette tendance se modifie lorsque les têtes sont hydrolysées avec Flavourzyme puisque, dans la fraction soluble, les AGS ne

représentent plus que 52%, les AGMI sont toujours présents à hauteur de 29% des acides gras totaux et les AGPI, 19%.

Les proportions en EPA et DHA sont reportées dans le Tableau XXX. Ces résultats confortent les observations faites précédemment. En effet, les fraction insolubles, qui sont majoritairement composées d'AGS, possèdent de faibles proportions en EPA et DHA. A l'inverse, les phases huileuses obtenues avec Protamex et Flavourzyme possèdent les teneurs en EPA + DHA les plus importantes (autour de 16% des acides gras totaux). Par ailleurs, comme démontré plus haut, l'hydrolyse menée avec Flavourzyme permet d'obtenir, dans la phase soluble, une proportion en EPA + DHA plus importante ($12,3 \pm 2,6\%$) qu'avec Protamex ($2,2 \pm 0,1\%$). Enfin, il est intéressant de noter ici que l'hydrolyse des têtes de sardine par Alcalase ne permet pas d'obtenir des proportions importantes en acides gras EPA et DHA. Ce qui est en accord avec la Figure 58, indiquant que l'hydrolyse menée avec Alcalase conduit à des proportions en AGPI plus faibles qu'avec les deux autres enzymes.

Tableau XXX : Proportion en EPA + DHA (%) dans les différentes fractions obtenues avant et après hydrolyse des têtes de sardine par Protamex, Alcalase et Flavourzyme pendant 24 h, à pH 8 et à 50°C. EPA and DHA proportions on fractions obtained after 24 h sardine heads hydrolysis

	Phase insoluble	Phase huileuse	Phase soluble
Protamex	$4,3 \pm 0,6$	$15,6 \pm 1,6$	$2,2 \pm 0,1$
Alcalase	$1,3 \pm 0,6$	$5,3 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,1$
Flavourzyme	$5,7 \pm 0,7$	$16,3 \pm 0,3$	$12,3 \pm 2,6$

3.1.1.5. Profils moléculaires des peptides

La répartition des profils de poids moléculaires des peptides des têtes de sardine natifs et générés par l'hydrolyse enzymatique est représentée sur la Figure 59. Le profil obtenu pour les têtes de sardine non hydrolysées est différent de ceux obtenus après hydrolyse. En effet, lors de l'analyse des têtes non hydrolysées (profil A), un pic important est relevé en début de chromatogramme, représentant des composés de haut poids moléculaire (supérieur à 67 kDa). Les profils obtenus après hydrolyses sont également différents en fonction de l'enzyme utilisée. Avec Protamex (profil B), le pic en début de chromatogramme s'est déplacé et les plus gros peptides possèdent maintenant un poids moléculaire de l'ordre de 40 kDa. Cependant, la majorité des pics obtenus sont situés en dessous de 10 kDa. Les hydrolyses menées avec Alcalase et Flavourzyme donnent quant à elles de plus petits peptides puisque la répartition des poids moléculaires commence en dessous de 10 kDa.

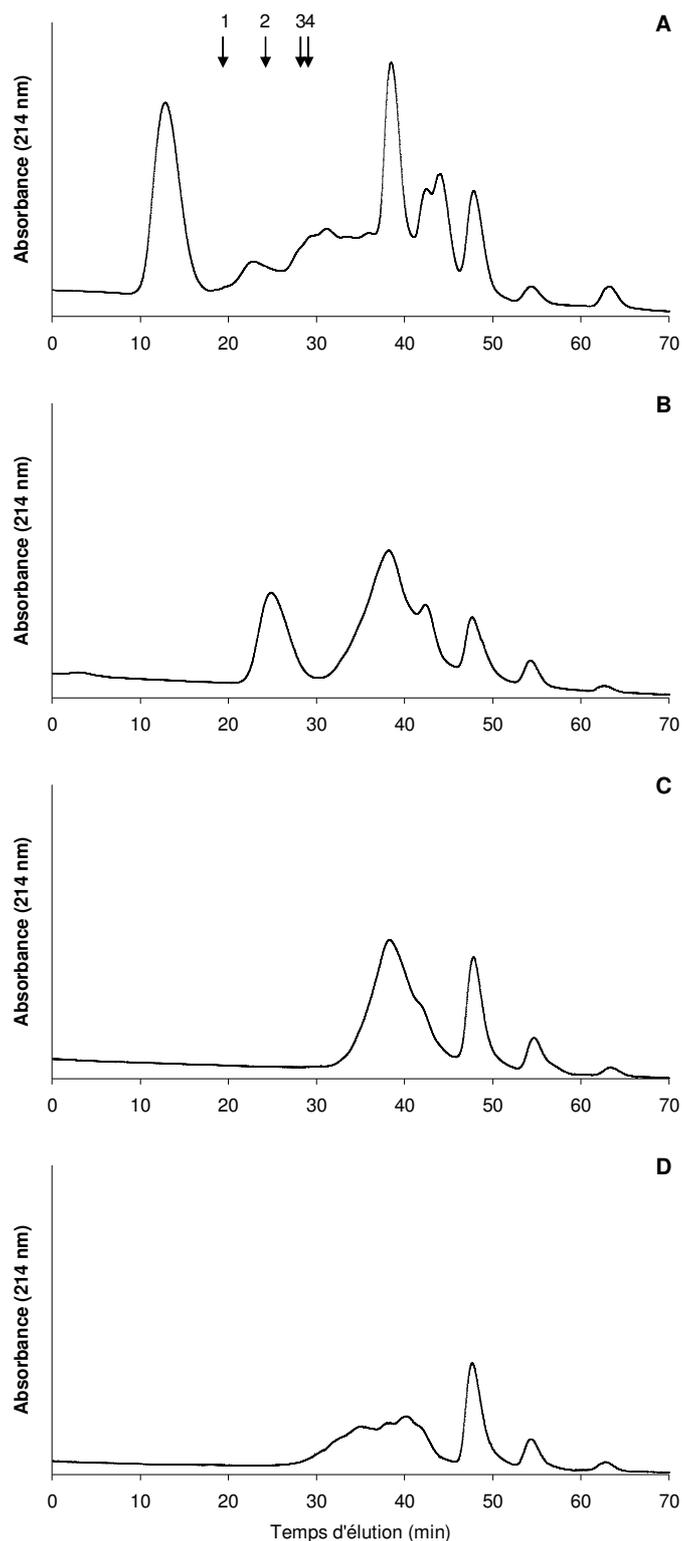


Figure 59 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de têtes de sardine lors des hydrolyses de 24 h à pH 8 et à 50°C. A : têtes de sardine brutes; B: têtes de sardine hydrolysées avec Protamex 0,1%, C : têtes de sardine hydrolysées avec Alcalase 0,1% ; C : têtes de sardine hydrolysées avec Flavourzyme 1,5%. 1: Albumine (67,000 Da); 2: Ovalbumine (43,000 Da); 3: Chymotrypsinogène A (25, 000 Da); 4: Ribonucléase (13,700 Da). Gel filtration chromatograms showing the distribution of heads FPH fraction molecular weight

3.1.1.6. Discussion

Les hydrolyses des têtes de sardine conduites sur 24 h présentent un intérêt puisqu'il a été montré que la cinétique d'hydrolyse, pour chaque expérience, perdurait au moins 22 h. Ainsi, cette étude montre que la réaction d'hydrolyse effectuée sur des têtes de poisson peut être très longue. De manière générale, les hydrolyses menées sur les matrices marines sont réalisées sur des temps courts (principalement entre 1 et 3 h) (Ritchie et Mackie - 1982; Hoyle et Merrit - 1994; Shahidi *et al.* - 1995; Diniz et Martin - 1996; Diniz et Martin - 1997; Simpson *et al.* - 1998; Liaset *et al.* - 2000; Kristinsson et Rasco - 2000a; Kristinsson et Rasco - 2000c; Rousseau *et al.* - 2001; Gildberg et Stenberg - 2001; Ravallec-Plé *et al.* - 2001; Bordenave *et al.* - 2002; Gildberg *et al.* - 2002; Ravallec-Plé et Van Wormhoudt - 2003; Liaset *et al.* - 2003; Sathivel *et al.* - 2003), ces résultats faisant exception des études menées sur les viscères, traitées plus loin dans cette étude. Ainsi, certaines études, dont les cinétiques sont publiées, montrent qu'au bout d'un temps d'hydrolyse court, le plateau n'est pas atteint (Quaglia et Orban - 1990; Hoyle et Merrit - 1994; Shahidi *et al.* - 1995; Liaset *et al.* - 2000; Kristinsson et Rasco - 2000a; Kristinsson et Rasco - 2000c; Sathivel *et al.* - 2003; Linder *et al.* - 2005{Sathivel, Babbit, et al. 2003 #820}). En effet, dans la plupart des cas, le ralentissement de la vitesse de réaction peut être interprété comme un plateau alors que l'hydrolyse continue. D'autres études menées sur des temps de réaction plus longs ont confirmé ce phénomène. Ainsi, au bout de 4 h, l'hydrolyse de co-produits de thon n'est pas achevée (Guérard *et al.* - 2002). Par ailleurs, l'hydrolyse de maquereau conduite avec une protéase commerciale pendant un temps long (25 h) a permis de montrer l'influence du temps sur la libération des acides aminés et leur pouvoir antioxydant (Wu *et al.* - 2003). **Le fait que les hydrolyses menées sur des tissus « durs » (os, cartilages, arêtes) ne s'arrête pas, sur des temps très longs, pourrait être expliqué par le fait que ces tissus durs, au bout d'un moment, sont hydrolysés par les protéases (Rosa Pillevesse - 2006).** Une étude permettant de démontrer cette hypothèse pourrait ainsi être menée dans le cadre d'un travail ultérieur. Il serait alors intéressant de montrer les intérêts (et / ou les inconvénients) de la conduite d'hydrolyses totales.

Protamex est l'enzyme qui permet d'obtenir le plus haut DH (20%). Les valeurs de DH obtenues ici sont du même ordre de grandeur que celles déjà publiées. Sur des sardines entières, pour une activité enzymatique équivalente, Quaglia et Orban obtiennent, avec Alcalase, un DH de l'ordre de 15% (Quaglia et Orban - 1990). Les têtes de hareng hydrolysées par Alcalase dans des conditions similaires aux nôtres, conduisent à un DH de

18% (Sathivel *et al.* - 2003). Liaset *et al.*, en utilisant Alcalase sur des arêtes centrales de saumon et de morue, obtiennent des DH de l'ordre de 20% (Liaset *et al.* - 2000). De hauts DH, entre 25 et 27% ont été obtenus par Gildberg *et al.* sur les hydrolysats d'arêtes centrales de saumon avec Alcalase ou Protamex (Gildberg *et al.* - 2002). Flavourzyme peut également induire des DH importants (plus de 26%) sur des arêtes centrales de carpe, grâce à la conduite d'optimisation des paramètres d'hydrolyse (Sumaya-Martínez *et al.* - 2005). L'inactivation des enzymes endogènes n'induit pas de changement radical dans la conduite de l'hydrolyse, notamment pour Alcalase et Flavourzyme. Il semble qu'il y ait un peu plus d'interactions entre les enzymes endogènes et Protamex, le DH final se situant cependant dans la fourchette de ceux obtenus avec les autres enzymes. Le fait que l'inactivation des enzymes endogènes conduise à des DH du même ordre de grandeur que sans inactivation vient sans doute du fait que, comme montré dans le chapitre 2, les têtes possèdent, dans les conditions étudiées, peu d'activité protéolytique.

La répartition de la matière avant et après protéolyse montre que les hydrolyses enzymatiques menées sur les têtes de sardine permettent de solubiliser la matière (50% de la matière sèche est localisée dans la fraction soluble, contre 19% sans hydrolyse). La solubilisation de la matière, ou la récupération des protéines / de l'azote dans la fraction soluble lors d'hydrolyses enzymatiques ont largement été publiées (Hoyle et Merrit - 1994; Liaset *et al.* - 2000; Kristinsson et Rasco - 2000a; Guérard *et al.* - 2002; Wu *et al.* - 2003; Liaset *et al.* - 2003; Sathivel *et al.* - 2003; Dumay *et al.* - 2004) et demeure un des intérêts les plus importants de ce procédé. En effet, plus les composés issus de l'hydrolyse seront solubles, plus ils seront disponibles pour une éventuelle utilisation ultérieure (cf. p52). Cependant ici, les fractions insolubles demeurent importantes (plus de 30%) du fait de la présence de nombreux tissus « durs ». En effet, ces tissus ne sont pas facilement hydrolysables, et d'autres voies de valorisation sont à envisager. Ce fut par exemple l'objet d'une étude menée en 2001 qui proposait, après avoir conduit une hydrolyse sur des têtes de crevettes, de récupérer les cartilages et carapaces pour produire du chitosan (Gildberg et Stenberg - 2001). En ce qui concerne les fractions huileuses, qui étaient très faibles sans conduite d'hydrolyse (5%), elles deviennent relativement importantes après protéolyse (de 12 à 19%). Peu de lipides demeurent dans les fractions insolubles (~ 15%). Enfin, seul Protamex a permis l'augmentation de la teneur en lipides de la fraction soluble, mais cette concentration demeure faible (6,7 g/100g de matière sèche).

La comparaison des extractions de lipides menées avec ou sans hydrolyse indique qu'au moins 60% les lipides des têtes de sardine peuvent être extraits par hydrolyse enzymatique sans avoir recours aux solvants. En effet, les hydrolyses enzymatiques permettent de distribuer les lipides dans les fractions huileuse et soluble. Ainsi, 58% des lipides des têtes de sardine sont récupérables avec Protamex, 74% avec Alcalase et 98% avec Flavourzyme. Il est également intéressant de noter que l'hydrolyse avec Flavourzyme permet d'obtenir une plus grande quantité totale de lipides que lors de l'extraction conduite sur la matière première par la méthode de Folch. **Ce constat permet d'émettre l'hypothèse que l'hydrolyse enzymatique, en liquéfiant les tissus, permettrait une plus grande accessibilité aux lipides.** Une étude menée au laboratoire a conforté cette hypothèse sur les co-produits de morue hydrolysés, entre autres, par Protamex et Flavourzyme. Et, dans le cas des têtes de morue, Protamex permet une extraction des lipides plus importante que Flavourzyme (Dumay *et al.* - 2004). Ainsi, le comportement des enzymes semble différer en fonction des espèces de poisson hydrolysées. Comme montré dans le paragraphe précédent, Protamex permet de récupérer une partie importante de lipides (23%) dans la fraction soluble. Les lipides pouvant être récupérés dans la fraction soluble sont les lipides possédant un caractère polaire et apolaire, tels que les phospholipides, dont les intérêts sont nombreux (comme décrit dans la partie bibliographique). Liaset *et al.* indiquent en effet que les phospholipides sont principalement localisés dans les fractions solubles et insolubles des hydrolyses enzymatiques menées sur des arêtes de saumon par Protamex (Liaset *et al.* - 2003). Nos résultats obtenus sur la localisation des phospholipides confirment ainsi ces résultats.

Bien que Flavourzyme ait permis l'extraction d'une plus importante quantité de lipides que les autres traitements, cette enzyme ne semble pas être efficace pour la libération des phospholipides. **Protamex est l'enzyme qui permet la plus grande libération des lipides et surtout qui permet leur libération dans la fraction soluble, comme décrit par Liaset *et al.*** Ainsi, les phospholipides de cette fraction pourront être purifiés par des techniques douces, comme la filtration membranaire. Enfin, la conduite d'hydrolyse enzymatiques sur les têtes de sardine permet la libération de 35% des phospholipides initialement présents dans les têtes dans les fractions liquides, *i.e.* leur obtention pourra être réalisée facilement et sans avoir recours aux solvants. Cependant, il faut noter qu'une grande partie des phospholipides (plus de 50%) sont retenus dans la fraction insoluble. Une seconde hydrolyse pourrait être envisagée sur ces culots pour essayer de libérer plus de phospholipides.

L'étude des acides gras des fractions insolubles générées par hydrolyse n'indique aucune différence entre les trois traitements. Par contre, l'étude des fractions liquides (*i.e.* fraction huileuse et fraction soluble) souligne des changements notables. **En effet, Protamex et Flavourzyme se distinguent d'Alcalase par leur faculté à obtenir une importante proportion d'AGPI dans la fraction huileuse et, par conséquent, d'acides gras d'intérêt tels que les acides gras EPA et DHA (Tableau XXX).** Concernant la fraction soluble, il semble que Flavourzyme permette d'obtenir les proportions les plus importantes en AGPI. **Ces résultats, montrant la possible disponibilité de ces acides gras dans la fraction soluble, sont innovants et n'ont pour le moment pas été démontré par ailleurs.** A notre connaissance, rares sont les études ayant porté sur l'hydrolyse des co-produits (hormis les viscères) de poisson et sur les acides gras présents dans les fractions. L'unique étude à ce sujet, réalisée au Laboratoire, avait montré que les acides gras EPA et DHA après hydrolyse enzymatique par Protamex et Flavourzyme sur des têtes de poisson, se trouvaient uniquement dans la fraction insoluble (Dumay *et al.* - 2004). **La présente étude a permis également de montrer un phénomène important : Alcalase semble être néfaste à l'obtention des acides gras poly-insaturés, et notamment à l'obtention de l'EPA et du DHA.** Etant donné l'originalité de cette hypothèse, ces résultats préliminaires devront être confirmés.

Les analyses des peptides réalisées en chromatographie d'adsorption montrent une différence entre les échantillons natifs et hydrolysés. En effet, le chromatogramme obtenu avec les têtes non hydrolysées révèle la présence d'un pic correspondant à des composés de haut poids moléculaire. Ces composés correspondent sans doute à des protéines solubles et natives n'ayant pas été déstructurées. Après hydrolyse, les profils se sont modifiés et les poids moléculaires des peptides sont plus faibles, surtout concernant les hydrolyses menées avec Alcalase et Flavourzyme où la quasi-totalité des peptides générés ont une taille inférieure à 10 kDa. Avec Protamex, un pic de taille supérieure subsiste. **Mis à part ce pic, qui pourra être séparé en utilisant la même technique de chromatographie d'adsorption, il est intéressant de noter que tous les peptides générés ont une taille inférieure à 10 kDa, ce qui représente un atout pour une utilisation potentielle dans les domaines de la nutrition humaine et de l'alimentation animale.** En effet, les hydrolysats doivent être de taille inférieure à 10 kDa afin de prévenir de tout risque de maladie à prion (ESB, tremblante du mouton...). D'un autre côté, il est important de ne pas réduire de façon trop importante la taille des peptides car les propriétés fonctionnelles (émulsion, solubilité, faible amertume...) des composés diminue avec le poids moléculaire (Quaglia et Orban - 1987b; Quaglia et Orban

- 1990; Gildberg - 1993). Cependant, le fait de couper des protéines permet d'obtenir des composés possédant une activité biologique (Rousseau *et al.* - 2001; Ravallec-Plé *et al.* - 2001; Guérard *et al.* - 2001) et, dans certains cas, plus ils sont petits, plus ils sont actifs (Je *et al.* - 2005). Ainsi, il est important de choisir entre activité biologique et propriétés fonctionnelles de façon à identifier le ou les produit(s) au plus fort potentiel économique.

Cette première étape concernant l'hydrolyse des têtes de sardine a donc permis de montrer l'importance de mener les expériences sur de longues durées. Lors de l'optimisation de ces hydrolyses, il conviendra de définir un domaine de durée d'hydrolyse suffisamment étendu (au moins 24 h). Les comparaisons des résultats obtenus avec les trois enzymes indiquent que Protamex semble l'enzyme la plus prometteuse. En effet, Protamex permet d'obtenir le DH le plus important et une répartition des peptides similaire à celles obtenues par les autres traitements. Concernant les réponses lipidiques, Alcalase, compte tenu des résultats obtenus avec les AGPI, ne pourrait être un bon modèle d'étude. Protamex permet l'obtention de la plus grande quantité de phospholipides et une quantité intéressante d'AGPI. Flavourzyme est quant à elle l'enzyme qui permet l'extraction la plus importante de lipides et les AGPI dans la fraction soluble y sont en proportion plus importante. Cependant, dans un souci économique, Flavourzyme étant 50% plus onéreuse et 30 fois moins active à concentration égale, Protamex semble le choix le plus pertinent. Par conséquent, si l'optimisation de l'hydrolyse enzymatique ne se faisait qu'avec une seule enzyme, Protamex serait l'enzyme à utiliser.

It has been demonstrated, for each experiment, that the reaction is almost stopped around 22 h, not before. Such long time hydrolyses reveal that they length at least 22 h on sardine heads. However, generally, hydrolysis are conducted in short duration (mainly between 1 and 3 h) (Ritchie et Mackie - 1982; Hoyle et Merrit - 1994; Shahidi et al. - 1995; Diniz et Martin - 1996; Diniz et Martin - 1997; Simpson et al. - 1998; Liaset et al. - 2000; Kristinsson et Rasco - 2000a; Kristinsson et Rasco - 2000c; Rousseau et al. - 2001; Gildberg et Stenberg - 2001; Ravallec-Plé et al. - 2001; Bordenave et al. - 2002; Gildberg et al. - 2002; Ravallec-Plé et Van Wormhoudt - 2003; Liaset et al. - 2003; Sathivel et al. - 2003), results excepted those obtained on viscera, which will be studied later in this study. Therefore, some studies on hydrolysis kinetics show that the plateau is not reached (Quaglia et Orban - 1990; Hoyle et Merrit - 1994; Shahidi et al. - 1995; Liaset et al. - 2000; Kristinsson et Rasco - 2000a; Kristinsson et Rasco - 2000c; Sathivel et al. - 2003). In most cases, the observed slow

down could be interpreted as a plateau, but hydrolysis is not finished. Few studies on longer hydrolysis time have also confirm our data. Thus, 4 h hydrolysis of tuna waste is not enough to obtain a complete hydrolysis (Sathivel, Babbit, et al. 2003 #820) Guérard et al. - 2002). Another study on mackerel hydrolysis with a commercial protease during a long period (25 h) has pointed the influence of reaction time on the amino acid release and their anti-oxidative properties (Wu et al. - 2003). **The fact that proteolysis performed on hard matrixes (such as cartilage or bones) doesn't stop, even after a long reaction time, could be explained by the partial hydrolysis of the bones and cartilage.** Such hypothesis should be demonstrated by additional experiments. Hence, it should be then interesting to show advantages (and disadvantages) of the total hydrolysis.

Protamex is the enzyme which enables to obtain the higher DH (20%). DH values obtained here are in the same range than those already published. On sardine, with the same Alcalase activity, Quaglia and Orban obtained DH around 15% (Quaglia et Orban - 1990). Herrings heads treated with Alcalase, in similar conditions than ours, give a DH of 18% (Sathivel et al. - 2003). DH around 20% has been obtained by Liaset *et al.*, with Alcalase on salmon and cod backbone (Liaset et al. - 2000). High DH, between 25 and 27%, have been obtained by Gildberg *et al.* on salmon backbone hydrolysate with Alcalase and Protamex (Gildberg et al. - 2002). Finally, Flavourzyme can also induce high DH (more than 26%) on carp backbone, with optimization of the hydrolysis parameters (Sumaya-Martínez et al. - 2005). Inactivation of endogenous enzymes do not conduce to a high modification in hydrolysis kinetic, especially with Alcalase and Flavourzyme. It seems that there is more interaction between Protamex and endogenous enzymes, but the obtained DH is in the same range as other hydrolyses. The fact that endogenous enzyme inactivation leads to same DH indicates, as shown in chapter 2, that heads do not possess high proteolytic activity, in our hydrolysis conditions.

Distribution of dry matter comparison before and after conducting proteolysis shows that hydrolysis solubilizes the matter (50% of the matter is localized in soluble fraction while only 19% were in this fraction without treatment). Matter solubilization, or protein / nitrogen recovery on soluble phase (named principally Fish Protein Hydrolysate) are widely published (Hoyle et Merrit - 1994; Liaset et al. - 2000; Kristinsson et Rasco - 2000a; Guérard et al. - 2002; Wu et al. - 2003; Liaset et al. - 2003; Sathivel et al. - 2003; Dumay et al. - 2004) and is one of the most important property researched. The more soluble the compounds are, the more available for potential use (see p52) they will be. However, in our

case, the insoluble fraction remains important (more than 30%) due to the high hard compounds content, which are not easily hydrolysed (bones, cartilages). Hence, those hard compounds could be recovered in order to be up-graded with other techniques. It was notably the aim of a study published in 2001 which proposed, after hydrolysis conducting on shrimp wastes, to extract chitosan from shells and carapaces (Gildberg et Stenberg - 2001). Oily fraction, which was very low without hydrolysis (5%), become interesting after hydrolysis (from 12 to 19%). Few lipids are still localized in insoluble fractions (around 15%). Finally, only Protamex has allowed to increase the lipid contents in the soluble fractions, but these concentrations remain low (6.7 g/100g of dry matter).

The comparison of lipid extraction with or without hydrolysis indicates that at least 60% of sardine heads lipids are extracted with hydrolysis and without solvents. Indeed, proteolysis allows the localization of lipids in oily and soluble fractions. Hence, 58% of lipids are recovered in these fractions with Protamex, 74% with Alcalase and 89% with Flavourzyme. It is also interesting to notice that Flavourzyme hydrolysis leads to a higher lipid extraction than Folch extraction. **Thus, we can suppose that hydrolysis provides a higher lipid accessibility by the solubilization of the matrix.** A study conducted in our Laboratory on hydrolysed cod by-products with Protamex and Flavourzyme confirm those results: Protamex provided a better lipid extraction than Flavourzyme (Dumay et al. - 2004). Thus, it seems that enzyme behavior is different according to the fish species. As shown before, Protamex permits to recover an important lipid fraction (23%) in the soluble phase, which could be further interesting. Indeed, lipids obtained in the soluble fraction are lipids with polar and apolar parts, such as phospholipids, which present numerous interests, as described in the bibliography part. Liaset *et al.* indicate that phospholipids are mainly localized in the soluble or insoluble fractions of Protamex salmon frames hydrolysates (Liaset et al. - 2003). Our results are in accordance with this study.

Even though Flavourzyme has allowed a higher lipid extraction than the two other treatments, it seems that this enzyme is not accurate for the phospholipid obtention. **Protamex is the enzyme which allows the highest phospholipid extraction, and especially their release in the soluble fraction, as described by Liaset *et al.*** Thus, phospholipids contained in this fraction could be further purified using mild procedures, such as membrane filtration. Hydrolysis on sardine heads allows the liberation of 35% of phospholipid in the liquid fractions. Finally, it has to be noticed that an important part (more than 50%) of the

phospholipids are still localized in the insoluble fraction. A second hydrolysis on this sludge could be considered in order to remove those lipids.

The fatty acid study of the insoluble fraction does not reveal any difference regardless of the enzyme used. The interest is more localized in the liquid fractions (soluble and oily fractions) study, where differences have been pointed out. **Indeed, Protamex and Flavourzyme are different from Alcalase by their high PUFA contents in oily fraction, and consequently, their high EPA and DHA contents.** Concerning the soluble fraction, Flavourzyme allows the highest PUFA proportions. Those results showing the disponibility of such fatty acids are innovative and have not been published yet. According to our knowledge, by-product hydrolysis studies focused on fatty acid distribution among fractions generated are seldom (except on viscera, where few studies have been written, but it will be mentioned later). The only one study found, is one realized at the Laboratory, which has shown that EPA and DHA fatty acids were localized in the soluble fraction of Protamex and Flavourzyme cod heads hydrolysate (Dumay et al. - 2004). **At least, the present study has shown an important phenomenon: Alcalase seems to have a negative effect for the PUFA obtention, especially EPA and DHA (Tableau XXX).** This new and original hypothesis has to be confirmed by other experiments.

Gel filtration peptide analysis shows differences induced by hydrolysis. Raw material chromatogram indicates the presence of high molecular weight compounds. Those compounds are surely soluble native proteins. After proteolysis, this peak has disappeared with Alcalase and Flavourzyme treatment indicating that those proteins have been hydrolyzed, molecular weight distributions are below 10 kDa. With Protamex, one peak of high molecular weight compounds still exists. **Excepting this peak, which could be isolated by further chromatographic techniques (such as gel filtration), it is important to mention that all generated peptides have molecular weights below 10 kDa, which is an advantage for their use in feed or fed.** Indeed, hydrolysates must have low molecular weight (below 10 kDa), in order to prevent prion disease risks (spongiform encephalopathies, goat and sheep scrapie...). But it is well known that shortening protein reduce their functional properties (emulsification, solubility, low bitterness...) (Quaglia et Orban - 1987b; Quaglia et Orban - 1990; Gildberg - 1993). On the other hand, cutting protein in peptides could reveal biological activities (Rousseau et al. - 2001; Ravallec-Plé et al. - 2001; Guérard et al. - 2001), and in some cases, the shorter they are, the more active they are (Je et al. - 2005). So, a choice has

to be made between biological and functional properties in order to identify the most valuable products.

Consequently, this first sardine heads hydrolysis step has permitted to point out the importance of long time hydrolysis in order to have an overview of the hydrolysis behaviour. During the optimization step, it will be convenient to plan a wide time range (at least 24 h). Enzyme comparison indicates that Protamex seems to be the most promising enzyme. Indeed, Protamex conducts to the highest DH value and a peptide repartition quasi-similar to other treatments. Concerning lipidic responses, Alcalase, with such PUFA hypothesis will be not considered as an efficient model. Phospholipids are highly extracted with Protamex and PUFA are largely distributed with such treatment. Flavourzyme gives also good results for lipid extraction (the highest) and PUFA localized in the soluble fraction are important. However, Protamex combines all the tested points and economically, Flavourzyme is 50% more expensive and 30 times less active (for equal concentration). Hence, if optimization should be conducted with single enzyme, Protamex would be the enzyme to use.

3.1.2. Hydrolyses multi-enzymatiques : effet de la conjugaison des enzymes

3.1.2.1. Cinétique et répartition de la matière

L'évolution des hydrolyses menées avec plusieurs enzymes simultanément est reportée sur la Figure 60.

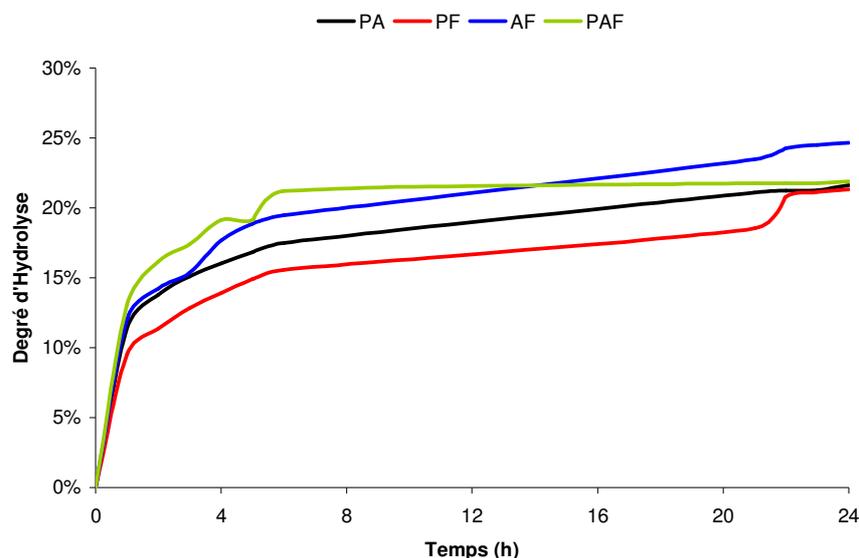


Figure 60 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse combinée des têtes de sardine par Protamex (0,1%, P), Alcalase (0,1%, A) et Flavourzyme (1,5%, F) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C. *DH evolution during 24 h multi-enzymes hydrolysis of sardine heads with Protamex, Alcalase and Flavourzyme*

Les cinétiques d'hydrolyse sont similaires quel que soit le traitement et les DH obtenus de même ordre de grandeur (22% pour Protamex-Alcalase, 21% pour Protamex-Flavourzyme, 25% pour Alcalase-Flavourzyme et 22% pour Protamex-Alcalase-Flavourzyme). Chaque hydrolyse connaît la même évolution, *i.e.* une croissance très rapide les deux premières heures où le DH sont de l'ordre de 11 à 16%, puis une croissance plus lente jusqu'à la 6^{ème} heure d'hydrolyse. Les DH sont alors de l'ordre de 15-20%. S'ensuit alors une croissance très faible de l'hydrolyse jusqu'à la 24^{ème} heure, voire l'obtention d'un plateau dans le cas où les 3 enzymes sont utilisées conjointement.

La répartition de la matière au sein des fractions générées par les hydrolyses conduites avec plusieurs enzymes est représentée par la Figure 61.

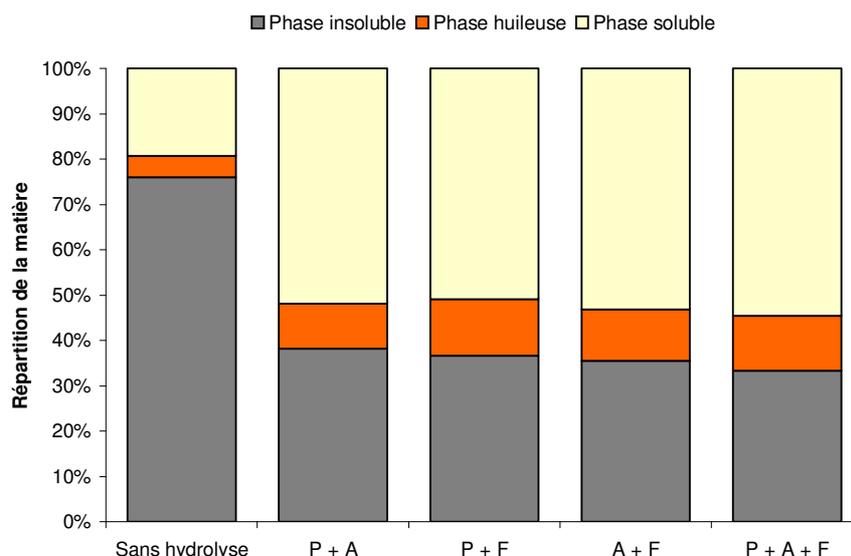


Figure 61 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les têtes de sardine non hydrolysées et hydrolysées avec plusieurs enzymes (P : Protamex, A : Alcalase, F : Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Dry matter repartition among soluble, oily and insoluble fractions generated by sardine heads 24 h multi-enzymes hydrolysis*

Cette étude montre que, quel que soit les mélanges enzymatiques utilisés, la répartition de la matière sèche au sein des trois fractions est la même. Une grande partie de la matière, se retrouve solubilisée puisque sans hydrolyse, la fraction soluble ne comportait que 19% de la matière et que, après hydrolyse, plus de 50% (51-55%) de la matière sont localisés dans cette fraction. La fraction huileuse est aussi plus importante après hydrolyse : 10 à 13% au lieu des 5% initiaux. Seule la fraction insoluble a perdu de la matière au cours de l'hydrolyse et ces fractions ne comportent plus que 33 à 38% de la matière.

Le Tableau XXXI recense les teneurs en lipides contenus dans ces trois fractions.

Tableau XXXI : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse combinée des têtes de sardine par Protamex (P), Alcalase (A) et Flavourzyme (F) à pH 8, 50°C et pendant 24 h. *Lipid content in fractions after 24 h multi-enzymes sardine heads hydrolysis*

	Sans hydrolyse	P + A	P + F	A + F	P + A + F
Phase insoluble	23,2± 0,6	18,0± 0,3	12,7± 0,7	17,2± 0,4	16,3± 0,1
Phase huileuse	84,6± 2,1	79,6± 3,2	81,8± 4,4	81,3± 2,1	78,2± 6,1
Phase soluble	5,6± 0,9	2,8± 0,2	2,9± 0,3	2,6± 0,2	3,3± 0,2

A l'instar de la répartition de la matière, les concentrations en lipides au sein de ces trois fractions sont identiques quel que soit le traitement enzymatique effectué, à savoir ~ 80 g de lipides pour 100 g de matière sèche dans la fraction huileuse, 16 g/100g dans la fraction insoluble et 3 g/100g dans la fraction soluble. Ainsi, avec de tels traitements, les trois

fractions générées par hydrolyse multi-enzymatique sont plus pauvres en lipides que celles obtenues sans hydrolyse.

3.1.2.2. Libération des lipides

L'extraction globale des lipides est moins importante après avoir conduit une hydrolyse multi-enzymatique que par extraction par solvants (Figure 62). En effet, l'analyse des variances montre que toutes les protéolyses menées induisent une extraction des lipides significativement inférieure (au seuil de 5%) à celle obtenue par extraction chimique. L'hydrolyse des têtes de sardine par le couple Protamex-Alcalase se distingue des autres traitements puisqu'elle permet d'extraire 80% des lipides. Les autres hydrolyses, identifiées comme statistiquement identiques pour l'extraction des lipides, ne permettent d'extraire que ~70% des lipides. La majorité des lipides est localisée dans la fraction huileuse (47% pour Protamex-Alcalase et jusqu'à 62% pour Protamex-Flavourzyme). La fraction soluble recèle quant à elle moins de 10% des lipides totaux. Quoi qu'il en soit, quel que soit le mélange enzymatique effectué, environ 45% des lipides extraits classiquement par solvants peuvent, grâce à l'hydrolyse combinée des têtes de sardine, être récupérés dans les fractions liquides.

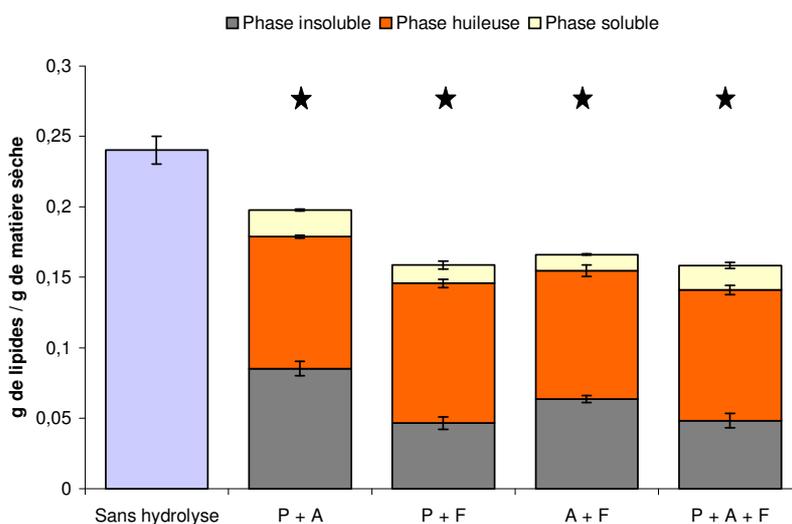


Figure 62 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses combinées réalisées sur les têtes de sardine en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex (P) ou Alcalase (A) et 1,5% de Flavourzyme (F). « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Lipid distribution among the fractions generated after 24 h multi-enzymes hydrolysis of sardine heads compared to the lipid content in the raw material (in blue)*

3.1.2.3. Distribution des phospholipides

La distribution des phospholipides après hydrolyse multiple des têtes de sardine est indiquée sur la Figure 63. Les quantités totales de phospholipides ne diffèrent pas de façon significative de celle obtenue sans hydrolyse (au seuil de 5%). Environ 60 à 70% des phospholipides sont localisés dans la fraction insoluble, alors que les deux autres fractions possèdent chacune moins de 20%. Ainsi, lors des hydrolyses menées avec 2 enzymes, 30% des phospholipides pourront être récupérés dans les fractions liquides, 40% lorsque l'hydrolyse est menée avec les trois enzymes.

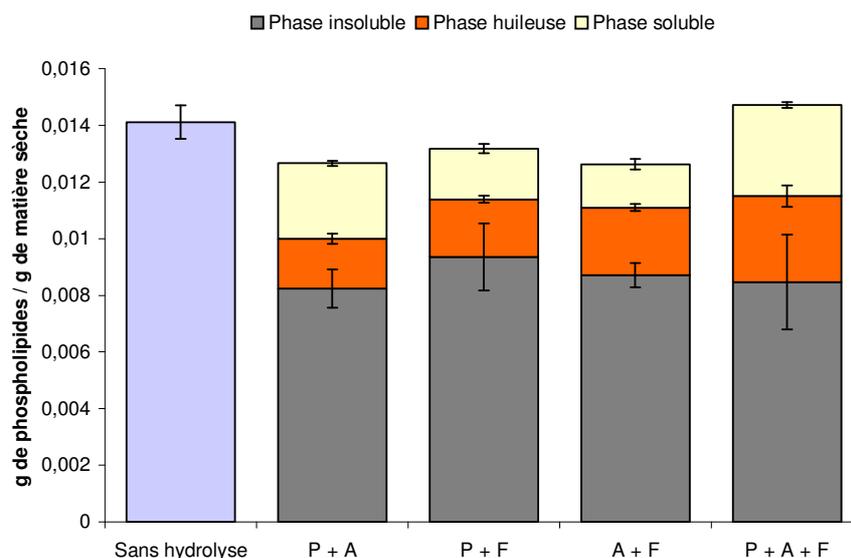


Figure 63 : Distribution des phospholipides parmi les phases insolubles, huileuses et solubles des hydrolyses combinées réalisées sur les têtes de sardine en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Phospholipid distribution among the fractions generated after 24 h multi-enzymes hydrolysis of sardine heads compared to the phospholipid content in the raw material (in blue)*

3.1.2.4. Profils moléculaires des peptides

Les profils de répartition des poids moléculaires des peptides sont représentés Figure 64. Ces profils sont similaires quel que soit le traitement enzymatique réalisé. En effet, il subsiste pour chaque hydrolyse un pic correspondant à des composés de haut poids moléculaire (> 67 kDa) puis ensuite, la majorité des pics correspond à des composés de taille inférieure à 10 kDa.

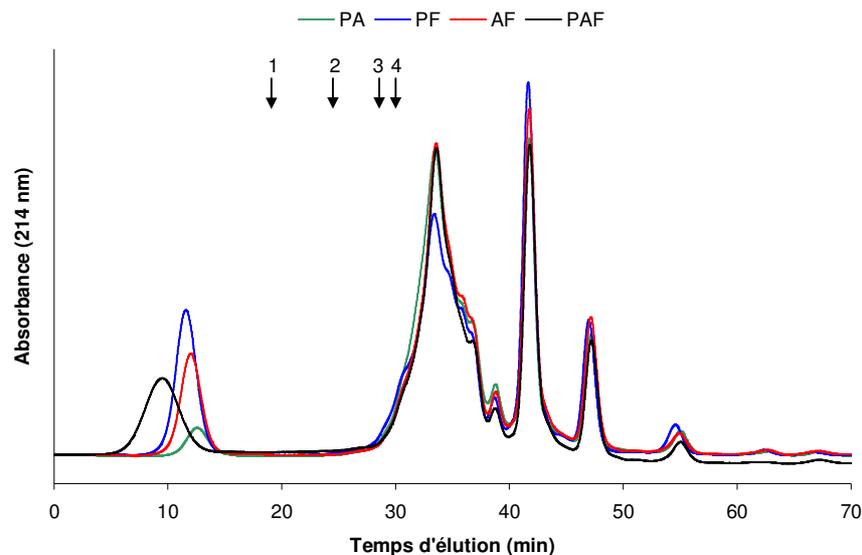


Figure 64 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de têtes de sardine lors des hydrolyses combinées de 24 h à pH 8 et à 50°C. PA : Protamex (0,1%) + Alcalase (0,1%) ; PF : Protamex (0,1%) + Flavourzyme (1,5%) ; AF : Alcalase (0,1%) + Flavourzyme (1,5%) ; PAF : Protamex (0,1%) + Alcalase (0,1%) + Flavourzyme (1,5%). 1: Albumine (67000 Da); 2: Ovalbumine (43000 Da); 3: Chymotrypsinogène A (25000 Da); 4: Ribonucléase (13700 Da). Gel filtration chromatograms showing the distribution of multi-enzymatic heads FPH fraction molecular weight

3.1.2.5. Discussion

A ce jour et selon nos connaissances, aucune étude portant sur des hydrolyses enzymatiques utilisant plusieurs enzymes de façon simultanée n'a été publiée.

Les cinétiques d'hydrolyse obtenues en combinant les enzymes ont le même profil que la plupart des hydrolyses enzymatiques décrites dans la littérature. En effet, cette cinétique peut être découpée en deux phases distinctes ; une première phase où la vitesse de réaction est rapide qui correspond à la rupture des liaisons peptidiques accessibles facilement, et une seconde étape, où la vitesse de réaction diminue, qui correspond cette fois à l'hydrolyse de protéines plus compactes (Liaset *et al.* - 2000). **La combinaison des enzymes sur l'hydrolyse des têtes de sardine induit une faible augmentation des DH obtenus.** En effet, alors que ceux-ci étaient situés aux alentours de 15 à 20% lors d'hydrolyses mono-enzymatiques, les DH obtenus en combinant les enzymes sont de l'ordre de 21 à 25%. Pourtant, en combinant les enzymes, la quantité d'enzyme est augmentée en fonction du nombre d'enzymes présentes dans le mélange réalisé (d'un facteur 2 ou 3). Ainsi, nous avons vu lors de l'étape précédente que les têtes hydrolysées avec Protamex durant 24 h conduisait à un DH de 21%. Dans les mêmes conditions, si la même quantité d'Alcalase (0,1%) est ajoutée, le DH au bout de 24 h est de 22%. Ainsi, il semble que les quantités d'enzymes

choisies soient suffisantes pour réaliser l'hydrolyse la plus complète possible en 24 h. Il est cependant important de noter que le même DH est obtenu plus rapidement en combinant plusieurs enzymes que avec une seule. En effet au bout de 3 h d'hydrolyse, le DH obtenu avec Protamex est de 6% alors qu'il s'élève à 15% avec Protamex et Alcalase. Ainsi, en combinant les enzymes, il est plus facile d'obtenir un plateau à la fin de la réaction. **La combinaison d'enzymes semble alors avoir un effet lorsque les hydrolyses sont menées sur des temps d'hydrolyse courts. Ainsi, si l'objectif de l'hydrolyse est d'obtenir de haut DH, il est alors économiquement intéressant de travailler avec plusieurs enzymes.**

Comme évoqué précédemment dans le cas d'hydrolyses simples, l'hydrolyse multi-enzymatique des têtes de sardine permet une solubilisation de la matière. En effet, plus de 60% de la matière sèche totale est localisée dans les fractions liquides. Ces profils enregistrés en combinant les enzymes sont quasi-identiques à ceux relevés dans le cas d'hydrolyses mono-enzymatiques, résultat qui peut être expliqué par les DH similaires obtenus dans les deux études. Seule une légère différence peut être relevée au niveau de la proportion de matière retrouvée dans la fraction huileuse. En effet, lors d'hydrolyses simples, environ 20% de matière étaient localisés dans ces fractions alors que l'hydrolyse multiple ne conduit à une récupération de matière dans cette fraction que de 10 à 13%. Par ailleurs, aucun enrichissement en lipides n'a été enregistré dans les trois fractions. La fraction insoluble possède la teneur en lipides la plus élevée (de l'ordre de 16%) alors que ce sont ces lipides les plus difficiles à extraire sans avoir recours aux solvants. **Ainsi, il semble que, pour la répartition de la matière et l'enrichissement en lipides des fractions, l'utilisation conjointe de plusieurs enzymes n'améliore pas les résultats obtenus par rapport à ceux obtenus lors d'hydrolyses mono-enzymatiques.**

Une fois de plus, l'utilisation simultanée de plusieurs enzymes pour hydrolyser les têtes de sardine en vue de la récupération des lipides ne semble pas être pertinente par rapport à l'utilisation d'une seule enzyme. En effet, les rendements d'extraction des lipides ne sont pas améliorés avec l'utilisation de plusieurs enzymes, où chaque hydrolyse menée conduit à une extraction plus faible des lipides par rapport à une extraction classique (70 à 80% des lipides sont obtenus alors que lors d'une extraction simple, de 83 à plus de 100% avaient été extraits). Ainsi, malgré l'augmentation du DH lorsque les hydrolyses sont menées avec plusieurs enzymes, l'extraction de lipides n'est pas améliorée. **Il semble donc bien que les réponses concernant le DH et l'extraction de lipides ne soient pas corrélées.** De plus, la fraction insoluble, possède une partie importante de lipides (de 30 à 43%), à la défaveur des fractions

liquides qui voient leur quantité de lipides diminuer avec l'utilisation conjointe de plusieurs enzymes. En effet, alors que les hydrolyses simples permettaient de récupérer, sans avoir recours au solvants de 58 à 89% des lipides totaux, les hydrolyses multiples ne permettent de n'en récupérer que environ 45%. **Concernant l'extraction des lipides, l'utilisation conjointe de plusieurs enzymes ne semble pas justifiée.**

Les quantités de phospholipides dosées après hydrolyse multiples sont quant à elles équivalentes à celle obtenue sans hydrolyse. Cependant, la majeure partie des phospholipides est retenue dans la fraction insoluble et ne pourra pas être récupérée, à ce stade, sans avoir recours au solvants. Seuls 30 à 40% des phospholipides sont localisés dans les fractions liquides, ce qui correspond approximativement à la quantité obtenue précédemment.

Les profils moléculaires des peptides générés donnent des résultats similaires, quel que soit le mélange effectué. Le pic trouvé lors de l'analyse de l'hydrolysate obtenu avec Protamex est ici retrouvé dans toutes les fractions. **Quoi qu'il en soit, aucune différence n'est notée par rapport aux tendances obtenues lors des hydrolyses simples, et la répartition des poids moléculaires n'est pas non plus un argument de choix en faveur des hydrolyses combinées.**

Alors que les hydrolyses menées avec des enzymes isolées offraient de bonnes perspectives, comme la récupération des lipides et phospholipides, tout en pouvant potentiellement utiliser la fraction protéique, les hydrolyses menées en combinant les enzymes ne permettent pas d'augmenter ces capacités. En effet, les DH obtenus sont du même ordre de grandeur (mais sont obtenus plus rapidement), les quantités de lipides obtenues sont plus faibles et les phospholipides, bien que légèrement extraits en plus grande quantité, se retrouvent dans la fraction insoluble. De même, les peptides générés par ces deux procédés ne semblent pas différents. Qui plus est, le fait d'ajouter des enzymes induit une augmentation du coût. Or les enzymes représentent une charge récurrente importante dans ce type de procédé (Quaglia et Orban - 1987a). Ainsi, l'utilisation d'enzymes multiples pour l'hydrolyse des têtes de sardine ne semble pas justifiée.

Ainsi, comme évoqué lors de la conduite des hydrolyses simples, des trois enzymes testées, Protamex semble être le choix le plus judicieux puisque, avec un coût modéré (par rapport à Flavourzyme), cette enzyme est celle qui permet d'obtenir le plus haut DH, la

fraction huileuse la moins contaminée, la plus importante partie de lipides dans la fraction soluble et la récupération la plus importante des phospholipides, sans négliger la qualité des acides gras présents dans les lipides. Protamex a donc été l'enzyme choisie pour réaliser l'optimisation de l'hydrolyse des têtes de sardine afin de libérer le plus possible de lipides et de phospholipides.

To our knowledge, none publication has reported the use of enzyme combination in protease hydrolysis.

*The kinetics of the DH evolution during enzyme combination hydrolysis in the present study are in accordance with earlier studies on traditional hydrolysis, describing the overall reaction as two first-order processes: one initial fast reaction in which loosely bound polypeptide chains are cleaved from an insoluble protein particle, a second slower reaction in which the more compact core protein is digested (Liaset et al. - 2000). **Enzyme combination on heads hydrolysis conducts to a slight DH increase.** Indeed, while DH were ranged from 15 to 20% in single enzyme treatment, DH obtained with several enzymes are around 21 to 25%. Nevertheless, with enzyme combination, the total enzyme quantity introduced in the system is higher (2 or 3 times more). Hence, we have seen previously that Protamex leads after 24 h, to a 21% DH. In the same conditions, with the same quantity of Alcalase added (0.1%), we obtain a 22% DH. However, it is important to notice that the same DH is obtained more rapidly with multi-enzymes hydrolysis: in 3 h hydrolysis, DH obtained with Protamex alone is 6% while Protamex + Alcalase conduce to a 15% DH. At the end of reaction time, it is now possible to visualize a plateau (for the three enzyme treatment). Enzyme combination should be appropriate only when hydrolysis time is short. Hence, if the goal of the hydrolysis is a high DH obtention, it should be economically valuable to use multi-enzyme treatment.*

*As mentioned earlier in single enzyme hydrolysis, the use of several enzymes leads to the matter solubilization where more than 60% of the matter is localized in liquid fractions. Multi-enzymes dry matter repartitions are similar than those obtained with single enzyme treatment, which could be explained by the similar DH obtained. Just a slight difference is observed concerning matter in oily fraction which is ranged from 10 to 13% while it was around 20% with single enzyme. Moreover, none fraction have been enriched in lipid. Insoluble fraction possess the highest lipid content (around 16%) and those lipids are the more difficult to extract by mean of sustainable procedures. **Thus, it seems that, concerning***

matter distribution and lipid enrichment in liquid fraction, enzyme combination is as accurate as single enzyme hydrolysis.

One more time, multi-enzymatic treatment is not as efficient as single enzyme hydrolysis. Lipid extraction yields are lower than those obtained without hydrolysis: 70 to 80% of lipids have been recovered after multi-enzymes hydrolysis, while mono-enzyme reaction has lead from 83 to more than 100%. Thus, despite the higher DH obtained with multi-enzymes, lipid extraction is not enhanced, showing that DH and lipid extraction are not correlated. Moreover, insoluble fraction possesses a high lipid part (from 30 to 43%), which is an drawback for soft lipid removal. This kind of experiments enables the release of around 45% of lipids, while previous results were around 58 to 89%. Concerning lipid extraction, multi-enzymes treatment is also not justified.

Phospholipid quantities obtained after enzymatic treatment are equal to those obtained without hydrolysis. Moreover, the main part of phospholipids are located in the insoluble fraction. Around 30 – 40% of phospholipids are located in liquid fractions, corresponding to quantities removable with single enzyme hydrolysis. In the same way, molecular weight distribution after this step conducts to the same profiles as those obtained previously (especially with Protamex hydrolysis). So results obtained on phospholipids and molecular weight distribution do not claim to the multi-enzymes treatment.

Peptides molecular weight profiles are similar regardless the treatment realized. The high molecular weight peak found former with Protamex is now found in all profiles. Anyway, none difference is noticed compared to tendencies obtained during single hydrolysis, and the molecular weight repartition doesn't represent an accurate criteria for the use of combined enzymes.

While single enzyme hydrolyse leads to efficient lipid and phospholipid recoveries, and valuable proteinic fraction, multi-enzymes hydrolysis do not enhance any of those characteristics. DH were similar, lipids quantities are lower and phospholipids are mainly located in the insoluble fractions. Peptides generated by the 2 processes are not different. Moreover, enzyme combination leads to a significant increase of the process costs. Enzymes are the more expensive component of this kind of process (Quaglia et Orban - 1987a). Thus, enzyme combination is not a pertinent choice for sardine heads hydrolysis.

Hence, as mentioned during single enzyme step, the most efficient enzyme is Protamex, due to its moderate cost (in opposition to Flavourzyme), its high DH, its oily fraction (with the less contamination), the highest lipid recovery in soluble fraction and the highest phospholipid extraction, without forgiven the quality of fatty acids obtained. Protamex has then be chosen for the realization of sardine heads hydrolysis optimization in order to obtain the highest lipids and phospholipids releasing.

3.1.3. Optimisation de l'hydrolyse

Durant cette phase, toutes les hydrolyses ont été menées avec Protamex, à pH 8 et en ajoutant au milieu réactionnel 1 volume d'eau.

3.1.3.1. Conduite du plan d'expériences et détermination des conditions optimales

Les réponses obtenues pour chaque valeur du plan d'expériences sont reportées dans le Tableau XXXII. Le plus grand DH a été obtenu lors de l'expérience n°1, qui correspond à une hydrolyse de longue durée (22 h), une température faible (36°C) et une quantité d'enzyme importante (0,23%, p/p). Le DH s'élevait ainsi à 28%. A l'opposé, le plus petit DH a été obtenu lors de l'expérience n°11 (DH = 7%), qui correspond à une hydrolyse courte (6 h), une faible température et une concentration en enzyme faible (0,07%, p/p). Ainsi, au vu de ces résultats, il semble que pour obtenir un haut DH, il faille réaliser une hydrolyse sur un temps long en utilisant une grande quantité d'enzyme.

Concernant les lipides, deux réponses ont été étudiées :

- les lipides totaux pour évaluer la quantité de lipides réellement présente dans la matrice
- les lipides libérés qui correspondent aux lipides récupérés dans les fractions liquides et qui pourront être obtenus sans avoir recours aux solvants.

De manière générale, le comportement de ces deux réponses est identique lors de la variation des paramètres. L'expérience n°9 est celle permettant d'obtenir le plus de lipides avec un temps d'hydrolyse et une température faibles (6 h, 36°C), mais avec une forte concentration en enzyme (0,23%, p/p). Lors de cette expérience, la quantité totale de lipides extraits est de 0,29 g/g de matière sèche, ce qui correspond à une augmentation de 27% par rapport à une extraction classique. La quantité de lipides libérés est quant à elle de 0,20 g/g de matière sèche, permettant ainsi la récupération de près de 70% des lipides totaux.

L'expérience n°4 conduit à l'extraction de lipides la plus faible, correspondant à un temps très long d'hydrolyse et à une température et une concentration en enzyme moyenne (27h30, 43°C, 0,15%, p/p). Avec cette hydrolyse, la quantité totale de lipides est de 0,19 g/g de matière sèche sont seulement 0,09 g/g se retrouvent dans les parties liquides. Paradoxalement, l'expérience permettant l'extraction de lipides la plus importante conduit à un faible DH (9%) et celle la moins intéressante pour les lipides à un DH élevé (23%).

Tableau XXXII : Réponses concernant le degré d'hydrolyse, les lipides et les phospholipides (somme des trois fractions et somme des fractions liquides *i.e.* fractions soluble et huileuse) obtenus après avoir réalisé le plan d'expériences visant à optimiser l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex. Responses for Degree of Hydrolysis, lipids and phospholipids (sum of all fractions and sum of oily and aqueous fractions *i.e.* liquid fractions) obtained for the Central Composite Design concerning sardine heads hydrolysis.

Numéro de l'expérience	DH	Lipides (g/g de têtes sèches)		Phospholipides (g/g de têtes sèches)	
		Toutes fractions	Fractions liquides	Toutes fractions	Fractions liquides
1	28%	0,22	0,14	0,006	0,003
2	24%	0,19	0,11	0,010	0,004
3	24%	0,21	0,13	0,012	0,006
4	23%	0,19	0,09	0,010	0,002
5	8%	0,22	0,13	0,018	0,004
6	13%	0,20	0,13	0,019	0,004
7	9%	0,23	0,17	0,016	0,005
8	22%	0,21	0,13	0,012	0,004
9	9%	0,29	0,20	0,015	0,007
10	21%	0,22	0,15	0,016	0,009
11	7%	0,22	0,11	0,021	0,007
12	11%	0,23	0,15	0,020	0,006
13	23%	0,23	0,15	0,010	0,003
14	17%	0,21	0,08	0,012	0,004
15	12%	0,22	0,16	0,020	0,008
16	12%	0,22	0,14	0,018	0,005

Les interprétations des résultats des phospholipides totaux et des phospholipides libérés peuvent également être regroupées. Les valeurs les plus hautes pour ces deux réponses ont été obtenues avec l'expérience n°11, qui correspond au DH minimum. A ce niveau, la quantité totale de phospholipides dosés est augmentée de 50% par rapport à la quantité obtenue de façon classique, et 33% des phospholipides sont contenus dans les fractions liquides. A l'opposé, l'expérience n°1 induit les plus faibles résultats concernant les phospholipides, et correspond aux les plus favorables au DH. Dans ces conditions, la quantité de phospholipides totaux est de 0,006 g/g de matière sèche, soit 43% des phospholipides obtenus chimiquement. Seuls 0,003 g/g sont récupérés dans les fractions liquides.

Toutes ces valeurs ont ainsi été utilisées par le logiciel Stagraphic 5 + pour prédire, en fonction des paramètres étudiés, chaque réponse. Les quantités de lipides et phospholipides libérés étant notre principal objectif, seules ces valeurs seront utilisées. L'analyse canonique effectuée par le logiciel est reportée dans le Tableau XXXIII. La première partie du tableau indique les valeurs optimales définies par le logiciel statistique et le coefficient de régression de ces prédictions (R^2 ajusté). La partie basse du tableau indique les valeurs prédites pour chaque réponse en fonction des conditions déterminées dans la partie haute. Ainsi, pour avoir le DH le plus important, l'hydrolyse devra durer environ 27 h et être conduite à 33°C avec 0,20% d'enzyme. Ces conditions permettraient, selon le logiciel, d'obtenir un DH de 30% ; une quantité de lipides libérés de 0,16 g/g de matière sèche et une quantité de phospholipides de 0,004 g/g, avec une robustesse de 93,9%. L'optimisation des lipides libérés est prédite avec un coefficient de régression de 75,2%. Par contre, le coefficient de régression obtenu pour les phospholipides libérés est beaucoup plus faible (48,7%) mais il est intéressant de noter que les conditions préconisées pour cette réponse sont les mêmes que pour les lipides libérés. Ainsi, les lipides et phospholipides seront libérés en plus grande quantité en menant une hydrolyse de 29 min, à 31 ou 32°C et avec de 0,26 à 0,28% d'enzyme. L'équation permettant de modéliser le DH (Équation 16) ne nous permet pas de prédictions pour des temps très courts, comme le temps optimal de 29 min requis pour la libération des lipides. En effet, au vu des résultats obtenus pour le DH, la prédiction est significative lorsque le temps d'hydrolyse demandé est important.

$$\begin{aligned}
 \text{DH} = & - 1,33471 + 0,000757354 \times \text{Durée d'hydrolyse} + 1,16627 \times \text{Enzyme} \\
 & + 0,0545443 \times \text{Température} - 0,000000137011 \times (\text{Temps d'hydrolyse})^2 \\
 & + 0,000147848 \times \text{Temps d'hydrolyse} \times \text{Enzyme} - 0,0000102968 \times \text{Temps d'hydrolyse} \times \text{Température} \\
 & - 3,12494 \times (\text{Enzyme})^2 - 0,00144648 \times \text{Enzyme} \times \text{Température} - 0,000572769 \times (\text{Température})^2
 \end{aligned}
 \tag{Équation 16}$$

Tableau XXXIII : Conditions optimales déterminées pour chaque réponse (DH, lipides et phospholipides libérés) de l'optimisation des têtes de sardine par Protamex et valeurs prédites pour ces réponses. *Optimal conditions calculated for each response and values predicted statistically according to those optimal conditions*

	Réponse	DH	Lipides libérés	PL Libérés
Conditions	Temps d'hydrolyse (min)	1605	29	29
	Enzyme (% p/p)	0,20	0,26	0,28
	Température (°C)	33	31	32
	R ² ajusté (%)	93,9	75,2	48,7
Valeurs prédites	DH	30%	hors échelle	hors échelle
	Lipides libérés (g/g MS)	0,16	0,24	0,25
	PL libérés (g/g MS)	0,004	0,009	0,009

L'évolution de la quantité de lipides libérés en fonction de la variation des trois paramètres est illustrée par la Figure 65. Chaque graphique est la représentation de l'évolution des lipides libérés en fonction des trois paramètres (A : concentration en enzyme / température ; B : Durée d'hydrolyse / Température ; C : Concentration en enzyme / durée d'hydrolyse). Ces graphiques sont en accord avec les valeurs prédites dans le Tableau XXXIII, à savoir que les lipides seront libérés en quantité plus importante avec un temps d'hydrolyse court, une grande concentration en enzyme et une température modérée (~ 30°C).

Les conditions déterminées par le logiciel vont ainsi être testées expérimentalement, à savoir une hydrolyse des têtes de sardine par Protamex de 29 min menée à 31°C avec 0,26% d'enzymes, et ce toujours à pH 8 et avec 1 volume d'eau.

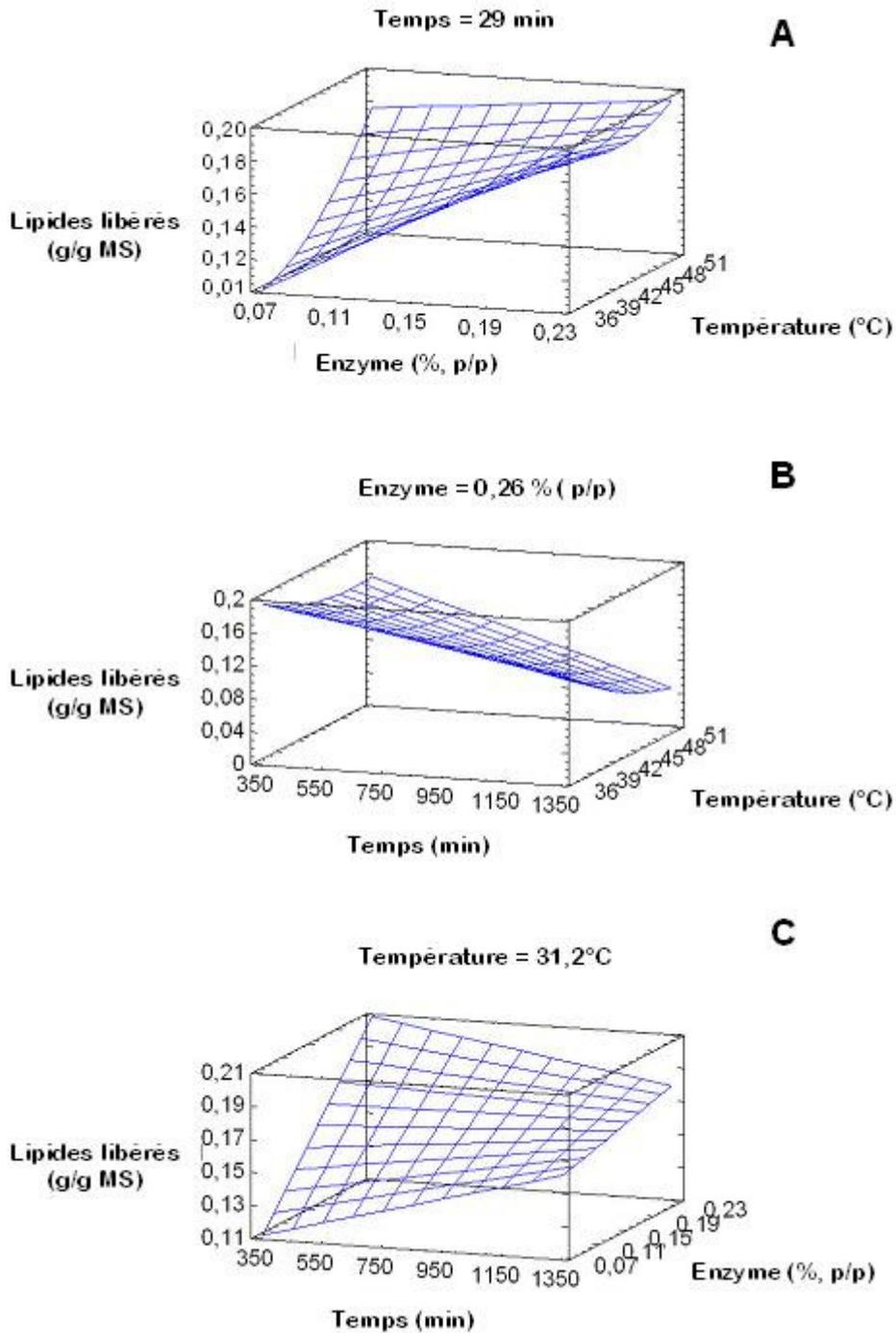


Figure 65 : Surface de réponse estimée pour la libération des lipides dans les fractions liquides, en trois dimensions sous forme d'isoréponses, aux effets combinés de la température et de la concentration en enzyme (A), de la durée d'hydrolyse et de la température (B) et de la durée d'hydrolyse et de la concentration en enzyme (C). *Estimated response surfaces according to the time, enzyme and temperature parameters.*

3.1.3.2. Réalisation de l'hydrolyse dans les conditions prédites par le logiciel

3.1.3.2.1. DH, lipides et phospholipides libérés

Les résultats obtenus après avoir conduit l'hydrolyse des têtes de sardine avec Protamex selon les conditions déterminées par le plan d'expérience sont indiqués dans le Tableau XXXIV. Le temps d'hydrolyse préconisé par le logiciel pour favoriser la libération des lipides est très court (30 min), aussi, le DH obtenu au bout de ce temps est faible : 3,5%. De la même manière, la solubilisation de la matière obtenue après cette hydrolyse n'est pas aussi importante (27%) que celle obtenue lors des hydrolyses menées sur 24 h, où près de 50% de la matière était localisée dans la fraction soluble. Cependant, la différence la plus importante à noter est la part de matière localisée dans la fraction huileuse. En effet, initialement, 5% de la matière sont localisés dans cette fraction et de 12 à 20% de la matière y sont localisés après hydrolyse menée durant 24 h (Figure 55). Ce même pourcentage de 20% de matière dans la fraction huileuse est obtenu après seulement 30 min d'hydrolyse. Les quantités de lipides extraits après cette hydrolyse sont intéressantes puisque environ 80% des lipides extraits sont localisés dans les fractions liquides, dont 60% dans la fraction huileuse. Les phospholipides sont également localisés principalement dans les fractions liquides (56%). La fraction soluble est la fraction qui possède la part la plus importante des phospholipides. Bien qu'une part importante des phospholipides subsiste dans la fraction insoluble, la quantité de phospholipides trouvée dans les fractions liquides correspond cependant à la quantité totale des phospholipides initialement dosée dans les têtes de sardine.

Tableau XXXIV : Résultats (DH, lipides et phospholipides libérés) obtenus après avoir conduit l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex avec les conditions optimales obtenues par le plan d'expériences. Results obtained after processing the optimal hydrolysis compared to those predicted by the statistic software and those obtained in the crude material.

	Fraction insoluble	Fraction huileuse	Fraction soluble	Total
DH	-	-	-	3,5%
Répartition de la matière sèche	53%	20%	27%	100%
Lipides (g/g de tête sèche)	0,04	0,11	0,03	0,19
Phospholipides (g/g de tête sèche)	0,011	0,002	0,012	0,025

3.1.3.2.2. Analyse des acides gras totaux

Les acides gras contenus dans les trois fractions ont été analysés avant de réaliser l'analyse des classes de lipides. Ces résultats sont reportés dans le Tableau XXXV. Pour toutes les analyses, l'acide gras majoritaire est l'acide palmitique, représenté dans chaque fraction à plus de 20%. Des différences sont à noter, essentiellement entre la fraction insoluble d'une part, et les fractions liquides d'autre part.

Tableau XXXV : Distribution des acides gras (%) au sein des trois fractions (insoluble, huileuse et soluble) générées au cours de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex *Fatty acid distribution among fractions after optimized hydrolysis*

	Fraction insoluble	Fraction huileuse	Fraction soluble
C14:0	8,5 ± 0,1	11,7 ± 0,3	8,5 ± 0,2
C16:0	28,2 ± 0,5	23,7 ± 0,1	25,5 ± 0,3
C18:0	6,2 ± 0,1	4,0 ± 0,0	5,6 ± 0,0
C20:0	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,0
Σ AGS	43,5 ± 0,7	39,8 ± 0,1	40,2 ± 0,5
C16:1 c ω7	6,1 ± 0,1	7,4 ± 0,0	6,4 ± 0,1
C18:1 c ω9	10,4 ± 0,1	8,0 ± 0,0	10,1 ± 0,1
C18:1 c ω7	3,0 ± 0,0	2,6 ± 0,0	2,7 ± 0,0
C20:1 c ω9	4,6 ± 0,0	5,5 ± 0,0	4,6 ± 0,0
C22:1 c ω9	4,4 ± 0,1	5,7 ± 0,0	4,5 ± 0,0
C24:1 c ω9	1,6 ± 0,1	0,7 ± 0,0	1,4 ± 0,1
Σ AGMI	29,8 ± 0,1	29,9 ± 0,0	30,0 ± 0,3
C16:2 c ω4	0,6 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,0
C18:2 c ω6	1,5 ± 0,0	1,6 ± 0,0	1,5 ± 0,0
C18:3 c ω3	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0
C20:3 c ω3	0,8 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0
C18:4 c ω3	2,7 ± 0,1	4,4 ± 0,0	3,4 ± 0,0
C20:4 c ω5	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,0
C20:5 c ω3	6,7 ± 0,2	9,3 ± 0,0	8,3 ± 0,1
C22:5 c ω3	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0
C22:6 c ω3	12,0 ± 0,5	10,3 ± 0,0	12,6 ± 0,4
Σ AGPI	24,5 ± 0,9	27,7 ± 0,1	27,9 ± 0,5

La répartition en AGS, AGMI et AGPI des acides gras de la fraction insoluble est respectivement de 44%, 30% et 26%. Les familles d'acides gras les plus importantes sont les ω3 (environ 24%) et les ω9 (environ 21%). Bien que possédant quelques différences intrinsèques, les acides gras des fractions liquides peuvent également être regroupés. La principale différence avec les acides gras de la fraction insoluble est la proportion en AGPI, plus importante dans les fractions liquides (environ 28%), au détriment des AGS. Ainsi, la

proportion des acides gras $\omega 3$ est la plus importante dans la fraction soluble, avec $27,02 \pm 0,46\%$ suivie de la fraction huileuse, avec $26,80 \pm 0,04\%$ des acides gras totaux. Les acides gras de la famille des $\omega 9$ sont toujours présents à hauteur de 20% des acides gras totaux.

3.1.3.2.3. Analyse des classes de lipides

Les classes de lipides ont été analysées deux fois, une analyse fine (mais destructrice) a permis d'identifier et de quantifier plusieurs classes de lipides (Figure 66), et une analyse moins précise a permis le fractionnement des principales classes de lipides de façon à pouvoir déterminer ensuite la composition en acides gras de ces fractions (Figure 67).

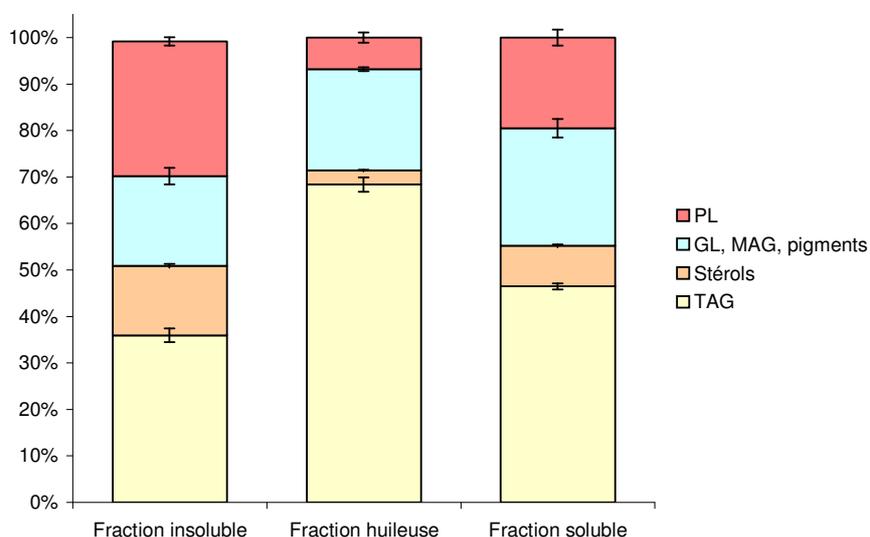


Figure 66 : Répartition des différentes classes de lipides obtenues par CCM-FID des fractions générées après l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex réalisée dans les conditions retenues d'après les résultats du plan d'expériences. PL : phospholipides, GL : glycolipides, MAG : monoacylglycérol, TAG : triacylglycérol. Lipid classes distribution obtained by TLC-FID of fractions from hydrolysed heads

Ainsi, la Figure 66 permet d'identifier les phospholipides, les stérols et les TAG, et dans une même classe, les MAG, pigments et glycolipides. L'analyse en CCM-FID permet également de quantifier les acides gras libres, les cires, les hydrocarbures et les cétones mais les fractions ne renferment aucune de ces classes de composés lipidiques. Les esters de stérols sont quant à eux présents dans les 3 fractions à l'état de traces. La fraction insoluble est la fraction la plus diversifiée. Les TAG sont les lipides présents en plus grande quantité (36%) suivis des phospholipides qui représentent 29% des lipides totaux. Les autres lipides polaires (glycolipides, MAG et pigments) sont également rencontrés dans la fraction insoluble (19%). Enfin, les stérols sont essentiellement rencontrés dans cette fraction, puisqu'ils représentent

15% des lipides totaux de cette fraction, alors que cette classe de lipides est très faiblement rencontrée dans les autres fractions. Dans la fraction huileuse, la majeure partie des lipides est des TAG (68%), mais une part importante de lipides polaires est aussi retrouvée (22%). Les stérols et les phospholipides ne sont présents qu'en très faible quantité dans cette fraction (moins de 10%). Dans la fraction soluble, 46% des lipides totaux sont des TAG. Le groupe glycolipides / MAG / pigments est présent en quantité importante (25%). Les phospholipides représentent quant à eux 20% des lipides totaux.

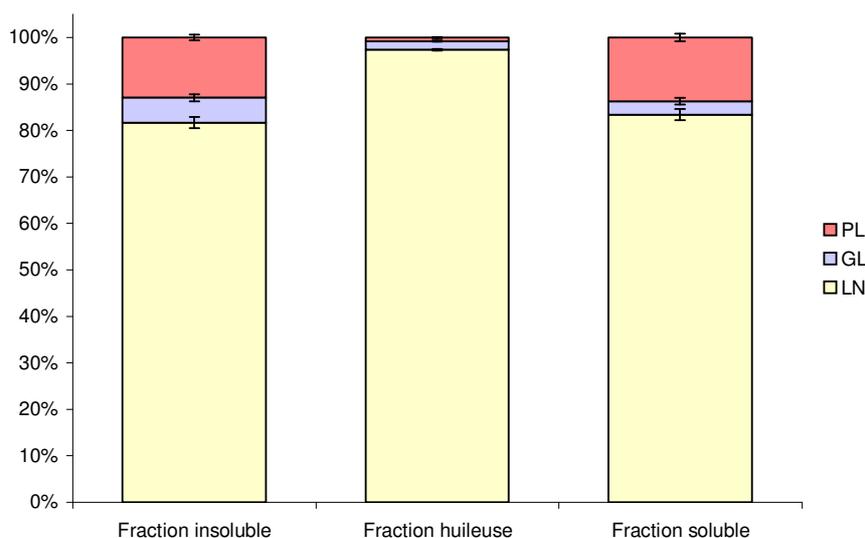


Figure 67 : Fractionnement SPE des classes de lipides des fractions issues de l'hydrolyse optimisées des têtes de sardine par Protamex. SPE fractionation of lipid classes from hydrolysed heads fractions

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le fractionnement sur colonne ouverte de silice (Figure 67). En effet, malgré une identification moins précise, les profils obtenus sont similaires. Les lipides neutres, qui comprennent les TAG, MAG et stérols sont majoritaires dans les trois fractions (82% dans la fraction insoluble, 97% dans la fraction huileuse et 83% dans la fraction soluble). Très peu de glycolipides ont été extraits (moins de 5%) dans les trois fractions. Enfin, comme décrit précédemment (analyse par CCM-FID et lors du dosage colorimétrique), les phospholipides sont présents en quantité dans les fractions insolubles et solubles (respectivement 13 et 14%). Les acides gras présents dans les lipides neutres des trois fractions ainsi que ceux des phospholipides des fractions solubles et insolubles vont être analysés (Tableau XXXVI, Tableau XXXVII et Tableau XXXVIII).

Tableau XXXVI : Compositions moyennes en acides gras (%) des lipides neutres et des phospholipides contenus dans la fraction insoluble issue de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex. Neutral lipid and phospholipid fatty acid composition in the insoluble fraction generated during the optimized hydrolysis of sardine heads by Protamex

	Lipides neutres	Phospholipides
C14:0	7,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2
C16:0	25,8 ± 1,0	42,0 ± 1,2
C18:0	5,9 ± 0,1	12,2 ± 0,3
Σ AGS	39,0 ± 1,0	56,2 ± 1,2
C16:1 c ω7	7,5 ± 0,1	3,8 ± 0,2
C18:1 c ω9	12,5 ± 0,2	20,8 ± 0,2
C18:1 c ω7	3,8 ± 0,1	4,6 ± 0,0
C22:1 c ω9	1,0 ± 0,0	- -
Σ AGMI	24,8 ± 0,4	29,1 ± 0,3
C18:2 c ω6	1,4 ± 0,0	- -
C22:2 c ω6	6,3 ± 0,1	- -
C20:3 c ω6	1,0 ± 0,0	- -
C18:4 c ω3	2,2 ± 0,1	- -
C20:4 c ω3	5,3 ± 0,1	- -
C20:5 c ω3	7,2 ± 0,4	4,0 ± 0,3
C22:5 c ω3	0,9 ± 0,1	- -
C22:6 c ω3	12,1 ± 0,6	10,7 ± 1,2
Σ AGPI	36,3 ± 1,1	14,7 ± 1,5

Les acides gras des lipides neutres de la fraction insoluble (Tableau XXXVI) sont composés majoritairement d'AGS (39,0 ± 1,0%) avec pour représentant principal l'acide palmitique (25,8 ± 1,0%). Les AGMI, présents à moins de 25% dans les acides gras totaux, sont uniquement représentés par les familles des acides gras ω7 et ω9. Enfin, les AGPI sont présents en quantité importante (36,3 ± 1,1%) et sont représentés par les familles des acides gras ω3 et ω6. Les phospholipides de cette même fraction possèdent quant à eux une part majoritaire d'AGS (56,2 ± 1,2%), avec toujours l'acide palmitique comme principal composé (42,02 ± 1,2%), l'acide stéarique étant aussi présent en grande quantité (plus de 12%). Les AGMI représentent un peu moins du tiers des acides gras totaux (29,1 ± 0,3%) et l'acide oléique est l'acide gras mono-insaturé majoritaire (plus de 20% des acides gras totaux). Les AGPI présents dans les phospholipides de cette fraction insoluble sont exclusivement représentés par le DHA et l'EPA.

Tableau XXXVII : Compositions moyennes en acides gras (%) des lipides neutres contenus dans la fraction huileuse issue de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex. *Neutral lipid fatty acid composition in the oily fraction generated during the optimised hydrolysis of sardine heads by Protamex*

	Moyenne	Ecart type
C14:0	8,3	± 0,2
C16:0	21,7	± 0,3
C18:0	4,5	± 0,1
Σ AGS	34,4	± 0,3
C16:1 c ω7	8,6	± 0,1
C18:1 c ω9	11,0	± 0,1
C18:1 c ω7	3,6	± 0,0
C22:1 c ω9	0,9	± 0,0
Σ AGMI	24,0	± 0,2
C18:2 c ω6	1,5	± 0,0
C22:2 c ω6	7,8	± 0,1
C20:3 c ω6	1,8	± 0,0
C18:4 c ω3	3,0	± 0,0
C20:4 c ω3	6,0	± 0,1
C20:5 c ω3	9,9	± 0,2
C22:5 c ω3	1,1	± 0,0
C22:6 c ω3	11,2	± 0,3
Σ AGPI	41,7	± 0,4

Les lipides neutres sont l'unique classe de lipides rencontrée de façon significative dans la fraction huileuse. Les acides gras de cette fraction (Tableau XXXVII) sont majoritairement des AGPI ($41,7 \pm 0,4\%$ des acides gras totaux). Ces AGPI appartiennent essentiellement à la famille des ω3 (75% des AGPI) : les acides EPA et DHA, mais également l'acide C22 :2 c ω6. Les AGS sont tout de même présents en grande quantité ($34,4 \pm 0,3\%$) et l'acide palmitique est toujours l'acide gras présent en plus grande quantité (plus de 20%). Enfin, les AGMI, présents à hauteur de 24% des acides gras totaux, sont toujours représentés par les ω9 et les ω7, l'acide oléique étant l'AGMI principal ($11,0 \pm 0,1\%$), suivi de l'acide palmitoléique.

Les acides gras contenus dans les lipides neutres et les phospholipides de la fraction soluble sont reportés dans le Tableau XXXVIII. Les lipides neutres de la fraction soluble sont principalement composés d'AGPI ($40,8 \pm 1,7\%$) où les acides EPA et DHA sont majoritaires (aux alentours de 23% des acides gras totaux). Les AGS sont représentés à hauteur de $35,9 \pm 1,4\%$ dont $23,3 \pm 1,1\%$ d'acide palmitique. Enfin, $23,4 \pm 0,5\%$ des acides gras totaux sont des AGMI, représentés également pas les familles ω7 et ω9. Les phospholipides de cette même fraction sont composés principalement d'AGS ($46,8 \pm 0,9\%$) essentiellement des acides palmitique ($31,1 \pm 0,8\%$) et stéarique ($14,1 \pm 0,3\%$). L'acide oléique est l'acide gras

majoritaire des AGMI, où les acides gras de la famille des ω 9 représentent plus de 25% des acides gras totaux. Les AGMI représentent $32,9 \pm 0,3\%$ des acides gras totaux. Enfin, bien qu'étant la classe d'acides gras minoritaire, les AGPI représentent tout de même $20,3 \pm 0,5\%$ des acides gras totaux, exclusivement des acides EPA et DHA.

Tableau XXXVIII : Compositions moyennes en acides gras (%) des lipides neutres et des phospholipides contenus dans la fraction soluble issue de l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex. *Neutral lipid and phospholipid fatty acid composition in the soluble fraction generated during the optimised hydrolysis of sardine heads by Protamex*

	Lipides neutres	Phospholipides
C14:0	7,6 \pm 0,4	1,6 \pm 0,2
C16:0	23,3 \pm 1,1	31,1 \pm 0,8
C18:0	5,1 \pm 0,0	14,1 \pm 0,3
Σ AGS	35,9 \pm 1,4	46,8 \pm 0,9
C16:1 c ω 7	8,0 \pm 0,3	3,3 \pm 0,2
C18:1 c ω 9	11,8 \pm 0,2	23,1 \pm 0,5
C18:1 c ω 7	3,6 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1
C24:1 c ω 9	- -	2,7 \pm 0,1
Σ AGMI	23,4 \pm 0,5	32,9 \pm 0,3
C18:2 c ω 6	1,5 \pm 0,0	- -
C22:2 c ω 6	6,2 \pm 0,5	- -
C20:3 c ω 6	0,8 \pm 0,7	- -
C18:4 c ω 3	2,9 \pm 0,1	- -
C20:4 c ω 3	5,6 \pm 0,2	- -
C20:5 c ω 3	9,7 \pm 0,2	5,0 \pm 0,1
C22:5 c ω 3	0,7 \pm 0,6	- -
C22:6 c ω 3	13,4 \pm 0,5	15,3 \pm 0,4
Σ AGPI	40,8 \pm 1,7	20,3 \pm 0,5

3.1.3.2.4. Analyse des peptides

La répartition des poids moléculaires des peptides obtenus après l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex dans les conditions préconisées après réalisation du plan d'expériences est présentée sur la Figure 68. Malgré un faible DH, tous les peptides générés par l'hydrolyse possèdent une taille très inférieure à 14 kDa.

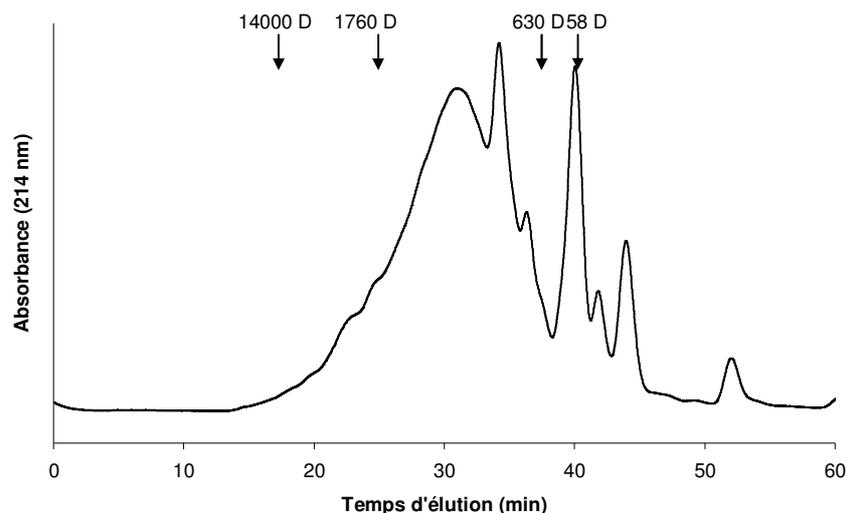


Figure 68 : Profil moléculaire des peptides générés durant l'hydrolyse optimisée des têtes de sardine par Protamex. Molecular weight distribution of peptides generated by the optimised heads hydrolysis with Protamex

3.1.3.3. Discussion

La conduite des hydrolyses réalisées dans le cadre du plan d'expériences a permis de dégager certaines tendances. **En effet, les différentes hydrolyses ont permis de montrer que, dans des conditions favorables, la quantité de lipides extraits pouvait être améliorée, par rapport à une extraction classique, de 27% (Tableau XXXIV).** Cependant, globalement, la quantité de lipides extraits après hydrolyse enzymatique correspond à la quantité de lipides extraits avec l'utilisation de solvants. **La quantité de phospholipides dosée, peut quant à elle, augmenter de 50%, évoquant le fait que l'hydrolyse enzymatique permet de libérer cette classe de lipides.** En effet, les phospholipides possèdent au sein du tissu vivant un rôle structural majeur puisque leur fonction principale est de participer à la constitution de la membrane cellulaire (cf. p62). A l'état natif, ils se retrouvent donc complexés avec des protéines au sein des membranes. L'extraction classique menée avec des solvants organiques ne permet pas la complète destruction des membranes. L'utilisation de protéases va faciliter cette lyse membranaire et par conséquent libérer les phospholipides. Il est important de souligner que, même si les quantités de phospholipides obtenues après hydrolyses sont plus importantes, la quantité totale de phospholipides par rapport à la quantité de lipides totaux est faible. Ainsi, une légère variation du taux de phospholipides va être plus remarquable qu'une variation du taux global de lipides. **Ces résultats montrent également que la quantité de lipides récupérée dans les fractions liquides générées par l'hydrolyse peuvent atteindre 70% et les phospholipides 33%. Ces**

lipides et phospholipides pourront ainsi être extraits sans avoir recours aux solvants. Des résultats obtenus avec ces hydrolyses, il se dégage que la concentration en enzyme semble être le facteur le plus influent pour toutes les réponses étudiées. En se bornant à notre domaine d'étude, plus la quantité d'enzyme introduite est importante, plus le DH et les fractions lipidiques seront importantes. Le temps d'hydrolyse est le second facteur le plus important, mais il va jouer un rôle différent selon les réponses étudiées. Un temps important d'hydrolyse sera requis pour obtenir un DH important. **Par contre, il n'est pas nécessaire de mener longtemps l'hydrolyse pour obtenir la libération maximale des lipides.** La température ne semble pas être importante pour les réponses choisies. Cependant, d'autres études ont montré que la température est très influente lors de la conduite d'hydrolyses enzymatiques (Diniz et Martin - 1996; Ravallec-Plé - 2000). Ce n'est pas le cas ici puisque notre domaine d'étude se situe dans les valeurs où l'enzyme Protamex est la plus active (31-55°C). Ceci a déjà été démontré par d'autres études utilisant la méthodologie des plans d'expériences : la température n'avait pas d'effet significatif sur l'hydrolyse, le DH en l'occurrence, lorsque la plage de température testée correspond à la plage d'activité de l'enzyme utilisée (Sumaya-Martínez *et al.* - 2005; Nilsang *et al.* - 2005). Par ailleurs, le domaine de température a été choisi afin de vérifier que la température ne jouait pas un rôle sur les lipides (dénaturation, libération plus facile...).

Toutes ces observations ont été confirmées lors du traitement des données par le logiciel Stagraphic 5 +. Le degré d'hydrolyse est la réponse permettant une modélisation robuste. Cependant, les quantités de lipides et de phospholipides libérés dans les conditions déterminées dans ce cas ne correspondent pas aux objectifs fixés. Le traitement des données obtenues pour la libération des lipides indique des conditions préférentielles. Cependant, la robustesse de la prédiction n'est pas aussi élevée que pour le DH. Quoi qu'il en soit, cette analyse permet de donner un ordre de grandeur des conditions opératoires à appliquer, à savoir un temps d'hydrolyse de 29 min avec une température de 31°C en ajoutant 0,26% (p/p) d'enzyme. Concernant la libération des phospholipides, les résultats obtenus lors du plan d'expériences ne permettent pas d'obtenir un modèle de prédiction robuste. Cependant, les conditions indiquées sont très proches de celles préconisées pour la libération des lipides.

Ainsi, d'après les conditions optimales prédites pour le DH et la libération des lipides, cette étude statistique a permis de montrer que les réponses lipidiques n'étaient pas liées à l'évolution de l'hydrolyse. En effet, l'hypothèse de départ était que plus le DH est élevé, plus la matrice est déstructurée, plus les peptides générés sont petits et plus les lipides

sont libérés. C'est pourquoi les premières hydrolyses menées ont été réalisées sur une longue période (24 h). Cette hypothèse est ici contredite par les résultats obtenus ici puisqu'il suffit d'une courte hydrolyse pour obtenir une libération de lipides optimale. Il a de plus été montré lors de la conduite des expériences que, non seulement ces réponses ne sont pas liées, mais elles sont antinomiques. En effet, les expériences menant aux hautes valeurs de DH conduisent à de faibles quantités de lipides libérés et inversement. Une récente étude menée par Šližyte *et al.* a montré qu'il était difficile d'obtenir des conditions optimales pour la récupération conjointe des lipides et des protéines (Šližyte *et al.* - 2005b). **L'objectif de notre étude étant d'obtenir la plus grande quantité de lipides et de phospholipides sans avoir recours aux solvants, nous utiliserons les conditions opératoires prédites par le logiciel concernant la libération des lipides, à savoir une durée de 29 min, une température de 31°C et 0,26% (p/p) de Protamex.** Cette hydrolyse sera réalisée à pH 8 et avec 1 volume d'eau. A ce jour, peu de références portent sur l'extraction de lipides par voie enzymatique, la plupart des optimisations portant sur les fractions protéiques (Diniz et Martin - 1996; Simpson *et al.* - 1998; Liaset *et al.* - 2002; Sumaya-Martínez *et al.* - 2005; Nilsang *et al.* - 2005).

L'hydrolyse menée dans les conditions prédites par le logiciel a conduit à l'obtention d'un faible DH. Cette faible valeur est expliquée par le fait que le temps d'hydrolyse est très court. De même, la quantité de matière solubilisée est faible. La solubilisation de la matière va de pair avec la solubilisation des protéines et donc avec l'évolution de l'hydrolyse. Quaglia et Orban, en 1987, ont montré que la solubilité des hydrolysats augmentait avec le DH (Quaglia et Orban - 1990). Le DH et la solubilisation de la matière obtenus ne sont pas importants, l'hydrolyse n'ayant pas été réalisée pour ces réponses. **La conduite de l'hydrolyse dans les conditions définies par le logiciel a permis d'extraire une quantité importante de lipides. Peu de lipides restent localisés dans la fraction insoluble (~ 20%), la majorité d'entre eux étant distribuée dans les fractions liquides : 60% dans la fraction huileuse et 20% dans la fraction liquide, ce qui était notre principal objectif, ces lipides pouvant être récupérés sans solvants.** L'addition de nouvelles étapes douces (ultrafiltration) pourraient permettre de purifier les fractions lipidiques d'intérêt, comme les phospholipides qui sont extraits en plus grande quantité après avoir conduit une hydrolyse. **Malgré le fait que beaucoup de phospholipides restent dans le culot, une quantité au moins égale à celle obtenue classiquement est récupérée dans les fractions liquides, essentiellement dans la fraction soluble.** Des résultats similaires ont été obtenus par deux autres équipes, qui montrent également que, après une hydrolyse enzymatique réalisée avec des protéases

(Protamex et Flavourzyme) sur des co-produits marins (arête de saumon et viscères de morue), les phospholipides se situent principalement dans les fractions solubles et insolubles. Lors de ces deux études, les fractions huileuses ne contenaient pas de phospholipides (Liaset *et al.* - 2003; Daukšas *et al.* - 2005), ce qui corrobore nos résultats.

Il ressort de l'étude des acides gras des lipides totaux que les fractions liquides générées par l'hydrolyse sont plus riches en AGPI que la fraction insoluble. **Les AGPI ont ainsi été concentrés dans les fractions liquides.** Les acides gras de la famille des $\omega 3$, qui sont les acides gras constituant un intérêt majeur (dans les domaines de la santé et de la nutrition, comme décrit dans la partie bibliographique) représentent 27% des acides gras présents dans les fractions liquides. L'analyse des classes de lipides va nous renseigner sur la localisation de ces acides gras et sur la composition lipidique des fractions.

Après analyse des classes de lipides, les résultats obtenus pour les phospholipides confirment les dosages par colorimétrie, où les phospholipides avaient été localisés essentiellement dans les fractions solubles et insolubles. Ces résultats confirment ceux obtenus antérieurement par deux différentes équipes (Liaset *et al.* - 2003; Daukšas *et al.* - 2005). Qui plus est, les résultats obtenus avec les deux méthodes d'analyse des classes de lipides sont en accord entre eux. L'identification des classes de lipides par CCM-FID permet une analyse fine des composés, mais ne permet pas de les fractionner, contrairement à la séparation en classes sur colonne de silice. Ainsi, ces deux analyses ont permis de montrer que la fraction insoluble possédait la plus grande diversité de lipides (TAG, stérols, MAG, PL) avec majoritairement des AGS (39%) et des AGPI (36% dont 28% d'acides gras $\omega 3$). Cette fraction insoluble générée durant cette hydrolyse pourra faire l'objet d'une étude ultérieure, en réalisant par exemple une seconde hydrolyse. En effet, des résultats préliminaires effectués au Laboratoire sur d'autres matrices ont montré l'intérêt de réaliser plusieurs hydrolyses successives (en réalisant une hydrolyse avec Protamex sur un culot issu de l'hydrolyse de la laitance de morue par Flavourzyme, une partie de la matière insoluble du culot a pu être solubilisée lors de la seconde hydrolyse). D'autres auteurs ont également pratiqué ce genre de procédé, dans le but d'augmenter l'activité des hydrolysats obtenus, d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles, de réduire l'amertume... (You-Jin *et al.* - 1999; Liaset *et al.* - 2000). Ce procédé pourrait également servir à hydrolyser de nouveau une fraction de façon à permettre la libération de nouveaux composés, lipides, protides, polymères. L'étude des fractions liquides révèle qu'elles sont moins diversifiées puisque la

fraction huileuse est composée essentiellement de lipides neutres (surtout des TAG, mais également des MAG) et la fraction soluble possède des MAG, TAG et des phospholipides. **La composition en acides gras des lipides neutres de la fraction huileuse est intéressante puisque les principaux acides gras sont des AGPI (près de 42%, dont 31% d' ω 3). Ainsi, la fraction huileuse générée par l'hydrolyse des têtes de sardine possède un potentiel important de valorisation de par sa richesse en acides gras ω 3.** Le même constat peut être réalisé concernant les acides gras des lipides neutres de la fraction soluble, les compositions de ces deux fractions étant similaires. Les phospholipides de cette fraction soluble sont quant à eux composés majoritairement d'acides gras saturés. Cependant, les AGPI représentent tout de même plus de 20% des acides gras totaux, et ces AGPI sont exclusivement constitués des acides gras EPA et DHA. **Les phospholipides obtenus dans les fractions liquides représentent ainsi également un intérêt potentiel.** Ces analyses permettent de confirmer le potentiel des lipides récupérés sans utilisation de solvant, par hydrolyse enzymatique.

Enfin, la distribution des poids moléculaires obtenus pour les peptides contenus dans la fraction soluble montre que toutes les tailles des peptides générés sont inférieurs à 14 kDa. Ainsi, comme évoqué précédemment, les peptides générés durant cette hydrolyse optimale pourront trouver une application dans les domaines alimentaires. Il faut cependant souligner une fois de plus, compte tenu de la faible hydrolyse réalisée ici, que seuls les peptides solubles ont été dosés. Il subsiste certainement des peptides ou protéines de plus haut poids moléculaire, qui n'ont pu être caractérisés à cause de leur caractère insoluble.

L'hydrolyse des têtes de sardine s'avère ainsi d'un grand intérêt. Les quantités de lipides extraits ne sont pas plus importantes que celles obtenues classiquement, mais la conduite de l'optimisation de l'hydrolyse de ces matrices par Protamex a permis la libération de plus de 80% des lipides dans les fractions liquides (phases huileuse et soluble). Ces deux fractions ont de plus montré un intérêt qualitatif. En effet, la fraction huileuse est essentiellement composée de lipides neutres dont les acides gras constitutifs sont des AGPI, et essentiellement des ω 3, où les bienfaits ont largement été décrits dans la première partie de ce travail. La fraction soluble présente quant à elle trois atouts. Les lipides neutres qui la composent sont riches en AGPI et cette fraction renferme une quantité importante de phospholipides. Enfin, cette fraction est riche en peptides. Alors que la fraction huileuse pourra être récupérée par centrifugation à l'issue de l'hydrolyse puis par micro-filtration de la fraction liquide, la phase soluble doit quant à elle subir une séparation plus fine. C'est

pourquoi le 4^{ème} chapitre de ce travail s'est focalisé sur la séparation des fractions lipidiques et peptidiques de la phase soluble générée par l'hydrolyse enzymatique des têtes de sardine. La fraction insoluble générée devra, quant à elle, faire l'objet d'un travail futur pour sa valorisation. Ces objectifs ont pu être atteints en réalisant l'hydrolyse enzymatique sur une courte durée et avec une température réactionnelle faible, ce qui est économiquement intéressant car la production est rapide et demande peu de dépense énergétique. Ces conditions opératoires sont également favorables pour les lipides. En effet, en limitant le temps de réaction et la température, les risques d'oxydation des lipides et de création d'acides gras en configuration *trans* sont limités, ces deux paramètres étant bien connus pour être d'importants facteurs de dégradation des lipides.

Hydrolysis performed in order to optimize the experimental conditions has shown, before the statistical analysis, some tendencies. Indeed, those hydrolyses have enabled to demonstrate that, in suitable conditions, the quantity of lipid extracted could be 27% more than classical extraction. However, in most of cases, the quantity of lipid extracted is equal to those obtained by the Folch procedure. Phospholipid quantity is also enhanced (up to 50%), inducing the benefit of hydrolysis for phospholipid release. Indeed, phospholipids possess an essential role in living matrixes, as components of cellular membranes (see p62). Natively, phospholipids are combined with proteins to form the membrane. Classical extraction doesn't lead to total membrane denaturation and phospholipids in membranes are not released. Hydrolyses realized with proteases help the membrane breakdown and consequently give an higher phospholipid extraction. These results also show that the quantities of lipids recovered on liquid fractions could reach 70% of total quantity for lipids and 33% for phospholipids. Hence, these lipids and phospholipids could be extracted without solvent requiring. Thanks to those results, it can be noticed that enzyme concentration seems to be the most influent factor. In the range of our study area, the most important the enzyme quantity is, the most the DH is and the lipid quantities in the liquid fractions are important. Hydrolysis time is the second most influent factor, but it leads to different effects according to the response. High time hydrolysis conducts to high DH. At the opposite, it is not useful to realize a long hydrolysis to obtain the highest lipid quantity released. Temperature doesn't seem to be efficient according to our results. However, the contrary has been demonstrated in previous studies (Diniz et Martin - 1996; Ravallec-Plé - 2000). It is surely due to the fact that our temperature area is not wide and centred around the high enzyme activity temperature area (Protamex has a temperature range from 31 to 55°C). Other studies have also shown,

with experimental design procedure, that temperature did not possess a significant effect on hydrolysis (DH) when the temperature correspond to the enzyme temperature range (Sumaya-Martínez et al. - 2005; Nilsang et al. - 2005). We had deliberately chosen this temperature area in order to check if this parameter do not play a parallel role on lipidic responses, such as denaturation, easier release...

All those tendencies have been confirmed during the data treatment by the software. DH is the response which gives the strongest optimization. Data treatment concerning the lipid responses indicates preferential operating conditions. But the prediction is not as hard as the one obtained for DH (75% instead of 94%). Anyway, this analysis enables to give an indication of the conditions to use. Concerning phospholipids recovery, results obtained during experimental design hydrolyses do not permit to obtain a hard prediction. But the values of the parameters indicated for the phospholipids are the same as those predicted for the lipid response.

Hence, according to prediction obtained for both responses, this statistical treatment demonstrates that lipid extraction is not linked to hydrolysis evolution (DH). Indeed, the hypothesis formulated at the beginning was that the higher the DH is, the higher the breakdown of the matrix is and the smaller the peptides and the higher the lipid release are. That is why the first hydrolyses have been carried out during 24 h. This hypothesis is here contradicted by the present results because a low hydrolysis time is sufficient to obtain the highest lipid recovery. It has also shown that, during experimental design, DH and lipids are not linked and antinomic. Indeed, experiments which have led to high DH values have led to low lipid recovery and vice versa. Recently, Šližyte *et al.* have shown that it was difficult to obtain, with the same conditions, the maximum lipid and protein recoveries (Šližyte et al. - 2005b). **The goal of our study was the lipid and phospholipid recovery without using solvent procedures, so we have used the operating conditions predicted for the lipid response (29 min hydrolysis at 31°C and with 0.26% (w/w) of Protamex).** This hydrolysis have been done at pH 8 and with one volume added water. Nowadays, few works have been published focusing on lipid extraction by enzymatic way, most of the hydrolysis being devoted to proteinic fractions (Diniz et Martin - 1996; Simpson et al. - 1998; Liaset et al. - 2002; Sumaya-Martínez et al. - 2005; Nilsang et al. - 2005).

Hydrolysis conducted under those conditions has led to low DH, which can be explained by the low hydrolysis time (we just have seen that hydrolysis should be long to

obtain high DH). Also, the matter is not highly solubilized. Matter solubilization is linked to protein solubilization. Quaglia and Orban, in 1987, have shown that hydrolysate solubility increases with DH (Quaglia et Orban - 1990). Those two responses (solubilization and DH) are as high as possible, due to the operating conditions chosen (in favour to lipid response). **Concerning lipid response, hydrolysis have enabled to extract a high amount of lipids. In these conditions, few lipids are remaining in the insoluble fraction (around 20%), and the main part is released in the liquid fractions: 60% in the oily fraction and 20% in the soluble part, which was our principal objective, those lipids could be extracted without solvent.** Additional mild steps (like ultrafiltration) could be used for purifying those liquid fractions. Phospholipids are extracted in higher quantity after hydrolysis. **Despite that a lot of phospholipids are still located in the insoluble fraction, an amount as high as the one obtained without hydrolysis is located in the liquid fraction, especially in the soluble fractions.** Similar results have been obtained, which also demonstrated that, after conducting a proteolysis (with Protamex and Flavourzyme) on marine by-products (salmon backbone and cod viscera), phospholipids are mainly located in soluble and insoluble fractions and not in the oily fraction (Liaset et al. - 2003; Daukšas et al. - 2005), which is in accordance with our results. Thus, both liquid fractions present an interest in lipid area.

The fatty acid study has shown that liquid fraction generated are richer in PUFA than the insoluble fraction. **So, PUFA have been concentrated in liquid fractions.** $\omega 3$ fatty acids, which are the most interesting fatty acids (in health and nutrition fields, as described in the first chapter), represent 27% of the total fatty acids in liquid fractions. Lipid classes analysis would give us information on those fatty acid localization and on the lipidic composition of the fractions.

So, after this class analysis, phospholipid results are in accordance with the one given by colorimetry, where phospholipids have been localized in soluble and insoluble fractions. Thus, those results confirmed the ones obtained before (Liaset et al. - 2003; Daukšas et al. - 2005). Moreover, results obtained with both analytic methods give the same results. Lipid class identification with TLC-FID gives a finer analysis but doesn't permit a recoverable fractionation, at the opposite of the other method analysis. So, both analyses are complementary and have shown that insoluble fraction possess a higher lipid diversity (TAG, sterol, MAG, phospholipids) than the others. Fatty acids contained in the neutral lipid of insoluble fraction are mainly SFA (39%) and PUFA (36% of total fatty acid especially 28% of

$\omega 3$). However, despite the interest of those compounds, they have not been studied because they are still included in the soluble fraction. Whatever, insoluble fraction obtained here could be studied in a further study, with additional hydrolysis for example. Indeed, previous works realized in the Laboratory on other marine by-products have highlighted that a second hydrolysis has an interest. Hence, after conducting a hydrolysis on cod milt with Flavourzyme, the resulting sludge have been more solubilized with a secondary hydrolysis with Protamex and more lipids have been released. Other process are using several hydrolysis, in order to increase functional properties of hydrolysate, to reduce their bitterness... (You-Jin et al. - 1999; Liaset et al. - 2000). This process could also be used, for the insoluble fraction, to release lipids, proteins, carbohydrates...

On the contrary, liquid fractions are less diversified because the oily fraction is only composed of neutral lipids (mainly TAG then MAG) and the soluble fraction is composed of MAG, TAG and phospholipids. **Fatty acid composition of oily fraction neutral lipids is interesting because a large amount are PUFA (42%) and especially $\omega 3$ fatty acids (31% of total fatty acids).** Hence, oily fraction generated by heads hydrolysis is very rich in $\omega 3$. Similar fatty acid composition is obtained concerning neutral lipid soluble fraction. Phospholipid fatty acid of soluble fraction are mainly SFA. However, PUFA still represent more than 20% of total fatty acids, and these fatty acids are only EPA and DHA. **Phospholipids obtained in soluble fraction are also interesting.** These analyses have permit to confirm the potential of softly extracted lipids by enzymatic hydrolysis.

Finally, the molecular weight distribution obtained for soluble peptides shows that all the MWCO are below 14 kDa. Hence, as previously mentioned, peptides recovered could find an application in food or feed fields. However, it has to be noticed that, one more time, only soluble peptides have been analyzed and this is not a total peptide analysis. Those fractions are certainly composed of higher molecular weight and insoluble peptides. A total analysis must be carried out with electrophoresis.

Sardine heads hydrolysis has shown a large interest. Extracted lipid quantities are not more important than those obtained with classical chemical extraction, but the hydrolysis conducted with Protamex has allowed to release the lipids in the liquid fractions (soluble and oily fractions). Both fractions have moreover a qualitative interest. Indeed, oily fraction is mainly composed of rich $\omega 3$ fatty acid neutral lipids, which possess wide benefits, and soluble

fraction possess three main cards: $\omega 3$ fatty acid rich neutral lipid, a high phospholipid quantity, and this fraction is the protein content fraction. While oily fraction can be removed by centrifugation step and then by micro-filtration, the soluble fraction should be finely purified, by using ultrafiltration techniques, in order to separate lipid and peptides parts. This is the reason why the fourth chapter of this work has been focused on this soluble fraction compounds separation. A further study on insoluble fraction could be investigated for their up-grading. At least, our objectives have been partly reached with a short time hydrolysis associate to a slight temperature which is economically suitable with a rapid production and a low energy consumption. Moreover, those conditions are also suitable for lipid preservation. Indeed, it is well known that a rapid reaction carried out in a low temperature will reduce risks of oxidation and trans fatty acids generation.

3.2. Hydrolyse des viscères de sardine

3.2.1. Hydrolyses mono-enzymatiques

3.2.1.1. *Cinétique et répartition de la matière*

L'évolution du degré d'hydrolyse obtenue pour chaque enzyme est représentée sur la Figure 69. D'une manière générale, l'évolution de l'hydrolyse atteint rapidement un plateau. Au bout de 1 h d'hydrolyse des viscères par Alcalase, aucune évolution n'est observée. Le degré d'hydrolyse est alors de 3%. Deux heures sont nécessaires pour atteindre le plateau avec Protamex (DH = 3%). L'hydrolyse conduite avec Flavourzyme se stabilise au bout de 3 h mais reprend longtemps après (au bout de 18 h), où le DH, stabilisé à 1%, atteint 2% au bout de 24 h. L'inactivation des enzymes endogènes améliore le DH obtenu avec les 3 enzymes. En effet, le fait d'inactiver les enzymes par chauffage (20 min à 80°C) permet une augmentation du DH d'un facteur 2 pour Protamex et 3,4 pour Alcalase et Flavourzyme respectivement. En ce qui concerne Protamex, la réaction d'hydrolyse dure environ 6 h puis se stabilise progressivement pour atteindre un DH de 6% au bout de 24 h. L'hydrolyse menée sur les viscères chauffées avec Alcalase conduit à l'obtention d'un plateau rapide au bout de 1h30 (DH = 6%) puis reprend au bout de 5 h pour monter à 8%. Ensuite, le DH augmente de façon très faible puis une reprise de l'activité est notée au bout de 20h et le DH atteint finalement 11%. Pour Flavourzyme, le profil obtenu avec les viscères chauffées est similaire à celui obtenu avec les viscères brutes, si ce n'est que les valeurs de DH enregistrées sont plus fortes (3% au bout de moins d'une heure et 6% au bout de 24 h).

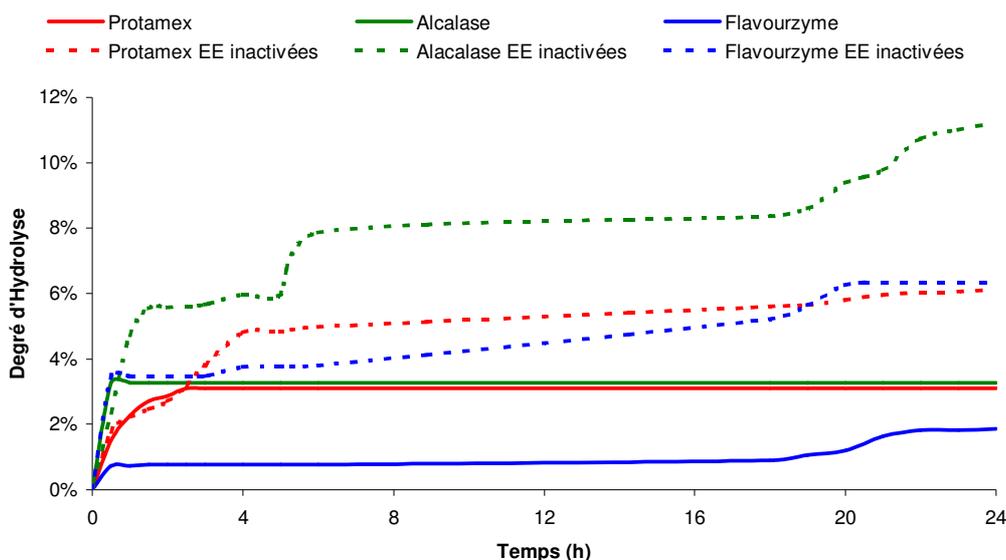


Figure 69 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex (0,1%), Alcalase (0,1%) et Flavourzyme (1,5%) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C avec ou sans inactivation des enzymes endogènes (EE). *DH evolution during 24 h hydrolysis of sardine viscera with Protamex, Alcalase and Flavourzyme with or without endogenous enzyme inactivation*

Les différentes répartitions de la matière au sein des trois fractions obtenues après l'hydrolyse et la centrifugation des viscères de sardine sont représentées sur la Figure 70. Sans hydrolyse, 46% de la matière est localisée dans la phase soluble, 30% dans la phase huileuse et 24% dans la phase insoluble. Après avoir réalisé les hydrolyses, la distribution de la matière sèche est similaire quelle que soit l'enzyme utilisée (environ 9% dans le culot, 11% dans la phase huileuse et 80% dans la fraction soluble). Ainsi, la réalisation d'une hydrolyse enzymatique sur les viscères de sardine permet une solubilisation de la matière.

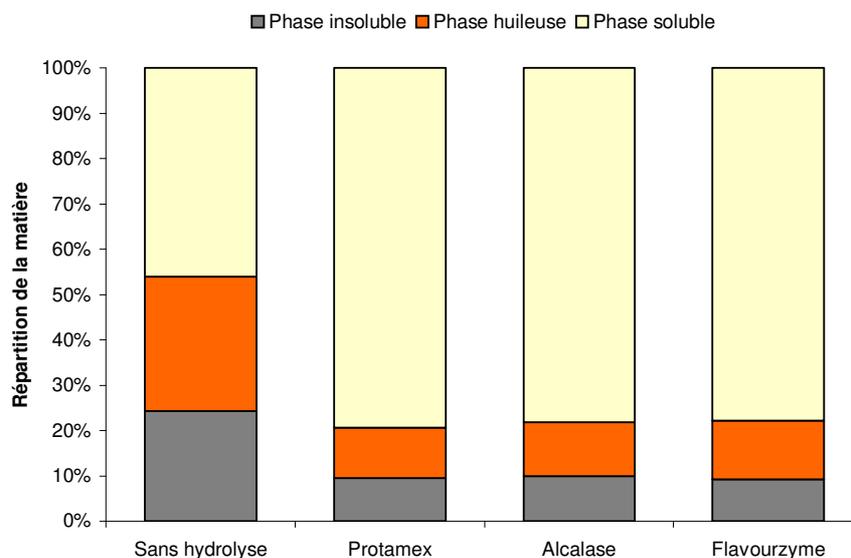


Figure 70 : Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les viscères de sardine non hydrolysées et hydrolysées (par Protamex, Alcalase et Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Dry matter repartition among soluble, oily and insoluble fractions generated by sardine viscera 24 h hydrolysis*

Les protéines sont majoritairement solubilisées puisque la plupart d'entre elles sont transformées en peptides, mais des lipides se retrouvent également dans la fraction soluble. En effet, d'après le Tableau XXXIX, le surnageant obtenu après une unique centrifugation des viscères ne comporte que $4,1 \pm 0,5$ g de lipides pour 100 g de matière sèche. Après hydrolyse, cette fraction est nettement enrichie en lipides, puisque, quelle que soit l'enzyme utilisée, environ 20 g de lipides sont retrouvés dans 100 g de matière sèche. Les teneurs en lipides des fractions huileuses demeurent à peu près équivalentes avant ou après hydrolyse. Enfin, il est à noter que la teneur en lipides de la fraction insoluble augmente légèrement (de 26 à 30 g de lipides pour 100 g de matière sèche pour Protamex et Alcalase) après avoir réalisé une hydrolyse.

Tableau XXXIX : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse des viscères de sardine par Protamex, Alcalase et Flavourzyme à pH8, 50°C et pendant 24 h. *Lipid content in fractions after 24 h sardine viscera hydrolysis*

	Sans hydrolyse	Protamex	Alcalase	Flavourzyme
Phase insoluble	26,1± 0,6	31,8± 2,0	32,5± 2,5	27,4± 1,0
Phase huileuse	68,2± 1,6	75,3± 1,0	66,2± 2,8	75,2± 5,3
Phase soluble	4,1± 0,5	18,3± 0,5	18,0± 0,8	20,7± 2,0

3.2.1.2. Libération des lipides

Après avoir effectué une hydrolyse enzymatique sur les viscères de sardine, la quantité de lipides extraits est plus importante que lors d'une extraction classique (Figure 71) puisque la teneur en lipides des viscères, initialement de $0,18 \pm 0,00$ g de lipides par g de viscères sèches, passe à plus de 0,25 g/g. Les teneurs en lipides obtenues après hydrolyse avec les 3 enzymes sont significativement différentes au seuil de 5% de celle obtenue sans traitement enzymatique. Ainsi, le ratio lipidique (lipides contenus dans la fraction liquide + lipides de la fraction huileuse + lipides de la fraction insoluble / lipides contenus dans les viscères non hydrolysées) est quasiment similaire pour Protamex et Alcalase (1,4) et atteint 1,5 pour Flavourzyme. Cependant, bien que les résultats soient différents entre les 3 traitements, aucune différence statistique n'a été décelée au seuil de 5%. La distribution des lipides est la même après le traitement enzymatique, quelle que soit l'enzyme utilisée. La fraction soluble

est la fraction qui comporte la plus grande partie de lipides (50 à 60% des lipides totaux), suivie de la fraction huileuse (32 à 39% des lipides totaux), alors que la fraction insoluble ne possède que 8 à 12% des lipides totaux.

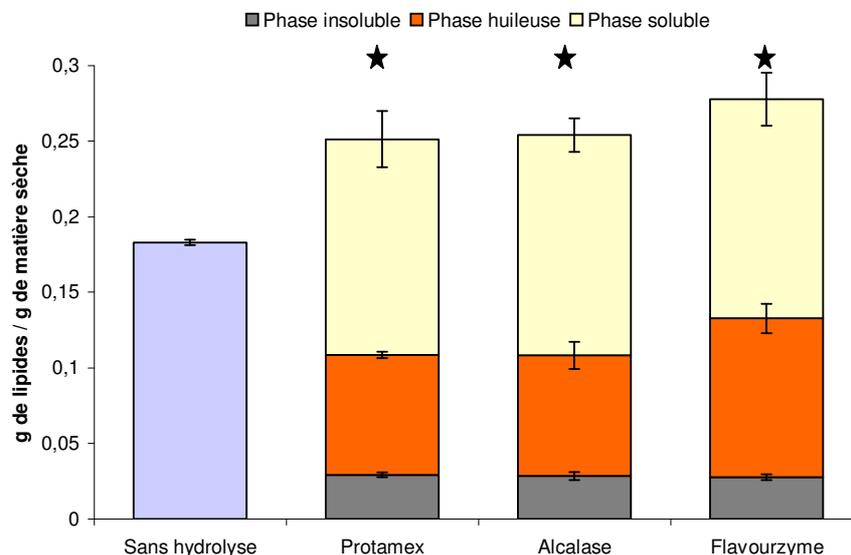


Figure 71 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées sur les viscères de sardine en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Lipid distribution among the fractions generated after 24 h hydrolysis of sardine heads compared to the lipid content in the raw material (in blue)*

3.2.1.3. Distribution des phospholipides

Concernant la distribution des phospholipides (Figure 72), il apparaît que l'hydrolyse des viscères de sardine avec Flavourzyme n'apporte pas une meilleure libération (au seuil de 5%) des phospholipides par rapport à celles obtenues classiquement. Par contre, l'hydrolyse enzymatique des viscères de sardine par Protamex ou Alcalase permet significativement d'obtenir une plus grande libération des phospholipides. Les deux enzymes conduisent à augmenter la disponibilité des phospholipides d'un facteur 1,8 pour Protamex et 2,8 pour Alcalase. La majeure partie des phospholipides est alors retrouvée dans la phase soluble : 68% pour Flavourzyme et 74% pour Alcalase et Protamex, alors que la fraction huileuse et le culot contiennent moins de 20% de phospholipides chacun.

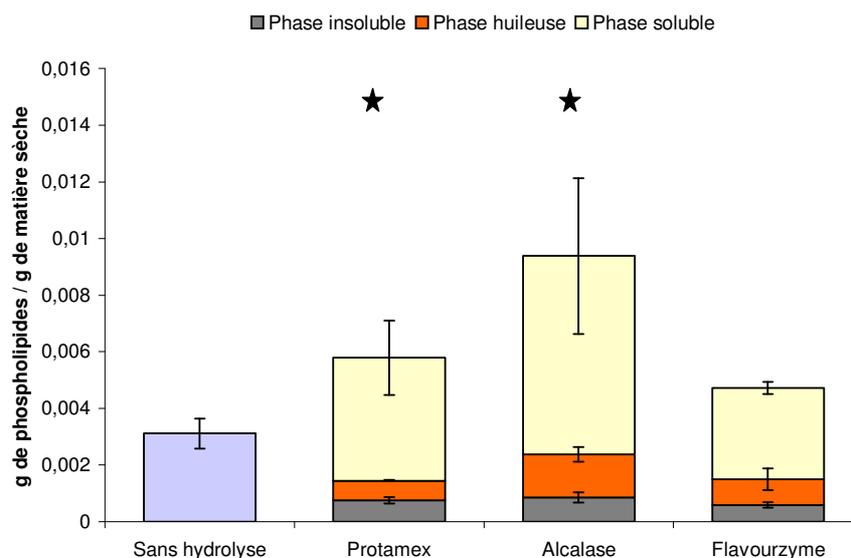


Figure 72 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées sur les viscères de sardine en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Phospholipid distribution among the fractions generated after 24 h hydrolysis of sardine heads compared to the phospholipid content in the raw material (in blue)*

3.2.1.4. Répartition des acides gras

La distribution des acides gras au sein des fractions obtenues avant et après hydrolyse des viscères de sardine est indiquée sur la Figure 73. La composition en acides gras de toutes ces fractions est détaillée dans l'Annexe C. De manière générale, après hydrolyse, la répartition des acides gras dans la fraction insoluble est identique quel que soit le traitement effectué. La fraction insoluble possède une part importante d'AGS (de 75 à 80%), les AGMI représentent environ 20% des acides gras totaux, et les AGPI sont retrouvés en très petites proportions (3 à 6%). Les traitements enzymatiques réalisés avec Protamex et Flavourzyme induisent une répartition similaire des acides gras dans les fractions huileuses. En effet, pour les deux enzymes, cette fraction est composée de 45% d'AGS, 30% d'AGMI et 25% d'AGPI. Alcalase ne permet pas d'obtenir une telle répartition puisque la fraction huileuse générée par cette enzyme possède 60% d'AGS, 34% d'AGMI et 6% d'AGPI. Les fractions solubles sont, quant à elles, toutes différentes en fonction du traitement. Alors que les AGS sont présents à hauteur de 45% avec Protamex et Alcalase, la fraction soluble de Flavourzyme n'en contient que 37%. Ces fractions possèdent toutes de 30 à 40% d'AGMI, la différence principale étant rencontrée avec les AGPI. Flavourzyme permet d'obtenir la part la plus importante d'AGPI (32% des acides gras totaux de la fraction soluble), suivie de Protamex (24% des acides gras

de la fraction soluble). Une fois de plus, l'hydrolyse menée avec Alcalase induit la plus faible proportion d'AGPI (15%).

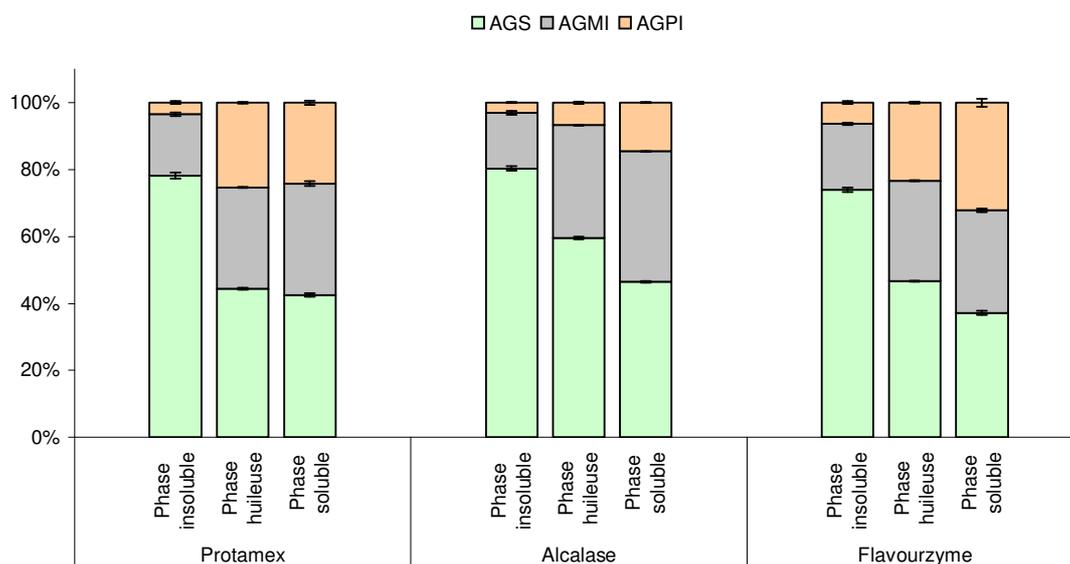


Figure 73 : Répartition des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) dans les différentes fractions obtenues après hydrolyse et/ou centrifugation des viscères de sardine. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. Saturated (AGS), mono-unsaturated (AGMI) and poly-unsaturated (AGPI) fatty acids repartition among fractions obtained after 24 h hydrolysis of sardine viscera

Les proportions des acides gras EPA et DHA vont dans le sens de ces observations (Tableau XL). En effet, ces deux acides gras sont présents en parts importantes dans les fractions liquides obtenues après hydrolyse avec Protamex (environ 14% des acides gras totaux de chaque fraction) et Flavourzyme (~ 13% des acides gras totaux de la fraction huileuse et ~ 20% de ceux de la fraction soluble). Après hydrolyse avec Alcalase, les proportions en EPA + DHA sont beaucoup plus faibles (moins de 10% des acides gras totaux de chaque fraction).

Tableau XL : Proportion en EPA + DHA (%) dans les différentes fractions obtenues avant et après hydrolyse des viscères de sardine par Protamex, Alcalase et Flavourzyme pendant 24 h, à pH 8 et à 50°C. EPA and DHA proportions on fractions obtained after 24 h sardine viscera hydrolysis

	Phase insoluble	Phase huileuse	Phase soluble
Protamex	1,3 ± 0,1	14,4 ± 0,2	14,5 ± 0,8
Alcalase	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	6,5 ± 0,1
Flavourzyme	3,3 ± 0,3	13,0 ± 0,2	20,2 ± 3,1

3.2.1.5. Répartition des poids moléculaires des peptides

La répartition des profils de poids moléculaires des viscères brutes et des peptides générés par les hydrolyses est représentée par la Figure 74. La répartition des poids

moléculaires des peptides est quasiment la même avant hydrolyse (profil A) qu'après (profils B, C et D). Un pic important de poids moléculaire approximatif de 40 kDa, présent dans la matière première, semble subsister après hydrolyse, quel que soit le traitement. Les autres peptides obtenus possèdent tous un poids moléculaire inférieur à 10 kDa.

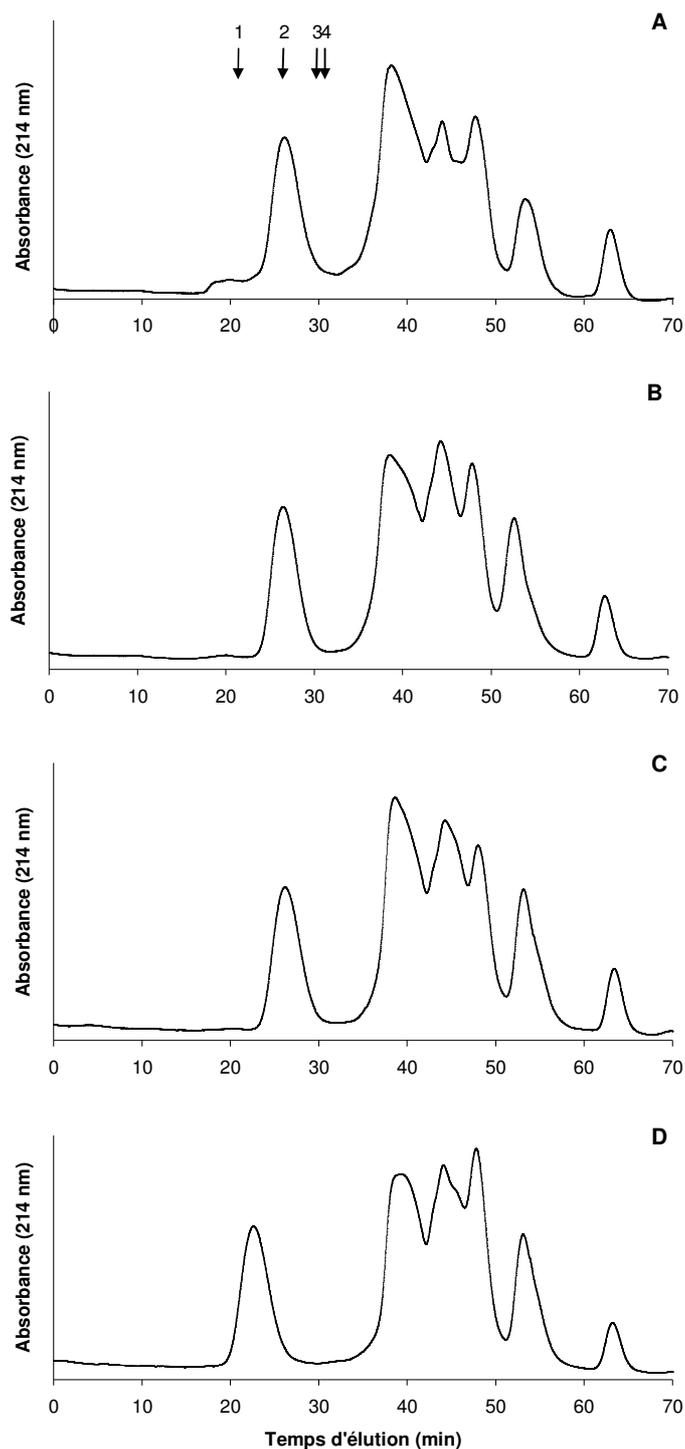


Figure 74 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de viscères de sardine lors des hydrolyses de 24 h à pH 8 et à 50°C. A : viscères de sardine brutes; B: viscères de sardine hydrolysées avec Protamex 0,1%, C : viscères de sardine hydrolysées avec Alcalase 0,1% ; C : viscères de sardine hydrolysées avec Flavourzyme 1,5%. 1: Albumine (67000 Da); 2: Ovalbumine (43000 Da); 3: Chymotrypsinogène A (25000 Da); 4: Ribonucléase (13700 Da). Gel filtration chromatograms showing the distribution of sardine viscera FPH fraction molecular weight

3.2.1.6. Discussion

Les cinétiques d'hydrolyse observées pour l'ensemble des expériences montrent qu'un plateau est rapidement atteint concernant l'hydrolyse des viscères de sardine, quel que soit le traitement effectué. Aspino *et al.*, qui ont mesuré l'évolution de l'hydrolyse en fonction de la solubilisation de la matière et de la récupération de l'azote dans la fraction soluble, ont montré également l'obtention rapide d'un plateau (moins de 5 h), sur des hydrolyses de 24 h menées sur des viscères de morue avec de nombreuses enzymes, dont Alcalase et Protamex (Aspino *et al.* - 2005a). Cependant, la reprise de l'activité enzymatique observée avec Flavourzyme demeure difficile à expliquer. Elle pourrait provenir d'une contamination extérieure (bactérienne par exemple), ou de la modification de la conformation des composés présents dans le milieu réactionnel (dus à la cuisson, la présence d'eau dans le milieu, l'apport en sels provoqué par l'addition de soude, l'altération des protéines ou des lipides...). **Ainsi, alors que pour les têtes de sardine, les cinétiques montraient une activité continue et longue (cf. 3.1.1.1), l'activité protéolytique sur les viscères est rapidement arrêtée.** L'hypothèse alors émise lors des hydrolyses des têtes serait ainsi toujours valable, les viscères ne possédant pas de tissus « durs » tels que les os, cartilages ou arêtes. Les DH obtenus lors de cette série d'expériences sont faibles (2 à 3%) mais respectent la hiérarchie des activités enzymatiques obtenues lors de la phase de calibration des enzymes (cf. chapitre 2). Ainsi, le plus grand DH est obtenu avec Alcalase, qui possède l'activité la plus importante, suivie de Protamex et Flavourzyme. Par ailleurs, les DH obtenus ici sont de même ordre de grandeur (environ 5%) que ceux obtenus dans d'autres études portées sur la sardine hydrolysée avec Alcalase (Quaglia et Orban - 1990; Ravallec-Plé *et al.* - 2001). Des DH plus importants (pouvant aller jusqu'à 20%) ont cependant été obtenus, pour des études relatives à différentes espèces et co-produits de poisson (Liaset *et al.* - 2000; Nilsang *et al.* - 2005) et après avoir réalisé une optimisation des conditions d'hydrolyse (Diniz et Martin - 1996; Sumaya-Martínez *et al.* - 2005; Nilsang *et al.* - 2005). Ce n'est pas le cas ici où les hydrolyses ont été conduites d'après les conditions déterminées sur un substrat modèle. L'inactivation des enzymes endogènes a permis d'obtenir des DH beaucoup plus importants. Des études réalisées en inactivant les enzymes endogènes, présentent des DH similaires sur les viscères de poisson (Guérard *et al.* - 2001). Le fait d'inactiver les enzymes endogènes par traitement thermique peut conduire à une déstructuration physique de la matrice, ce qui conduirait à rendre plus accessibles les protéines pour une hydrolyse plus importante. Mais nous avons également vu dans le chapitre précédent que les enzymes endogènes présentes dans les viscères étaient les plus actives dans

les conditions dans lesquelles ont été conduites nos hydrolyses. Les DH correspondant obtenus sans inactivation des enzymes endogènes devraient donc être plus forts. **Ceci indique que les enzymes endogènes possèdent un effet antagoniste avec les enzymes ajoutées au système.** En effet, nous pourrions supposer, au regard de nos résultats, que les enzymes endogènes exercent un effet destructeur sur les enzymes exogènes ou que les enzymes endogènes hydrolysent les enzymes exogènes. Toutefois, comme Gildberg l'a souligné, les tissus de poisson sont des substrats très complexes contenant une grande quantité d'inhibiteurs, ce qui rend l'explication de l'hydrolyse très difficile (Gildberg - 1993). Quoiqu'il en soit, Aspino *et al.* ont démontré l'intérêt de l'utilisation des enzymes exogènes sans inactiver les enzymes endogènes sur l'hydrolyse des viscères de poisson, notamment pour la solubilisation de la matière (Aspino *et al.* - 2005a).

La répartition de la matière sèche avant et après hydrolyse indique que le traitement enzymatique permet une grande libération et solubilisation de la matière. Avant l'hydrolyse enzymatique, 24% de la matière étaient localisés dans le culot, alors que 9% seulement restent dans cette fraction après hydrolyse. Environ 80% de la matière totale sont donc sous forme soluble. Une étude récente sur l'hydrolyse de viscères de morue dans des conditions similaires (24 h de réaction avec Protamex et Alcalase à 55°C) montrait également une grande solubilisation de la matière (Aspino *et al.* - 2005a). **Nos résultats indiquent donc qu'un faible DH peut engendrer une grande solubilisation de la matière.**

Les hydrolyses enzymatiques ont permis une plus importante libération des lipides qu'une extraction classique. Ces résultats indiquent que, lors des extractions classiques, même en prenant de grandes précautions, telles qu'un broyage fin des matrices et une phase d'incubation dans un solvant polaire avant le contact avec le solvant apolaire, **la totalité des lipides présents dans la matrice n'est pas forcément extraite. Dans le cas de matrices élastiques et difficilement broyables, comme les viscères par exemple, mais aussi les peaux de poisson, une hydrolyse permet une plus grande libération des lipides, tout du moins une plus grande accessibilité.** Ces résultats ont déjà été obtenus auparavant dans le Laboratoire dans le cadre d'hydrolyses réalisées sur les co-produits de morue (Dumay *et al.* - 2004). Eventuellement, une seconde extraction chimique pourrait améliorer les rendements, mais ceci engendrerait une consommation de solvants et de temps plus importante (Roose et Smedes - 1996). Il a été effectivement montré que la majorité des lipides était extraite en deux ou trois cycles (Christie - 1993). De précédentes études menées sur l'obtention de lipides par protéolyse de co-produit marins ont montré la possibilité de récupérer une part importante de

lipides. Ainsi, Linder *et al.* en hydrolysant les têtes de saumon par Alcalase, Neutrase ou Flavourzyme obtiennent plus de 85% des lipides totaux dans la phase huileuse (Linder *et al.* - 2005), sans avoir analysé les autres fractions générées par le procédé. Si ces dernières analyses avaient été effectuées, elles auraient sans doute montré que la somme des lipides contenues dans toutes les fractions générées par l'hydrolyse est supérieure à la somme des lipides extraits sur la matière première. **Par ailleurs, grâce au traitement enzymatique, autour de 90% des lipides de viscères de sardine sont localisés dans les fractions liquides (i.e. dans les fractions huileuses et solubles).** Ces lipides pourraient ainsi être récupérés sans avoir recours aux solvants, mais en utilisant des techniques douces comme la filtration membranaire. De plus, outre le grand intérêt de ce traitement pour la récupération des lipides, à ce jour encore peu développé dans la littérature, le reste des composés de la fraction soluble pourrait ensuite être valorisé en alimentation animale, en nutrition humaine, en tant que source azotée ou en recherchant des molécules possédant une activité biologique. En effet, la plupart de ces applications requièrent des produits possédant une forte teneur en peptides et une faible teneur en lipides, comme décrit amplement dans la partie bibliographique.

De façon similaire, les hydrolyses enzymatiques réalisées avec Protamex et Alcalase ont permis une meilleure libération des phospholipides, pouvant aller jusqu'à un facteur 2,8. Comme évoqué plus haut, les phospholipides sont majoritairement localisés dans la fraction soluble (environ 70%). **Comme pour les lipides, environ 90% des phospholipides sont localisés dans les fractions liquides, représentant environ 2 fois plus de phospholipides extraits que par la méthode utilisant les solvants.** Les phospholipides pourront donc ainsi, de la même façon que pour les lipides, être récupérés sans avoir recours aux solvants, à l'aide de la filtration membranaire par exemple. L'hydrolyse des viscères de morue par Flavourzyme a également montré que les phospholipides se situaient principalement dans la fraction soluble (Daukšas *et al.* - 2005). De telles fractions enrichies en phospholipides possèdent potentiellement des activités biologiques intéressantes (Murakami *et al.* - 1988; Hostetler *et al.* - 1994a; Hostetler *et al.* - 1994b; Murakami-Murofushi *et al.* - 1995; Fischer *et al.* - 1998; Cheng *et al.* - 2000; Tamehiro *et al.* - 2002). A défaut, ces fractions riches en phospholipides pourraient être utilisées en alimentation ou en nutrition, du fait de leurs actions sur la santé (Schneider - 2001). Par exemple, en aquaculture, l'alimentation des larves supplémentée en phospholipides apparaît essentielle pour le bon développement (Cahu *et al.* - 2003).

Les hydrolyses enzymatiques jouent également un rôle dans la distribution des acides gras. **En effet, les acides gras saturés se retrouvent en grande quantité dans la fraction insoluble, et les acides gras insaturés dans les fractions liquides.** Ce constat a surtout été établi dans le cas d'hydrolyses conduites avec Protamex et Flavourzyme, Alcalase donnant des résultats moins intéressants. En effet, comme évoqué précédemment lors de l'analyse de la protéolyse des têtes de sardine, le traitement protéolytique réalisé avec Alcalase induit de faibles quantités d'AGPI, quelle que soit la fraction considérée. **Il semblerait ainsi que l'enzyme choisie affecte la composition en acides gras des hydrolysats.** A ce jour et selon nos connaissances, aucune étude n'a mentionné ce postulat et aucune analyse d'acides gras réalisée sur des hydrolysats obtenus avec Alcalase n'a été comparée avec celles obtenues avec d'autres enzymes. Il serait alors très intéressant par la suite, d'approfondir ces résultats et de montrer si ce qui s'est avéré pour les co-produits de sardine l'est aussi pour d'autres matrices. Une étude portée sur l'hydrolyse des co-produits de morue n'a montré aucune différence quant à la composition des acides gras des fractions générées par Flavourzyme ou Neutrase (Daukšas *et al.* - 2005). Ainsi, à l'instar des lipides et des phospholipides, les acides gras insaturés, notamment l'EPA et le DHA pourront être concentrés dans les fractions liquides et récupérés sans utiliser de solvant. **Les lipides contenus dans ces fractions liquides sont à la fois ainsi enrichis en phospholipides et en acides gras insaturés.**

La comparaison des profils de répartition des poids moléculaires des peptides obtenus avant et après hydrolyse indique que peu de différences sont apparues lors de l'hydrolyse. Aspino *et al.* montrent que, lors de l'hydrolyse de viscères réalisées avec Alcalase et Protamex, ces deux enzymes conduisent également à des profils de répartition des poids moléculaires des peptides équivalents (Aspino *et al.* - 2005a{ Aspino, Horn). Cependant, il est important de noter que dans ce genre de fractionnement, seuls les peptides solubles peuvent être analysés. Pour pouvoir étudier toutes les protéines, une électrophorèse pourrait sans doute donner plus de détails. De plus, le domaine de fractionnement de la colonne utilisée ici est trop grand (de 13,7 à 67 kDa). La majorité des peptides décelés étant de taille plus petite, il conviendra, pour la suite de nos analyses (lors des hydrolyses combinées) de travailler sur une colonne au domaine de fractionnement plus petit. En effet, l'utilisation d'une colonne possédant un domaine de fractionnement plus précis pourrait montrer des différences ici non décelables. Cependant, il est intéressant de noter que, pour toutes les hydrolyses effectuées, les peptides obtenus sont de petit poids moléculaire.

L'étude de la cinétique d'hydrolyse des viscères de sardine indique qu'un temps court est suffisant pour mener la protéolyse. La conduite d'un traitement enzymatique sur les viscères permet une solubilisation de 80% de la matière totale. De plus, les quantités de lipides et phospholipides extraits après hydrolyses sont plus importantes, la solubilisation de la matrice ayant permis une accessibilité aux lipides plus importante. Outre le fait que la quantité de lipides extraits soit plus importante après hydrolyse, plus de 90% des lipides et phospholipides totaux sont récupérés dans les fractions liquides et les AGPI sont présents en grandes proportions dans ces fractions. Ces lipides pourront ainsi être obtenus sans avoir recours aux solvants. Comme évoqué lors de l'analyse des têtes de sardine, Alcalase semble être néfaste pour l'obtention des AGPI.

*Kinetics of hydrolysis indicate that a plateau is quickly obtained during sardine viscera hydrolysis, regardless the enzyme used. Aspino et al. who have measured hydrolysis evolution with matter solubilization and nitrogen recovery, have also shown the quick plateau obtention (in less than 5 h), on 24 h cod viscera hydrolysis with Protamex and Alcalase (Aspino et al. - 2005a). The fact that hydrolysis is beginning again with Flavourzyme is hard to explain. It could be due to an external contamination (with bacteria for example), or to the modification of the proteins conformation in the system (according to the cooking, the presence of water, the salts addition, the proteins and lipids alteration...). **Hence, while during sardine heads hydrolysis, kinetics were continue and durable (see 3.1.1.1), proteolysis of viscera is not as long. The previous hypothesis concerning bone and cartilage hydrolysis with heads treatment is still suitable here, due to the absence of bone and cartilage in viscera. DH** obtained during this step are quiet low (2 to 3%) but they are in the same order as the enzymes activities obtained during the chapter 2. Hence, Alcalase, which has the highest activity, also had the highest DH, followed by Protamex and Flavourzyme. DH results obtained were in the same range (not more than 5% variation) as those previously obtained on sardine with Alcalase 0.1% even under different hydrolysis conditions (Quaglia et Orban - 1990; Ravallec-Plé et al. - 2001). Nevertheless, higher DH (up to 20%) have been obtained on other by-product and fish species (Liaset et al. - 2000; Nilsang et al. - 2005), notably after hydrolysis optimization using statistical models (such as experimental design) (Diniz et Martin - 1996; Sumaya-Martínez et al. - 2005; Nilsang et al. - 2005). This was not the case here where hydrolysis was carried out under optimum conditions determined in model system (haemoglobin hydrolysis), and it is well known that these conditions change with the*

substrate. Inactivation of endogenous enzymes has led to obtain higher DH. Numerous studies have been realized with the inactivation of endogenous enzymes and some of them obtained the same DH range as us (Guérard et al. - 2002). The inactivation of endogenous enzymes could induce the physical modification of the viscera and enhance the proteins accessibility for a more important hydrolysis. However, we have seen in the former chapter that endogenous enzymes possess their maximum activity at pH8 and at 50°C. Hence, DH obtained without heating step should be highest than those obtained with inactivation. **This indicates that there is some antagonists effects between endogenous and exogenous enzymes.** Indeed, we can suppose that according to our results, endogenous enzymes could hydrolyse and denature external enzymes. However, as Gildberg has reported, “since fish tissue is a very complex substrate and also contains large amounts of protease inhibitors, it is impossible to explain the hydrolysis in details”(Gildberg - 1993). Anyway, Aspino *et al.* have demonstrated the need of using endogenous enzyme conjointly with exogenous ones for fish viscera hydrolysis, especially concerning matter solubilization (Aspino et al. - 2005a).

The dry matter repartition before and after hydrolyses indicates that the enzymatic treatment allows a high matter solubilization. Before conducting hydrolyses, 24% of the matter were localized in the sludge, while only 9 % remained in the insoluble fraction after hydrolyses, regardless of the enzyme used. On the other side, about 80% of the total matter are recovered in the soluble fraction. A recent study on hydrolysis of cod viscera (Aspino et al. - 2005a) also showed high solubilization of the dry matter under similar conditions (24 h hydrolysis at 55°C with Alcalase and Protamex, only pH and pH control were different). **Thus, the solubilization of matter appears independent of high DH values.**

Enzymatic hydrolysis have enabled a higher lipid liberation than a classical extraction. These expected results reveal that even with precautions taken such as pre-incubation phase of fresh tissues with a polar solvent and a vigorous mixing before adding less polar solvent, the lipid extraction was not complete with classical organic extraction. The additional lipids obtained by using proteolytic enzymes were probably among the most difficult to extract by classical methods. **With elastic or ungrindable matrixes, as fish viscera or skin, hydrolysis could led to a better lipid extraction.** Such results have already been obtained in the Laboratory during cod by-products hydrolysis (Dumay et al. - 2004). Eventually, it has been reported that more lipids have been extracted with 2 or 3 extraction cycles (Christie - 1993). While a second extraction could enhance the yield of extraction, this is more solvent- and time- intensive (Roose et Smedes - 1996). In the case of elastic matrixes,

such as viscera or skin, enzymatic hydrolysis allows a higher lipid liberation, or a better accessibility. A previous study on lipid release by proteolysis on marine by-products has shown the possibility to obtain around 85% of total lipid in oily fraction (Linder et al. - 2005). But the lipid contents in the other fractions are not mentioned. The sum of all the lipids recovered in all the generated fractions could conduct to the same conclusions as ours: an enhancement of total lipid extraction. **Furthermore, after realizing an hydrolysis, around 90% of the lipids from sardine viscera are localized in the liquid fractions (i.e. in the oily and the soluble fractions).** These lipids could be recovered without the use of solvents, using mild procedures such as membrane filtration. Moreover, aqueous phases could be up-graded, as feed (due to their high nutritional value), food ingredient, nitrogen source in microbial growth media or for their bioactive properties Mackie - 1978; Mackie - 1982; Quaglia et Orban - 1987b; Quaglia et Orban - 1990; Gildberg - 1993; Liaset et al. - 2000; Kristinsson et Rasco - 2000b; Ravallec-Plé et al. - 2001; Guérard et al. - 2001; Liaset et al. - 2003; Nilsang et al. - 2005; Je et al. - 2005. In most of the cases, those applications have been established with high protein and low lipid content products, as widely described in the first chapter of this work.

Results obtained for phospholipids are quite similar than those obtained for lipids and phospholipid contents have been multiplied by a maximum factor of 2,8. As mentioned earlier, phospholipids are mainly recovered in the soluble fraction (around 70%). **Like for lipids, around 90% of phospholipids are localized in the liquid fractions (representing 2 times more phospholipids than classical extraction) and could be obtained, in the same way, without solvents requiring, by membrane filtration.** This has been previously shown on cod viscera hydrolysis which leads to the recovery of phospholipids in soluble fraction (Daukšas et al. - 2005). Such enriched fractions possess high potential, as phospholipids have shown interesting biological activities (Murakami et al. - 1988; Hostetler et al. - 1994a; Hostetler et al. - 1994b; Murakami-Murofushi et al. - 1995; Fischer et al. - 1998; Cheng et al. - 2000; Tamehiro et al. - 2002). Nevertheless, without biological activities, those fractions could be used in feed or fed as these lipids are known to offer health benefits (Schneider - 2001). For example, in aquaculture, larval feed is supplemented with phospholipids which appear essential for good development (Cahu et al. - 2003).

Proteolysis also plays a role in the fatty acid distribution. **Indeed, saturated fatty acids are mainly located in insoluble fraction and the most part of unsaturated fatty acids are found in liquid fractions.** This was mostly observed with Protamex and Flavourzyme

treatments, Alcalase treatments lead to less interesting results. We have previously reported that, during heads hydrolysis, Alcalase treatment lead to a loss of unsaturated fatty acids compared to other treatments. Those results have been here confirmed with viscera hydrolysis. **It seems that enzyme could modify the fatty acid hydrolysate composition.** Nowadays, according to our knowledge, none study has mentioned this before. It would be of great interest, during a further study, to extent this point and to show if what we have obtain on sardine by-product is also true on other matrixes. A study realized on fatty acid composition of cod by-product hydrolysis with Flavourzyme and Neutrasedo do not conclude to different fatty acid profiles according to the enzyme used (Daukšas et al. - 2005). Thus, as concluded for lipids and phospholipids, unsaturated fatty acids, especially EPA and DHA could be concentrated in the liquid fractions and recovered without the need of solvents. **Lipids obtained in such fractions are then enriched in phospholipids and in interesting fatty acids.**

The comparison of molecular weight peptides profiles obtained before and after hydrolysis indicates that slight differences have occurred during hydrolysis. Aspino *et al.* obtained similar MWCO profiles with hydrolysis conducted on viscera hydrolysis by Protamex and Alcalase (Aspino *et al.* - 2005a). However, it should be noticed that only soluble peptides and proteins were analyzed here. Indeed, to study the totality of the proteins, an electrophoresis will be more appropriated. Furthermore, the fractionation range of the column is too high (from 13.7 to 67 kDa). The main part of the peptides are small ones, so it would be more pertinent, for the rest of our study, to work on a different column with a lower fractionation range.

The study of the hydrolysis kinetics of sardine viscera indicates that a short time hydrolysis is sufficient. During hydrolysis, 80% of the viscera matter is solubilized. Moreover, lipid and phospholipids quantities extracted are higher than those obtained by chemical extraction, the solubilisation of the matrix permitting a better lipid accessibility. Furthermore, more than 90% of lipids and phospholipids have been recovered in the liquid fractions and PUFA are represented in high proportions in these fractions. Such lipids could be further obtained without solvent requiring. In addition, as mentioned in the heads part, Alcalase induce a loss of PUFA recovery.

3.2.2. Hydrolyses multi-enzymatiques : effet de la conjugaison des enzymes

3.2.2.1. Cinétique et répartition de la matière

Les évolutions des hydrolyses menées avec plusieurs complexes enzymatiques sont différentes de celles obtenues lors des hydrolyses simples. En effet, dans le cas de la combinaison d'enzymes (Figure 75), les hydrolyses possèdent toutes le même profil. L'hydrolyse démarre dès l'ajout de l'enzyme, avec une vitesse importante au cours des 2-3 premières heures, pour atteindre 4% pour le couple Alcalase-Flavourzyme, 6% pour les 3 enzymes ensemble, 7% pour Protamex-Alcalase et 9% pour Protamex-Flavourzyme. Un plateau est alors atteint qui mène jusqu'à la sixième heure d'hydrolyse. L'activité reprend ensuite, plus ou moins intensément. Les hydrolyses menées avec Protamex-Alcalase et Protamex-Flavourzyme ne conduisent pas à une reprise importante de l'hydrolyse, mais ce sont les expériences qui avaient mené en premier lieu aux DH les plus importants. Au bout de 24 h, les DH obtenus avec ces deux mélanges sont de 11%. Les hydrolyses conduites avec Alcalase-Flavourzyme et Protamex-Alcalase-Flavourzyme connaissent une reprise de l'hydrolyse plus importante au bout de 6 h. Ainsi, le DH final obtenu pour le couple Alcalase-Flavourzyme est de 7% et il atteint 11% avec les trois enzymes.

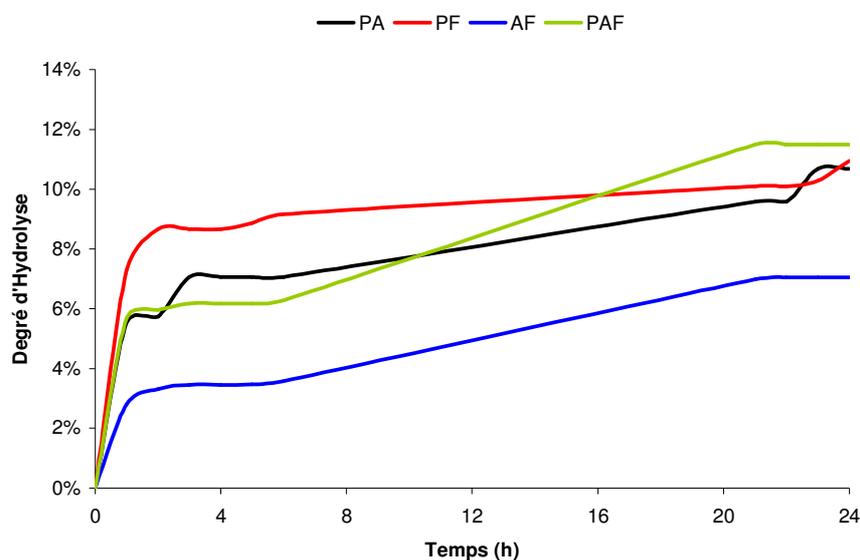


Figure 75 : Evolution du degré d'hydrolyse lors de l'hydrolyse combinée des viscères de sardine par Protamex (0,1%, P), Alcalase (0,1%, A) et Flavourzyme (1,5%, F) pendant 24 h à pH 8 et à 50°C. *DH evolution during 24 h multi-enzyme hydrolysis of sardine viscera with Protamex (P), Alcalase (A) and Flavourzyme (F)*

La répartition de la matière au sein des trois fractions générées par l'hydrolyse montre une fois de plus que les hydrolyses permettent une solubilisation de la matière (Figure 76).

Sans hydrolyse, 46% de la matière sèche est localisée dans la phase soluble, 30% dans la phase huileuse et 24% dans la phase insoluble. Après avoir réalisé les hydrolyses, la distribution de la matière sèche est similaire quelle que soit le mélange enzymatique utilisé : 80% de la matière se retrouve dans la fraction soluble et environ 10% de la matière dans les deux autres fractions. Ces résultats sont sensiblement identiques à ceux obtenus lors de la conduite des hydrolyses avec une seule enzyme. Cependant, les lipides ne se solubilisent pas.

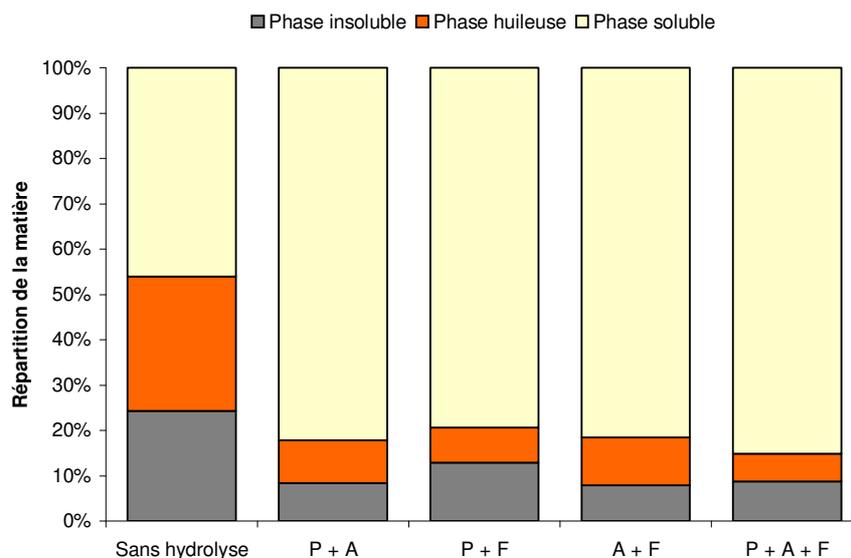


Figure 76: Répartition de la matière sèche dans les différentes fractions (insoluble, huileuse et soluble) après centrifugation pour les viscères de sardine non hydrolysées et hydrolysées avec plusieurs enzymes (P : Protamex, A : Alcalase, F : Flavourzyme). Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex ou Alcalase et 1,5% de Flavourzyme. *Dry matter repartition among soluble, oily and insoluble fractions generated after 24 h multi-enzymes sardine viscera hydrolysis*

En effet, alors que la teneur en lipides dans la fraction soluble des hydrolyses simples atteignait environ 20 g pour 100 g de matière sèche, il n'est retrouvé dans cette fraction après hydrolyse des viscères par plusieurs enzymes que environ 10 g de lipides pour 100 g de matière sèche (Tableau XLI). La phase insoluble, qui possède une teneur en lipides initiale de $26,1 \pm 0,6$ g/100g, voit sa teneur en lipides augmenter après hydrolyse de 25% pour Protamex-Alcalase, de 59% avec Protamex-Flavourzyme et de 81% avec les trois enzymes. Par contre, la phase huileuse a été purifiée puisque la teneur en lipides dans cette phase a été augmentée, passant de $68,2 \pm 1,6$ g/100g dans la fraction initiale à environ 80% après avoir conduit une hydrolyse combinée.

Tableau XLI : Teneur en lipides en g pour 100 g de matière sèche dans chaque fraction (insoluble, huileuse et soluble) avant et après hydrolyse combinée des viscères de sardine par Protamex (P), Alcalase (A) et Flavourzyme (F) à pH8, 50°C et pendant 24 h. *Lipid content in fractions afte 24 h multi-enzymes sardine viscera hydrolysis*

	Sans hydrolyse		P + A	P + F	A + F	P + A + F
Phase insoluble	26,1±	0,6	32,7± 5,9	41,5± 9,5	28,6± 4,9	47,2± 18,8
Phase huileuse	68,2±	1,6	80,4± 5,1	84,5± 3,4	72,5± 0,9	81,0± 3,7
Phase soluble	4,1±	0,5	11,3± 0,5	8,7± 0,4	9,8± 0,4	9,5± 0,7

3.2.2.2. Libération des lipides

L'hydrolyse multi-enzymes des viscères de sardine conduit à une amélioration de l'extraction des lipides par rapport à une extraction classique (Figure 77). En effet, la quantité de lipides extraits est augmentée d'un facteur 1,2 avec le mélange Protamex-Alcalase. Viennent ensuite les hydrolyses menées avec Protamex-Flavourzyme et Alcalase-Flavourzyme où la quantité de lipides extraits est de environ 0,20 g/g de viscères de sardine sèches (sans hydrolyse, la quantité de lipides extraits était de 0,18 g/g). Enfin, un troisième groupe peut être défini avec les résultats obtenus avec le mélange enzymatique Protamex-Alcalase-Flavourzyme, qui ne permet pas une récupération complète des lipides initialement libérés. Quels que soient les résultats obtenus pour chaque traitement, tous sont significativement différents, au seuil de 5%, de ceux obtenus sans avoir réalisé d'hydrolyse.

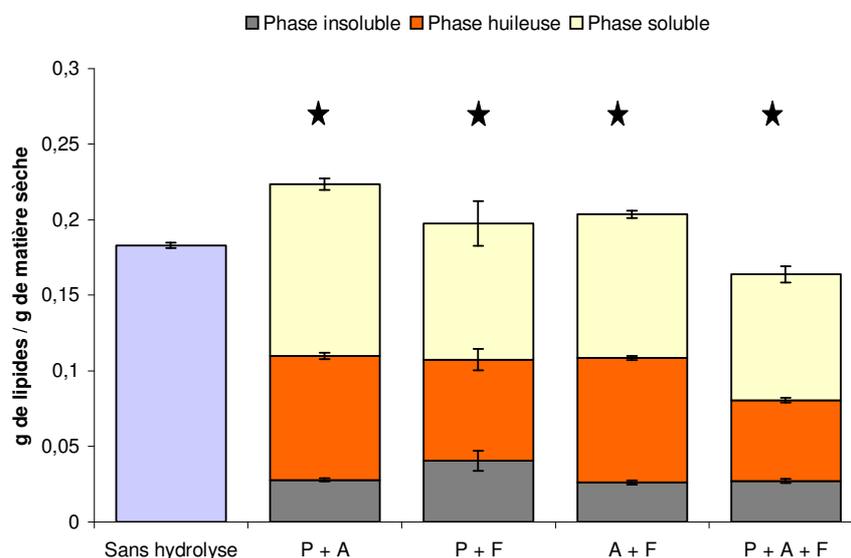


Figure 77 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses combinées réalisées sur les viscères de sardine en comparaison avec la quantité de lipides extraits sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex (P) ou Alcalase (A) et 1,5% de Flavourzyme (F). « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Lipid distribution among the fractions generated after 24 h multi-enzymes sardine viscera hydrolysis compared to the lipid content in the raw material (in blue)*

La répartition des lipides au sein des trois fractions générées par l'hydrolyse semble identique quel que soit le traitement réalisé. En effet, environ 50% des lipides sont localisés dans la fraction soluble, 33-41% dans la fraction huileuse et 12-20% dans la fraction insoluble.

3.2.2.3. Distribution des phospholipides

La distribution des phospholipides après hydrolyse multi-enzymatique sur les viscères de sardine est représentée sur la Figure 78.

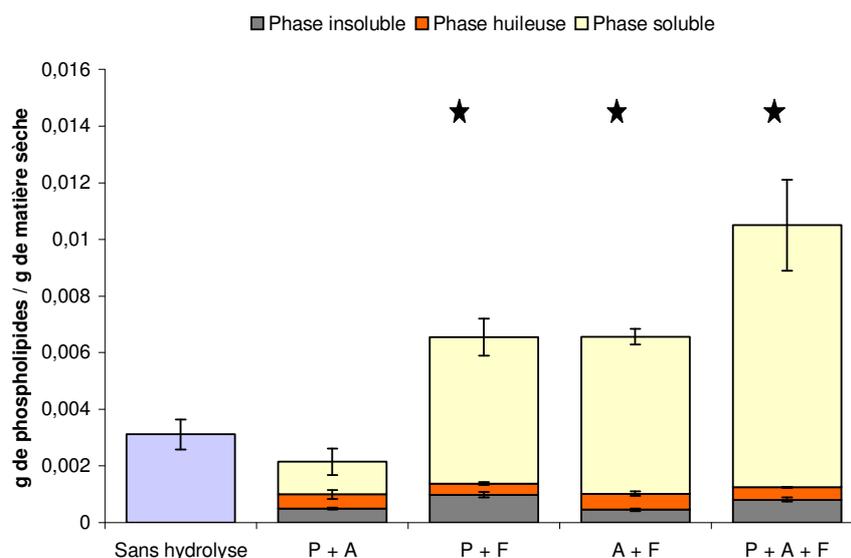


Figure 78 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses combinées réalisées sur les viscères de sardine en comparaison avec la quantité de phospholipides obtenue sans hydrolyse. Les hydrolyses ont été conduites durant 24 h, à pH 8 et à 50°C avec 1 volume d'eau et avec 0,1% de Protamex (P) ou Alcalase (A) et 1,5% de Flavourzyme (F). « * » indique que les résultats sont significativement différents du témoin (sans hydrolyse), avec un niveau de confiance de 95%. *Phospholipid distribution among the fractions generated after 24 h multi-enzymes sardine viscera hydrolysis compared to the phospholipid content in the raw material (in blue)*

Le traitement par plusieurs enzymes des viscères de sardine conduit à une différence significative au seuil de 5% par rapport à un traitement classique, excepté pour le traitement utilisant Protamex et Alcalase. Pour ce dernier, aucune différence significative n'a été trouvée par rapport au témoin (sans hydrolyse). Les autres hydrolyses permettent d'augmenter significativement la disponibilité des phospholipides. Deux groupes peuvent ainsi être formés. Les protéolyses réalisées avec Protamex-Flavourzyme et Alcalase-Flavourzyme permettent d'augmenter la disponibilité des phospholipides d'un facteur 2,1. Le traitement le plus efficace est l'utilisation conjointe des trois enzymes puisqu'il permet d'augmenter la disponibilité des phospholipides d'un facteur 3,3. Concernant la répartition des

phospholipides au sein des fractions générées par hydrolyse, les phospholipides sont localisés principalement dans les fractions liquides, plus spécifiquement dans la fraction soluble (possédant de 79 à 88% des phospholipides totaux). Les fractions huileuses de ces fractions renferment 4 à 9% des phospholipides totaux.

3.2.2.4. Répartition des poids moléculaires des peptides

Les profils de répartition des poids moléculaires obtenus sont représentés sur la Figure 79. Ces profils sont similaires quel que soit le traitement utilisé. Comme décrit précédemment dans le cas des hydrolyses simples, la plupart des peptides générés par les hydrolyses combinées sont de poids moléculaire inférieur à 10 kDa.

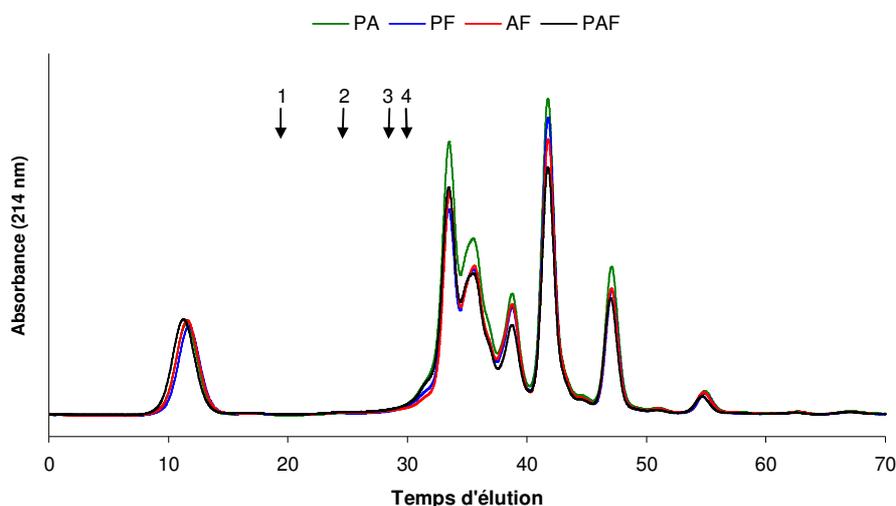


Figure 79 : Distribution des poids moléculaires obtenus après filtration sur gel sur colonne HR 75 de viscères de sardine lors des hydrolyses combinées de 24 h à pH 8 et à 50°C. PA : Protamex (0,1%) + Alcalase (0,1%) ; PF : Protamex (0,1%) + Flavourzyme (1,5%) ; AF : Alcalase (0,1%) + Flavourzyme (1,5%) ; PAF : Protamex (0,1%) + Alcalase (0,1%) + Flavourzyme (1,5%). 1: Albumine (67000 Da); 2: Ovalbumine (43000 Da); 3: Chymotrypsinogène A (25000 Da); 4: Ribonucléase (13700 Da). *Gel filtration chromatograms showing the distribution of viscera FPH molecular weight obtained after 24 h multi-enzymes hydrolysis*

3.2.2.5. Discussion

En utilisant plusieurs enzymes en même temps, l'hydrolyse est plus importante. Lors des hydrolyses simples, le DH maximum était atteint avec Alcalase et avait une valeur de 3%. Ici, en combinant les enzymes, les DH ont plus que doublé puisque le plus petit DH est de 7% (Alcalase-Flavourzyme), mais ils peuvent également aller au-delà de 10% (avec les trois autres traitements). Il semble donc que l'on ait un effet synergique des enzymes. Comme décrit précédemment, en inactivant les enzymes endogènes, les DH obtenus auraient sans doute été encore plus importants. Cependant, lors de l'utilisation de plusieurs enzymes, le

ratio Enzyme / Substrat (E/S) augmente (il double au minimum). En augmentant le ration E/S lors d'hydrolyses simples, les résultats auraient peut-être été identiques. Les profils obtenus sont de même nature pour chaque traitement, mais il est difficile d'expliquer la reprise de l'hydrolyse au bout de 6 h pour toutes les expériences menées dans cette étape. Par rapport uniquement au DH, la combinaison d'enzymes apparaît plus favorable que l'utilisation des enzymes simples. Par contre, comme évoqué pour les têtes, il ne faut pas perdre de vue que l'utilisation conjointe d'enzymes augmente considérablement le coût du procédé enzymatique, les enzymes étant le consommable le plus coûteux.

Comme évoqué précédemment, la conduite d'une hydrolyse sur les viscères de sardine induit une solubilisation de la matière. Les résultats obtenus en utilisant des mélanges enzymatiques sont identiques à ceux obtenus lors des hydrolyses réalisées avec une seule enzyme, avec une répartition de la matière de 80% dans la fraction soluble, 10% dans la fraction huileuse et également 10% dans la fraction insoluble. **Par contre, l'utilisation de plusieurs enzymes ne permet pas une aussi grande libération des lipides dans la fraction soluble que lors des hydrolyses simples.** Les lipides sont ainsi plus concentrés dans la phase insoluble, rendant plus délicate leur extraction. Cependant, la phase huileuse possède moins de contaminants (essentiellement des protéines liées aux lipides) puisque la concentration en lipides dans cette phase passe de 68 g/100g à 80 g/100g. La distribution des lipides totaux au sein des trois fractions générées par l'hydrolyse semble identique quel que soit le traitement enzymatique effectué. De façon similaire aux hydrolyses simples, les hydrolyses combinées permettent la récupération de 50% des lipides dans la fraction soluble et de 30 à 40% des lipides dans la fraction huileuse. Ainsi, environ 80 à 85% des lipides totaux pourront être récupérés dans les fractions liquides. La différence importante qu'il y a entre les hydrolyses simples et les hydrolyses combinées réside dans les quantités extraits (les hydrolyses simples permettent une extraction plus importante des lipides). De plus, les culots résultant des hydrolyses multiples sont un peu plus riches en lipides que ceux générés par les hydrolyses simples.

A l'exception du traitement réalisé avec Protamex et Alcalase, l'utilisation conjointe des enzymes permet d'augmenter la disponibilité des phospholipides. **Cependant, l'amélioration enregistrée n'est pas beaucoup plus grande que celle obtenue avec les hydrolyses simples (augmentation d'un facteur 3,3 avec les trois enzymes et d'un facteur 2,8 avec Flavourzyme seule).** Ainsi, l'utilisation conjointe des hydrolyses ne semble pas économiquement intéressante comparée aux hydrolyses mono-enzymatiques.

La répartition des poids moléculaires des peptides obtenus après hydrolyse combinée donne des résultats identiques quel que soit le traitement effectué. Comme évoqué pour les hydrolyses simples, les peptides générés sont majoritairement de taille inférieure à 10 kDa rendant possible leur utilisation en alimentation animale et en nutrition humaine.

Cette étape a permis de montrer que les hydrolyses enzymatiques s'avéraient d'une grande utilité pour la solubilisation de la matière, pour la libération des lipides et des phospholipides, ainsi que pour la répartition des acides gras des viscères de sardine. Les résultats obtenus avec les hydrolyses combinées ne semblent pas apporter de plus grand intérêt que les hydrolyses menées avec un seul complexe enzymatique. En effet, malgré des DH plus importants, les quantités de lipides extraits sont moins importantes et les quantités de phospholipides libérés sont du même ordre de grandeur. Dans le cas des hydrolyses simples, Protamex semble l'enzyme la plus performante au regard de nos objectifs fixés car elle donne des résultats satisfaisants au niveau de tous les points étudiés (solubilisation de la matière et libération des lipides, phospholipides et acides gras), alors que Flavourzyme fait défaut dans la libération des phospholipides et Alcalase dans celle des acides gras. C'est donc vers Protamex que nous nous tournerons pour l'optimisation de l'hydrolyse enzymatique des viscères de sardine.

When several enzymes are used in the same time, hydrolysis appears more important. Thus, with single enzymes, maximum DH is reached with Alcalase (3%), with enzyme combination, DH have more than doubled, i.e. the lower DH is 7% (with Alcalase-Flavourzyme), but they are generally above 10%. The use of different enzymes together seems to have a synergic effect. Moreover, the DH would be higher with a previous endogenous enzymes inactivation. However, during multi-enzyme hydrolyse, the Enzyme Substrate (E/S) ratio is multiplied by at least a factor 2. The hydrolysis profiles are similar regardless the treatment, but it is quite difficult to explain the resumption of hydrolysis at 6 h. According to DH, enzyme combination seems to improve the hydrolysis compared to single enzymes. But, as mentioned earlier for heads, we have to remember that the use of several enzymes increases considerably the total cost of such process, enzyme being the most expensive part.

As mentioned previously, with single enzyme, the hydrolysis of sardine viscera induces a high matter solubilization. Results obtained using enzymes combination are similar to those obtained with single enzyme treatment, with 80% of the matter located in the

soluble fraction, 10% in the oily fraction and 10% in the insoluble fraction. **But the use of enzyme combination do not allow a good lipid release in the soluble fractions. Lipids are generally more concentrated in the insoluble fraction, where it is the most difficult to extract them without solvents.** However, the oily phase is less contaminated (with proteins) because the lipid concentration, initially at 68 g/100g of dry matter, reaches 80 g/100g of dry matter. The lipid distribution among the three fractions generated by hydrolysis seems to be the same regardless the treatment. With combined hydrolysis, 50% of lipids are recovered in the soluble fraction and 30-40% are located in the oily fraction. Thus, combined hydrolysis allows the recovery of 80-85% of the lipids in the liquid fractions. The main difference between single and combined enzymes treatments is the quantities extracted, which are higher with single enzyme treatment. Furthermore, resulting sludges from combined hydrolysis are richer than those obtained after single enzyme treatment.

Except for hydrolysis carried out with Protamex-Alcalase, the use of several enzymes enhances the phospholipid extraction. However, the increase registered is not as high as the one obtained with single enzyme (increase of 3.3 times with the three enzymes treatment instead of 2.8 times more with the Flavourzyme treatment). In an economic point of view, it seems to be preferable to work with single enzyme.

The peptides molecular weight repartition after combined hydrolysis gives similar results regardless the treatment performed. As mentioned earlier, peptides generated sized mainly below 10 kDa, so their use in feed or fed fields is possible.

This step has shown that enzymatic hydrolysis is useful for the solubilization of the matter, the liberation of lipids and phospholipids and for the fatty acids repartition of sardine viscera. Results obtained with combined hydrolysis do not confer better results than those obtained with single enzymes. Indeed, despite more important DH, lipid quantities are lower and phospholipids are in the same range. In single enzyme case, Protamex seems to be the enzyme which is the most efficient regarding our objectives (matter solubilization, lipids, phospholipids and fatty acid distribution and liberation), while Flavourzyme is not efficient in the phospholipid liberation and Alcalase is not efficient concerning the fatty acids. Consequently, Protamex will be used during the hydrolysis optimization step on sardine viscera.

3.2.3. Optimisation de l'hydrolyse

Durant cette phase, toutes les hydrolyses ont été conduites avec Protamex, à pH 8 et en ajoutant au milieu réactionnel 1 volume d'eau.

3.2.3.1. Conduite du plan d'expériences

Les réponses obtenues pour chaque hydrolyse du plan d'expériences sont reportées dans le Tableau XLII.

Tableau XLII : Réponses concernant le degré d'hydrolyse, les lipides et les phospholipides (somme des trois fractions et somme des fractions liquides *i.e.* fractions soluble et huileuse) obtenues après avoir réalisé le plan d'expériences visant à optimiser l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex. *DH, lipid and phospholipids contents (sum of all fractions and sum of oily and aqueous fractions i.e. liquid fractions) obtained for during the Central Composite Design concerning sardine viscera hydrolysis.*

Numéro de l'expérience	DH	Lipides (g/g de viscères sèches)		Phospholipides (g/g de viscères sèches)	
		Toutes fractions	Fractions liquides	Toutes fractions	Fractions liquides
1	8%	0,24	0,20	0,011	0,010
2	6%	0,17	0,14	0,014	0,011
3	8%	0,21	0,18	0,012	0,010
4	6%	0,20	0,18	0,011	0,009
5	13%	0,19	0,17	0,010	0,008
6	11%	0,18	0,16	0,011	0,010
7	9%	0,23	0,19	0,015	0,012
8	14%	0,20	0,17	0,014	0,011
9	11%	0,20	0,16	0,014	0,012
10	13%	0,20	0,15	0,010	0,007
11	6%	0,21	0,16	0,014	0,011
12	10%	0,18	0,14	0,011	0,008
13	5%	0,19	0,16	0,011	0,009
14	7%	0,21	0,16	0,009	0,007
15	4%	0,20	0,14	0,010	0,007
16	5%	0,17	0,11	0,010	0,007
17	13%	0,23	0,19	0,010	0,008
18	6%	0,19	0,14	0,011	0,008

Concernant le DH, les valeurs s'échelonnent de 4 (expérience n°15) à 14% (expérience n°8). Les DH obtenus pour les 4 expériences centrales (expériences n°2, 4, 13 et 18) sont du même ordre de grandeur et compris entre 5 et 6%. Les conditions permettant l'obtention du plus haut DH sont une durée d'hydrolyse de 6 h à 58°C et avec 0,23% (p/p) d'enzyme par rapport à la matière première (expérience n°8). Les conditions utilisées pour obtenir le plus faible DH sont une durée d'hydrolyse de 30 min, une température de 48°C et une concentration en enzyme de 0,15% (p/p) (expérience n°15). Cependant, l'observation des

réponses obtenues pour l'ensemble des ces 18 expériences ne nous permet pas de pouvoir faire d'hypothèses sur l'influence des trois paramètres testés.

Par ailleurs, la Figure 80 indique que, quelles que soient les conditions d'hydrolyses effectuées, 80 à 90% de la matière se retrouve dans les fractions liquides. Au cours de ces 18 expériences, les profils de répartition de la matière sont tous similaires, à savoir qu'une majorité de la matière est localisée dans la fraction soluble (entre 60 et 70%), et environ 15 à 20% de la matière sont retrouvés dans la fraction huileuse. Les hydrolyses menées avec Protamex permettent ainsi d'obtenir une fraction insoluble qui ne dépasse pas 20% de la matière totale, quel que soit le DH obtenu.

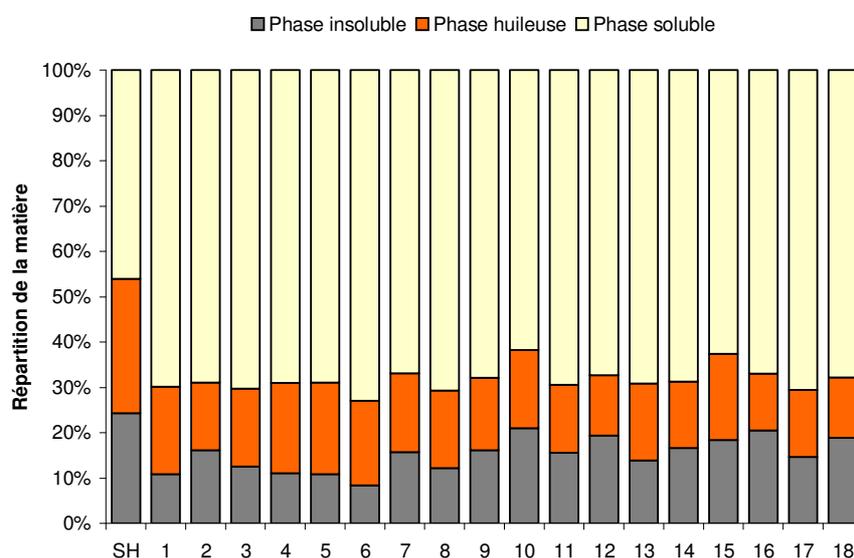


Figure 80 : Répartition de la matière sèche parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex. Dry matter distribution among insoluble, oily and soluble fractions generated during experimental design

Concernant les lipides, les valeurs s'échelonnent de 0,18 à 0,24 g/g de matière sèche pour les lipides totaux, et de 0,12 à 0,20 g/g de matière sèche pour les lipides libérés (Tableau XLII). Pour cette réponse, les points centraux (n°2, 4, 13 et 18) ne sont pas reproductibles et s'échelonnent de 0,18 à 0,20 g de lipides / g de matière sèche. Il est difficile ici d'établir une éventuelle influence des trois paramètres testés tant la répartition des réponses est hétérogène. En effet, la Figure 81 indique la distribution des lipides au sein des trois fractions générées au cours de l'hydrolyse. Les expériences 1, 7 et 17 conduisent aux extractions de lipides les plus importantes. Cependant, ces hydrolyses n'ont pas été réalisées dans des conditions opératoires similaires. L'expérience n°1 correspond à un temps d'hydrolyse très long (27h30) et une

concentration en enzyme et une température moyennes (0,15%, 48°C), la n°7 à une courte durée d'hydrolyse (6 h), une faible quantité d'enzyme (0,07%) et une haute température (58°C), enfin, l'expérience 17 correspond à une durée d'hydrolyse et une concentration en enzyme moyennes (14 h, 0,15%) et à une faible température 30°C). Quoiqu'il en soit, pour l'ensemble de ce plan d'expériences, 70 à 90% des lipides se retrouvent libérés dans les fractions liquides, et la quantité de lipides extraits est toujours supérieure ou égale à celle extraite de façon classique, l'extraction pouvant être augmentée au maximum d'un facteur 1,3.

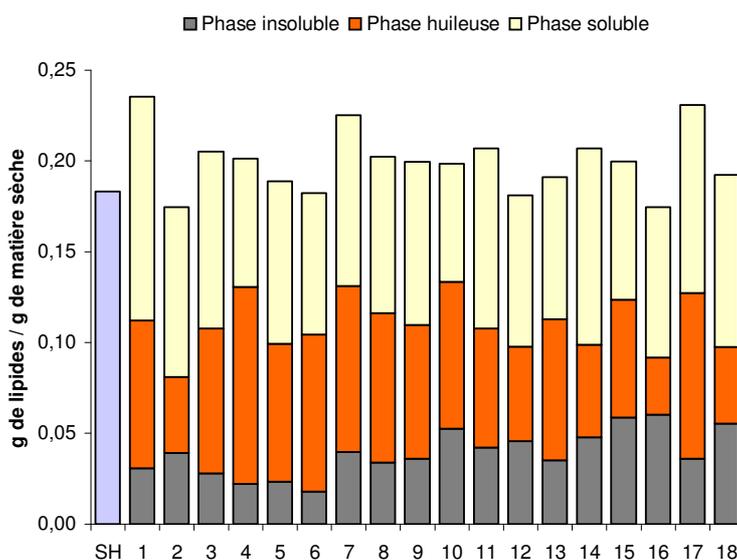


Figure 81 : Distribution des lipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex.
Lipid distribution among insoluble, oily and soluble fractions generated during experimental design

Les mêmes observations peuvent être faites concernant les phospholipides. Les valeurs s'échelonnent de 0,0088 à 0,0148 g de phospholipides / g de matière sèche. Les points centraux ne sont pas non plus répétables et varient de 0,0105 à 0,0143 g/g de matière sèche. Cependant, quelles que soient les conditions opératoires, l'hydrolyse enzymatique conduit toujours à une amélioration de l'extraction des phospholipides, allant d'un facteur 2,8 à plus de 10 (Figure 82). De plus, les phospholipides se retrouvent, pour chaque expérience, majoritairement dans les fractions liquides (de 70 à 90%), principalement dans les fractions solubles (plus de 50% des phospholipides totaux).

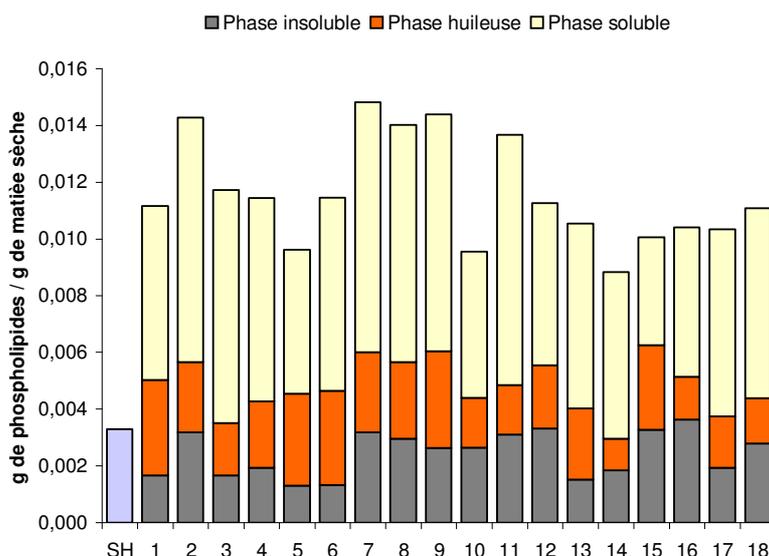


Figure 82 : Distribution des phospholipides parmi les phases insoluble, huileuse et soluble des hydrolyses réalisées pour le plan d'expériences établi pour l'optimisation de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex. *Phospholipid distribution among insoluble, oily and soluble fractions generated during experimental design*

3.2.3.2. Détermination des conditions optimales

Les valeurs obtenues pour chaque hydrolyse concernant le DH, les quantités de lipides et de phospholipides récupérées dans les fractions liquides (Tableau XLII) ont été soumises à un traitement statistique afin de pouvoir prédire les meilleures conditions d'hydrolyse pour obtenir le plus haut DH ou les plus grandes quantités de lipides et phospholipides libérés. Comme évoqué précédemment, seules les réponses du DH ont permis une prédiction. Les réponses concernant les lipides n'amènent qu'à des coefficients de régression de 7% pour les lipides et de 0% pour les phospholipides. Ainsi, la robustesse du modèle n'a permis que l'étude du DH.

Le logiciel Stagraphic 5 +, d'après les données enregistrées lors des 18 expériences, montre que pour obtenir le plus haut DH, la protéolyse des viscères de sardine par Protamex doit être conduite pendant 30 min, à 64°C et avec 0,28% (p/p) d'enzyme. Ces conditions permettraient, d'après la modélisation, d'obtenir un DH de 19,5%, avec une robustesse de 82,5%. L'évolution du DH au cours de l'hydrolyse menée dans ces conditions est reportée sur la Figure 83. Le DH final obtenu au bout des 30 min d'hydrolyse ne correspond pas du tout à celui prédit, puisqu'il n'atteint que 6% au lieu des 19% prévus. La répartition de la matière après avoir conduit cette hydrolyse optimale est de 57,2% dans la fraction soluble, 14,2% dans la fraction huileuse et 28,6% dans la fraction insoluble. Seuls 95% des lipides totaux ont

pu être extraits dans ces conditions, dont seulement 53% sont localisés dans les fractions liquides. Par ailleurs, l'extraction des phospholipides a été améliorée d'un facteur 2,5. Comme remarqué pour les lipides seuls, 50% des phospholipides sont récupérés dans les fractions liquides.

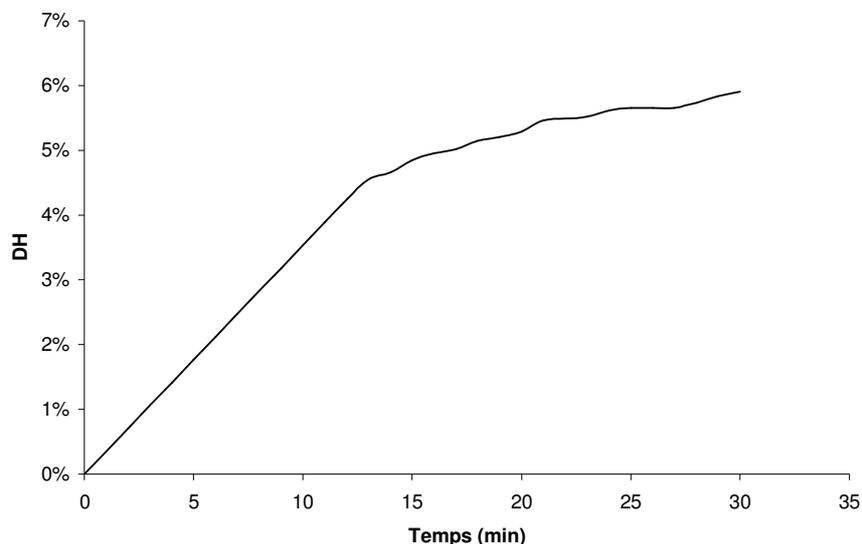


Figure 83 : Evolution du DH lors de l'hydrolyse optimisée des viscères de sardine par Protamex. *DH evolution during sardine viscera optimised hydrolysis by Protamex*

3.2.3.3. Discussion

Cette étape visait à étudier l'influence de la durée de l'hydrolyse, de la température et de la concentration en enzyme pour la conduite de l'hydrolyse des viscères de sardine par Protamex, en essayant d'optimiser ces trois paramètres de façon à obtenir les réponses les plus hautes pour le DH et les quantités de lipides et de phospholipides récupérées dans les fractions liquides.

Comme évoqué précédemment (cf. 3.2.1.6), la solubilisation de la matière n'est pas liée au DH. En effet, au cours de toutes les hydrolyses menées lors de la conduite du plan d'expériences, les DH s'échelonnent de 4 à 14%. Or la répartition de la matière indique que pour ces 18 hydrolyses, une grande majorité de la matière se localise dans la fraction soluble (de 60 à 70%). **Par conséquent, il n'est pas nécessaire que les peptides générés soient de petite taille (donc un haut DH) pour qu'ils soient solubles, une modification de la structure des protéines ou de la taille étant suffisante pour solubiliser les peptides.**

Le DH est la seule réponse ayant pu être modélisée. Cependant, le coefficient de régression ajusté (R^2) n'est pas très élevé (82%) et en dessous de 90%, le logiciel n'indique qu'une tendance. En effet, la conduite de l'hydrolyse aux conditions préconisées par le logiciel ne donne pas du tout les résultats prédits. Le DH ne s'élève qu'à 6% alors qu'il aurait dû être de 20%. Ces faibles résultats peuvent s'expliquer par le fait que le logiciel prédit des conditions se situant aux limites de notre domaine d'étude, diminuant ainsi la robustesse de la prédiction. Par ailleurs, la répartition de la matière sèche obtenue après hydrolyse se situe dans le même ordre de grandeur que celle obtenue par simple centrifugation des viscères. Qui plus est, les résultats obtenus pour les autres facteurs étudiés (lipides et phospholipides) sous ces conditions ne donnent pas de résultats satisfaisants. **En effet, la quantité de lipides extraits est moindre que lors d'une extraction chimique (réalisée selon la méthode de Folch). De plus, les quantités de lipides localisés dans les fractions liquides sont faibles par rapport à toutes les hydrolyses réalisées auparavant sur les viscères de sardine (50%). Du reste, cette hydrolyse a permis une extraction de phospholipides plus importante que dans les conditions classiques, mais environ 50% de ces phospholipides se retrouvent piégés dans la fraction insoluble.** De cette manière, il sera difficile de les obtenir sans avoir recours à des procédés chimiques. Ainsi, mis à part pour les phospholipides totaux où l'extraction globale a tout de même été améliorée, la conduite de l'hydrolyse optimale prédite par le logiciel donne des résultats similaires à ceux obtenus sans hydrolyse.

La conduite de ce plan d'expériences ne permet pas de trouver les meilleures conditions pour la libération des lipides et des phospholipides dans les fractions liquides, ni pour obtenir une hydrolyse maximale. Ces résultats viennent sans doute du choix du domaine d'étude pour mener ce plan d'expériences. En effet, alors que le domaine d'étude choisi semblait convenir à l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex, il n'en est pas de même pour les viscères. Les réponses obtenues concernant les lipides et les phospholipides ont peu varié durant toutes les hydrolyses menées. Ainsi, les réponses obtenues ont toujours été du même ordre de grandeur, quelles que soient les conditions appliquées. En effet, l'amplitude de toutes les réponses enregistrées concernant les lipides totaux est de 0,06 g/g. Les variations enregistrées pour les points centraux présentaient quant à eux une amplitude de 0,03 g/g. Aussi, avec une variation des points centraux correspondant à 50% de la variation totale, il est difficile pour le logiciel de prédire une réponse. Le même constat est observé pour les phospholipides. Le domaine d'étude choisi semble donc donner les valeurs maximales d'extraction des lipides et des

phospholipides. En effet, ce domaine avait été choisi de façon à être très large (de 30 min à plus de 1 jour d'hydrolyse, de 30 à 65°C et des concentrations en enzyme de 0,02 à 0,28% (p/p)). Il serait maintenant intéressant de limiter le domaine d'étude et de se placer dans des valeurs plus basses, notamment au niveau du temps d'hydrolyse de façon à améliorer la prédiction des réponses. Il a été en effet prouvé par de nombreuses études que les paramètres étudiés ici possèdent une influence sur l'hydrolyse enzymatique, au moins sur le DH si ce n'est sur les lipides et phospholipides. Qui plus est, en vue d'une application industrielle, les avantages de l'hydrolyse enzymatique sur les viscères de sardine ayant été démontrés plus haut (amélioration de l'extraction globale des lipides et phospholipides, extraction d'une grande partie de ces lipides sans solvant, intérêt potentiel de la fraction protéique), il serait intéressant de connaître les conditions les plus économiquement intéressantes, c'est-à-dire celles qui donnent les meilleurs résultats en limitant les dépenses énergétiques (temps d'hydrolyse, température) et fonctionnelles (enzyme). La conduite d'un nouveau plan d'expérience pourrait ainsi faire l'objet d'une étude ultérieure.

This step was focused on the study of hydrolysis time, temperature and enzyme concentration needed for sardine viscera hydrolysis with Protamex. The aim of this study was to know the better conditions in order to obtain the highest DH, and lipid and phospholipid contents in liquid fractions.

As previously mentioned (see 3.2.1.6), the matter solubilization is not linked to the DH. Indeed, all hydrolyses performed during optimization lead to DH from 4 to 14%. However, the matter repartition indicates that, for this 18 experiments, a huge part of the matter has been localized in the soluble fraction (from 60 to 70%). Consequently, it is not necessary that generated peptides possess low molecular weight (which means high DH) to be soluble. Those results show that a modification of the protein structure or slight size reduction is enough for peptide solubilization.

DH is the only response which can be predicted by the software. However, regression factor (R^2) obtained is not high and it just permits to indicate a tendency. Indeed, when hydrolyses have been realized, results obtained are totally different from the predicted one: DH should be around of 20% while we obtained 6% DH. This low result could be explained by the fact that the conditions required are in the limit of the studied area, so the robustness of the prediction is not as high as it should be. On the other hand, dry matter repartition obtained is in the same range as the one obtained with only a viscera centrifugation.

Moreover, despite the fact that those conditions have been estimated only for DH response, other results obtained (lipids, phospholipids) are not sufficient. **Indeed, less lipid quantity than after Folch procedure was extracted and lipids localized in liquid fractions were lower than other hydrolyses conducted before on sardine viscera (around 50%). Finally, this hydrolysis leads to a higher phospholipids extraction but such lipids are still localized in insoluble fraction, inducing difficulties to recovery them.** Hence, optimum hydrolysis doesn't enhance the hydrolysate quality.

Thus, this optimization do not lead to find optimum conditions neither for lipid and phospholipid release in liquid fractions, nor for a high DH obtention. Such results are probably coming from the choice of the study area of the experimental design, while this area was suitable for heads hydrolysis optimization. Obtained results concerning lipids and phospholipids did not possess a high values range during all the experiments, whatever the hydrolysis conditions. Effectively, the lipid variation occurred during this 18 experiments was of 0.06 g/g and central experiments variation was of 0.03 g/g; hence, it is difficult to obtain a strong prediction with a central experiments variation corresponding to 50% of the total variation range. The same conclusion could be done for phospholipids. It seems that our study area leads to maximum lipid and phospholipid release. This area was chosen to be wide (from 30 min to more than one day hydrolysis, from 30 to 65°C, from 0.02 to 0.28% of enzyme). It should be preferable to reduce this area in the lower values of the parameters conditions in order to improve the model. It has been demonstrated by numerous studies that chosen parameters have a high influence on hydrolysis. Indeed, as we have demonstrated in the earlier parts, sardine viscera hydrolysis is useful for the enhancement of lipid and phospholipid recovery (without solvent use) and for the quality of the proteinic fraction obtained. So, from an industrial point of view, it is important to improve the hydrolysis conditions, in order to optimise the process. A further study concerning a new experimental design must be considered.

4. TRAITEMENT DES FRACTIONS LIQUIDES PAR ULTRAFILTRATION

Les objectifs de ce quatrième chapitre sont d'étudier les techniques à membrane dans le but d'améliorer la valorisation des co-produits issus de la chaîne de fabrication de surimi.

L'hydrolysate issu de l'optimisation des conditions opératoires de l'hydrolyse des têtes de sardine par le complexe enzymatique Protamex est ainsi soumis à une phase d'ultrafiltration sur membrane organique plane en PES. L'objectif de cette UF est de concentrer les lipides dans le rétentat, tout en essayant de transmettre les peptides au perméat. Avec cet objectif, la première étape fut le choix du seuil de coupure des membranes utilisées. Ensuite, une étude de la régénéralité de la cassette de filtration a été menée, puis des conditions opératoires optimales ont été recherchées. Enfin, l'étude de la cascade de procédé (diafiltration → concentration ou concentration → diafiltration) a été réalisée de façon à proposer un procédé permettant l'obtention de composés de qualité en prenant en compte la durée du traitement et les volumes d'effluents générés.

La seconde partie de ce travail sur l'ultrafiltration a porté sur le traitement de la première eau de lavage de la pulpe de poisson (L1) obtenue lors du procédé de fabrication du surimi. Cette étude s'est focalisée sur la valorisation de la fraction protéique de ces eaux. L'objectif de ce travail est de sélectionner une membrane permettant la concentration de protéines. Le principal facteur limitant de ce type de procédé étant le colmatage provoqué par l'affinité des protéines pour le matériau, la première étape de ce travail a consisté en la réalisation de tests d'adsorption en conditions statiques. Ensuite, le comportement des membranes en cycles d'UF de plusieurs heures a été étudié, puis les profils biochimiques des fractions obtenues ont été réalisés. Ces deux étapes ont permis la sélection d'un matériau qui sera utilisé également pour l'UF de l'hydrolysate du culot C1 (Figure 32).

The objectives of this fourth chapter are the evaluation of membrane technology in order to up-grade the by-products generated during surimi manufacturing.

The hydrolysate obtained after the hydrolysis of sardine heads with the enzymatic complex Protamex in optimized conditions is ultrafiltered through a flat sheet membrane composed of polyether sulfone (PES). The aim of this ultrafiltration step is to concentrate the lipids in the retentate, peptides being transmitted to the permeate. For this purpose, the first step is the choice of the molecular weight cut off (MWCO) of the membrane. Then, a study of the regenerability of the filtration cartridge has been realized and the operating conditions

determined. Finally, the process sequence (diafiltration followed by concentration, or concentration followed by diafiltration) has been conducted in order in order to obtain products of quality, taking into account the duration of the process and the volumes of effluents rejected.

The second part of this ultrafiltration work is devoted to the treatment of the first waste water (L1) generated during surimi manufacturing. This study was focused on the up-grading of the proteinic fraction. The most important limiting factor is the fouling of the membrane by the affinity between proteins and the membrane material. So, the first step of the study has consisted to realize static adsorption tests. The membrane behaviour has then been studied during several hours cycles and lipids and peptides have been characterized. This two-steps-procedure has allowed to select a material which can be used also for the UF of the sludge (C1) obtained after the centrifugation of L1 (Figure 32).

4.1. Séparation des fractions lipidique et peptidique de la fraction soluble issue de l'hydrolyse des co-produits de sardine

4.1.1. Essais préliminaires

4.1.1.1. Choix du seuil de coupure

Lors de cette étape, des hydrolysats de têtes et de viscères de sardine ont été pris indifféremment en fonction de leur disponibilité, l'objectif de ce travail étant de dégager des ordres de grandeur de performances d'UF. Les flux obtenus pour les différents essais sous une pression de 2 bars et dans l'objectif d'atteindre un facteur de réduction volumique (FRV) de 2 sont reportés dans le Tableau XLIII. Les flux pour les essais à 3 et 300 kDa n'ont pas pu être déterminés à cause de fuites dues au système. Cependant, étant donné le caractère exploratoire de cette étape, ces essais seront conservés pour les tests de rétention des lipides et protéines. Quoi qu'il en soit, une tendance peut être dégagée concernant le flux de perméation. Plus le seuil de coupure est élevé, plus le flux J est important. En effet, il est situé en dessous de 5 L/h.m² jusqu'à 5 kDa, puis passe par 9,77 L/h.m² à 30 kDa, 19,69 L/h.m² à 50 kDa, pour atteindre 23,74 L/h.m² à 100 kDa.

Tableau XLIII : Flux de perméation obtenus lors de la filtration des hydrolysats de têtes et de viscères sur le mini-pilote Omega à 20°C. *Permeation fluxes during hydrolysate filtration at 20°C on Omega mini-pilot*

Co-produit hydrolysé	Seuil de coupure (kDa)	Pression (bar)	J (L/h/m ²)	FRV
Viscères	1	2	4,56	2,33
Viscères	3	2	n.d.	2,00
Têtes	5	2	2,83	1,92
Viscères	30	2	9,77	2,08
Têtes	50	2	19,69	1,82
Viscères	100	2	23,74	2,17
Têtes	300	2	n.d.	2,04

n.d. non déterminé

Les taux de rétention (*i.e.* les proportions retrouvées dans le rétentat) et les taux de transmission (*i.e.* proportions retrouvées dans le perméat) des peptides sont représentés par la Figure 84. Quel que soit le co-produit, le taux de transmission augmente avec le seuil de coupure. La transmission des protéines sera plus importante avec un grand seuil de coupure. En effet, concernant les viscères, alors que la rétention est totale pour un seuil de coupure de 1 kDa, une légère transmission est observée à partir de 3 kDa (3%) puis à 30 et 300 kDa (6 et 4% respectivement). Les peptides des têtes sont quant à eux plus facilement transmis. Huit pourcent sont transmis dès 5 kDa, puis 25% et 34% des peptides passent dans le perméat à 50 et 100 kDa.

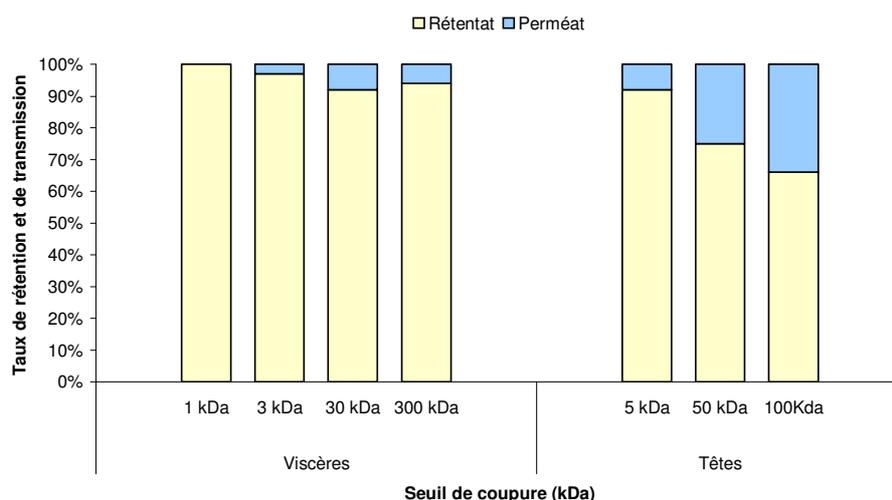


Figure 84 : Répartition des peptides dans le rétentat et le perméat en fonction du seuil de coupure après ultrafiltration des hydrolysats de viscères de sardine lors sur pilote Oméga. *Peptide repartition in retentate and permeate of filtered sardine heads and viscera hydrolysates according to molecular weight cut off of ultrafiltration membrane*

La rétention des lipides est représentée par la Figure 85. Seuls les résultats issus de la filtration des hydrolysats de viscères y sont représentés, les quantités de matière obtenues pour les têtes étant trop faibles pour pouvoir faire les analyses à 5 et 50 kDa. Les résultats obtenus pour les têtes à 100 kDa montrent un taux de rétention des lipides de 100%. Pour les hydrolysats de viscères, les taux de rétention sont très hauts, quel que soit le seuil de coupure. Aucune transmission n'est observée à 3 kDa. Une légère transmission est obtenue pour les autres seuils de coupure : 4% pour 1 et 30 kDa et 1% à 300 kDa.

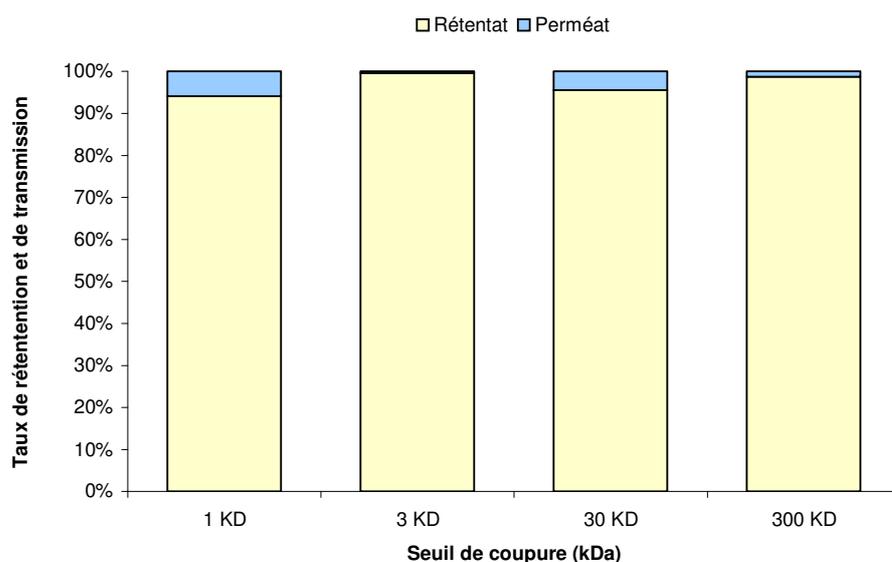


Figure 85 : Répartition des lipides dans le rétentat et le perméat en fonction du seuil de coupure après ultrafiltration des hydrolysats de viscères de sardine lors sur pilote Oméga. *Lipid repartition in retentate and permeate of filtered sardine viscera hydrolysate according to molecular weight cut off of ultrafiltration membrane*

4.1.1.2. Diafiltration

Afin de s'assurer que la transmission des peptides soit totale, un test de diafiltration sur la membrane à 300 kDa a été effectué. Quatre volumes d'eau vont être ajoutés régulièrement lors de la filtration de l'hydrolysat. L'évolution de la charge protéique au cours de cette diafiltration est représentée par la Figure 86. La charge protéique décroît rapidement lors des trois premiers diavolumes (DV) mais la charge protéique ne devient quasi nulle qu'après le passage du 5^{ème} DV. La charge protéique restante dans le rétentat est alors très faible (5,55 mg/L).

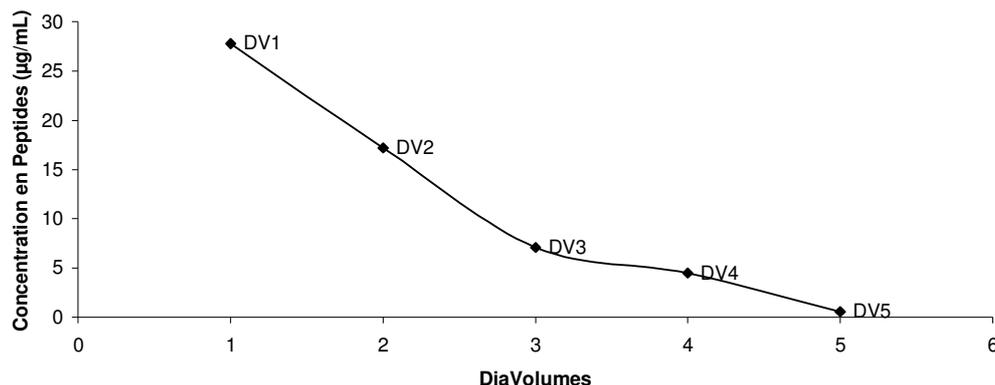


Figure 86 : Evolution de la concentration en protéines dans le perméat lors de la diafiltration de l'hydrolysate de co-produits de sardines sur membrane Omega PES 300 kDa. *Protein concentration evolution in the permeate during sardine by-product hydrolysate diafiltration on 300 kDa PES membrane*

4.1.1.3. Discussion

Lors des essais préliminaires, les membranes PES ont montré une rétention quasi-totale des lipides et une transmission des peptides plus importante lors de la filtration des hydrolysats de têtes de sardine. Plus le seuil de coupure est important, plus la transmission sera importante. **La diafiltration a montré son intérêt en ce qui concerne la transmission des peptides.** Cette transmission aisée peut être expliquée par le fait que les peptides générés par les hydrolyses enzymatiques sont de petite taille. En effet, l'étude de la répartition des poids moléculaires des peptides réalisée dans le chapitre précédent (cf. 3.1.2.4 et 3.2.2.4) indique que pour tous les essais réalisés, les peptides ont un poids moléculaire inférieur à 10 kDa.

A ce stade, le choix du seuil de coupure et du mode de filtration peut être envisagé. **Pour la filtration des hydrolysats de têtes, un haut seuil de coupure (300 kDa) permet la rétention quasi-totale des lipides et une bonne transmission des peptides, transmission qui peut être augmentée en réalisant une diafiltration.**

D'autres études pourraient être menées, comme l'augmentation du facteur de réduction volumique (fixé ici arbitrairement à $FRV = 2$), ainsi que la comparaison de différents matériaux.

Cependant, l'objectif fixé ici est en partie atteint puisque les fractions lipidiques et peptidiques ont été séparées. Ces résultats sont maintenant à confirmer à plus grande échelle.

Il est également important d'avoir conscience que lors de ces essais, le colmatage et la nettoyabilité de la membrane n'ont pas été spécifiquement étudiés.

During the preliminary trials, the PES membranes have shown that retention of lipids was quasi-complete and that transmission of peptides was important especially with the heads hydrolysate. The higher the MWCO is, the easier the transmission is. The diafiltration step is interesting for the peptide transmission. This easy transmission could be explained by the fact that peptides generated during hydrolysis possess low molecular weights. Indeed, the study of the repartition of the peptides molecular weights done in the former chapter (see 3.1.2.4 and 3.2.2.4 parts) indicates that all the peptides have a molecular weight below 10 kDa.

At this step, the choice of the MWCO could be considered. In order to obtain the most important peptide transmission in the filtration of sardine heads hydrolysis, the highest MWCO (300 kDa) could be used. The transmission could be increased by the use of diafiltration. This step has shown that 4 diafiltration volumes allow the transmission of most the peptides. In addition, this material at this MWCO allows an efficient lipid retention.

Other studies could be considered, such as the influence of the volume reduction factor (FRV), fixed here at 2, or also the utilization of different membrane materials.

However, the objective is partly reached because the lipidic and peptidic fractions have been separated. These results have to be confirmed in a larger scale. It is also important to be aware that during those tests, fouling and cleaning processes haven't been specifically studied.

4.1.2. Filtration de l'hydrolysat de têtes de sardine

Durant cette étape, l'hydrolysat obtenu après amélioration des conditions d'hydrolyse est soumis à l'UF en vue de fractionner les compartiments lipidiques et peptidiques. Le nettoyage du système de filtration a été étudié durant toute cette campagne expérimentale, où les conditions de filtration ont été mises au point.

4.1.2.1. Nettoyage de la membrane

Les résultats de la campagne expérimentale de 2 mois concernant la nettoyabilité de la membrane sont reportés sur la Figure 87. La régénération maximale (100%) correspond au flux de perméat à l'eau pure de la membrane neuve.

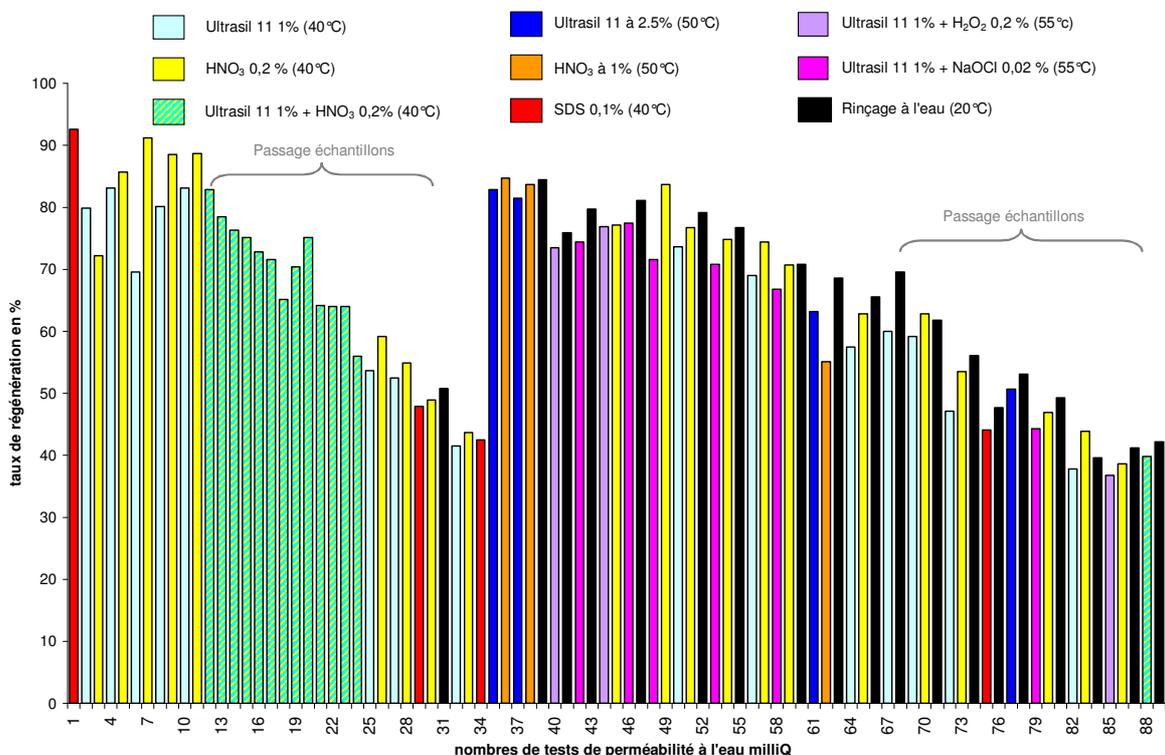


Figure 87 : Taux de régénération de la membrane PES 300 kDa en fonction de la procédure de nettoyage et du passage de la solution colmatante (hydrolysate de têtes de sardine). *Regeneration rates of 300 kDa PES membrane according to the cleaning procedure*

Les cycles de nettoyage sont généralement composés d'un nettoyage alcalin puis d'un nettoyage acide. C'est pourquoi, au début de la campagne, le taux de régénération n'a été calculé qu'à la fin d'un cycle (histogrammes hachurés). Compte tenu des problèmes de nettoyage rencontrés, les taux de régénération ont ensuite été calculés à la fin de chaque procédure de nettoyage (sauf pour les derniers essais). Avant de s'intéresser aux variations obtenues lors de cette campagne, il est important de remarquer la nécessité de cumuler un nettoyage basique et un nettoyage acide. En effet, le taux de régénération remonte toujours (sauf pour l'essai 3) à la fin du cycle.

Durant les essais 1 à 34, correspondant au passage des échantillons sur la membrane, le taux de régénération diminue de façon régulière pour atteindre 43%. Les nettoyages ont été effectués à l'aide des procédures classiques préconisées par le fabricant (Ultrasil™, acide

nitrique) pour ce type de membrane et en fonction de la connaissance de la composition de nos échantillons. Les procédures classiques ne semblent donc pas être efficaces pour restaurer les caractéristiques initiales de la membrane. Le colmatage rencontré ici s'accroît de façon continue et irréversible avec ces procédures de nettoyage. Un nettoyage plus drastique est alors envisagé en augmentant la concentration en réactif, la température et le temps de contact. En effet, lors des essais classiques, chaque phase de nettoyage dure 30 min. Avec les conditions les plus drastiques, les réactifs de nettoyage (Ultrasil 11TM 2,5% et HNO₃ 1%) sont en contact avec la membrane pendant 2 h (essais 35 à 39). Ces conditions semblent avoir un effet sur le nettoyage de la membrane puisque le taux de régénération remonte alors à près de 85%. D'autres procédures sont alors testées afin de stabiliser le taux de régénération (essais 40 à 60), comme l'ajout d'agents oxydants (eau oxygénée et eau de javel). Ces essais sont alors réalisés sans le passage d'échantillons dans le système. Mais le taux de régénération ne semble pas s'améliorer et demeure autour de 75%. Ces conditions étant tout de même acceptables, les échantillons d'hydrolysats de têtes de sardine sont de nouveau filtrés. La régénération de la membrane diminue alors de nouveau au cours du temps. Cependant, la baisse enregistrée à ce stade est de moins grande amplitude que celle enregistrée au début de l'étude. En effet, alors qu'un taux de régénération de 40% était obtenu après 34 passages au début de l'étude, ce même taux est atteint au bout de 55 passages.

La Figure 88 indique les débits de recirculation du rétentat dans le système après les étapes de nettoyage. Les variations de flux de rétentat obtenus sont ainsi révélatrices de l'état d'encrassement des séparateurs côté rétentat. Le flux de recirculation est calculé en maintenant la vanne de perméat fermée et la vanne de détente côté rétentat ouverte. Ce flux rend ainsi compte de la vitesse de circulation du rétentat à l'intérieur du système. Le plus souvent, le calcul de ce flux est réalisé après un cycle complet de nettoyage, expliquant pourquoi le nombre de tests effectués est moins important que celui des taux de régénération. Cependant, le profil obtenu est à la même échelle que celui de la Figure 87, permettant une bonne superposition des deux figures. Deux profils ont été retenus, le profil supérieur correspond au flux de rétentat obtenu lorsque la puissance de la pompe est maximale, le profil inférieur correspond lui à une puissance de pompe minimale.

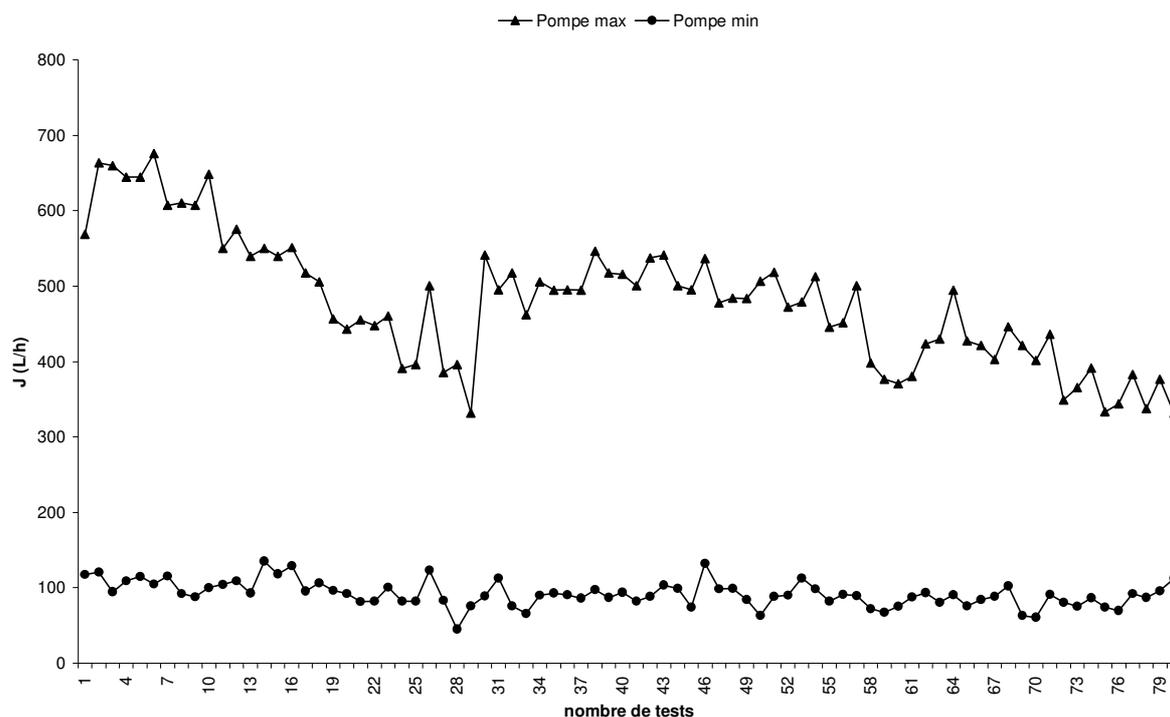


Figure 88 : Colmatage des séparateurs de rétentat exprimé par la baisse du débit de recirculation du rétentat obtenu après chaque nettoyage (perméat fermé). Retentate recirculation pathway fouling expressed by the Recirculation retentate flux obtained after each cleaning step

Quand le débit tangentiel est faible (pompe réglé au minimum, faibles pertes de charges), il n'y a pas, ou très peu, de variation du flux de rétentat pendant la totalité des essais. En revanche, la courbe correspondant à une plus grande puissance de pompe est intéressante car le débit de rétentat suit à peu près la même évolution que celle du taux de régénération en fonction des processus de nettoyage. Cet effet est essentiellement marqué lors du premier nettoyage drastique (ici test n°29). Les deux phases de diminution correspondant au passage de l'échantillon, ainsi que la phase de stabilisation (essais des différents protocoles de nettoyage) sont aussi visibles sur ce profil.

4.1.2.2. Filtration de l'hydrolysat de têtes de sardines

4.1.2.2.1. Détermination des conditions de filtration

La Figure 89 illustre l'évolution des flux de perméat au cours du temps obtenus lors de la filtration à concentration constante de l'hydrolysat de têtes de sardine en fonction de la pression transmembranaire appliquée au système. Le débit de recirculation appliqué ici est de 7,2 L/h. La PTM appliquée varie de 0,80 à 2 bars. Pour toutes les PTM testées, le flux, important au départ, baisse de façon significative dans les 10 premières min. Puis le flux de

perméat se stabilise au bout de 30 min. La stabilisation du flux de perméat est importante pour la détermination des conditions de filtration à appliquer.

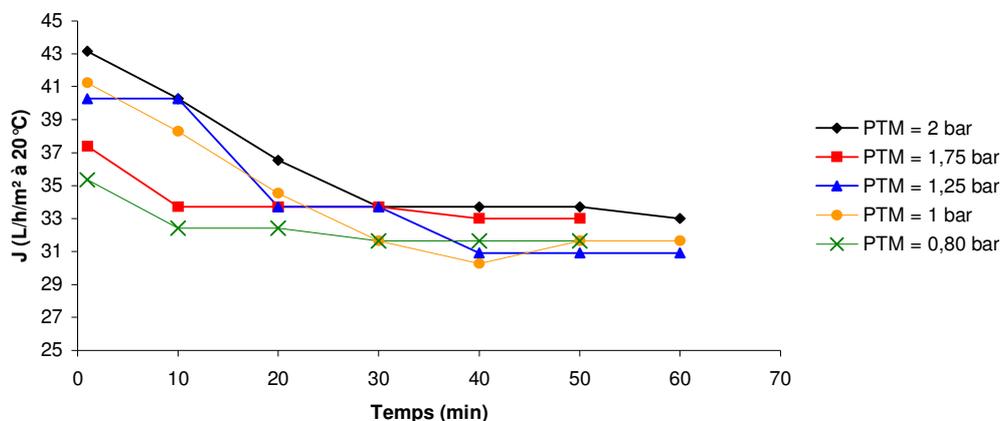


Figure 89 : Evolution du flux de perméat de l'hydrolysat de têtes de sardine en fonction du temps et de la PTM pour un débit de rétentat de 7,2 L/h. *Permeation flux evolution of sardine heads hydrolysate according to the time and transmembrane pressure (PTM)*

D'une façon générale, en régime stabilisé, plus la PTM est grande, plus J est important. La Figure 90 représente le flux de perméat obtenu en fonction de la PTM en régime stabilisé. Malgré un flux plus important lorsque la PTM est grande, il est plus intéressant de travailler avec une pression moindre. En effet, le maintien d'une PTM élevée durant un tel procédé engendre une consommation énergétique importante. Dans notre cas, une pression transmembranaire de 1 bar (qui se situe en début de polarisation secondaire) est suffisante pour travailler dans de bonnes conditions, pour un débit de perméat de 7,2 L/h.

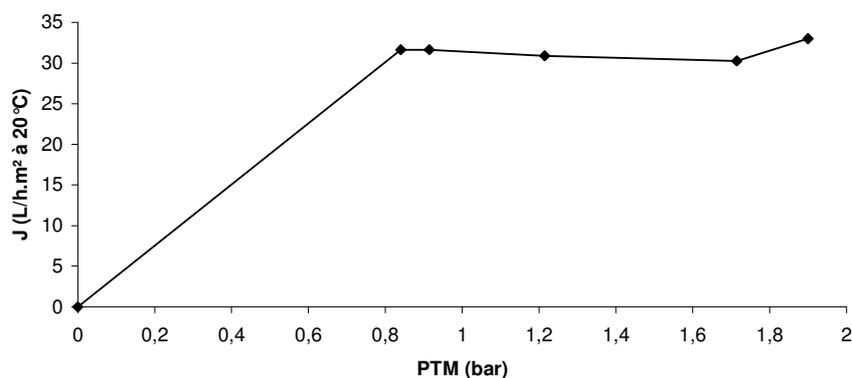


Figure 90 : Flux de perméat de l'hydrolysat de têtes de sardine sur membrane PES 300 kDa en fonction de la PTM avec un débit de rétentat de 7,2 L/h obtenue en régime stabilisé (au bout de 50 min). *Permeation flux of sardine heads hydrolysate versus PTM*

4.1.2.2.2. Choix de la cascade de procédé

La pression transmembranaire pour la filtration de l'hydrolysate des têtes de sardine à été déterminée lors de l'étape précédente. Il s'agit maintenant de choisir une cascade de procédés pour avoir une bonne séparation des lipides et des peptides. En effet, nous avons vu lors de l'étape préliminaire qu'une diafiltration améliorerait la transmission des peptides dans le perméat. Mais faut-il réaliser la diafiltration avant ou après la concentration ? Nous avons ainsi mis en place une étude expérimentale pour trouver la meilleure cascade, en termes de quantité d'eau nécessaire, temps opératoire, et qualité du produit obtenu.

Cette étape est réalisée avec un volume initial de 100 mL d'hydrolysate de têtes de sardine pour chaque essai. Conformément aux résultats obtenus lors des essais préliminaires, 4 diavolumes sont ajoutés (*i.e.* 400 mL pour la cascade diafiltration puis concentration et seulement 100 mL pour la seconde cascade, la concentration étant réalisée avant) car suffisants pour transmettre la plus grande part possible de peptides. Dans les deux cas, la concentration est ainsi réalisée avec un FRV de 4.

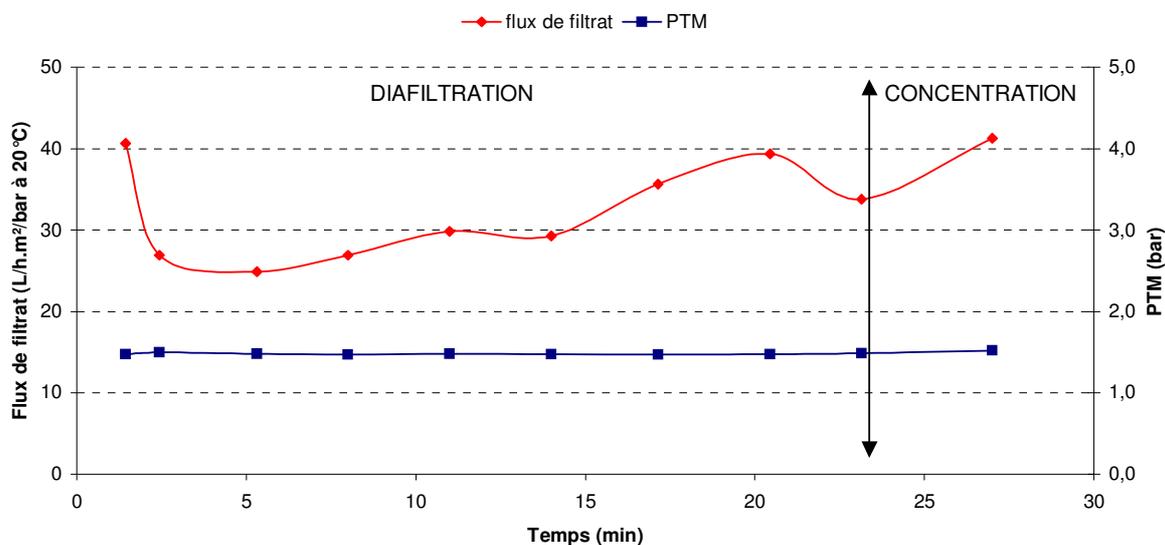


Figure 91 : Evolution du flux de perméat et de la PTM lors de la cascade diafiltration → concentration de l'hydrolysate de têtes de sardine. Permeation flux and PTM evolution during the diafiltration → concentration process of sardine heads hydrolysate

Les évolutions des flux obtenus lors des deux procédés sont reportés sur la Figure 91 (diafiltration puis concentration) et sur la Figure 92 (concentration puis diafiltration). Pour la première cascade de procédés proposée, le flux subit une chute de 41 à 27 L/h.m²/bar dans les 2 premières minutes. Cette chute est due à la formation de la couche de polarisation de

concentration. Ensuite, le flux a tendance à augmenter lors de la diafiltration. La charge contenue dans le rétentat diminue puisqu'une partie des peptides passent au travers de la membrane et que le volume à filtrer reste constant. Cette diminution de charge est probablement à l'origine de l'augmentation du flux de perméat au cours de la diafiltration. Seul le point obtenu au bout de 23 min paraît aberrant. Cette diminution du flux est sans doute due aux manipulations intervenues lors du changement de mode de fonctionnement. En effet, au bout de 23 min, les 4 diavolumes sont passés et l'étape concentration commence. Cependant, la baisse enregistrée est minimale (39 à 34 L/h.m²/bar). La concentration à FRV = 4 a été très rapide (moins de 4 min) car la charge dans le rétentat est beaucoup moins importante que dans la solution initiale. Cette opération est conduite en 27 min (23 min pour la diafiltration et 4 min pour la concentration). Au cours de ce procédé, la PTM est restée constante (1,5 bars) et la perte de charge également, permettant le maintien d'un débit de rétentat de 7,2 L/h.

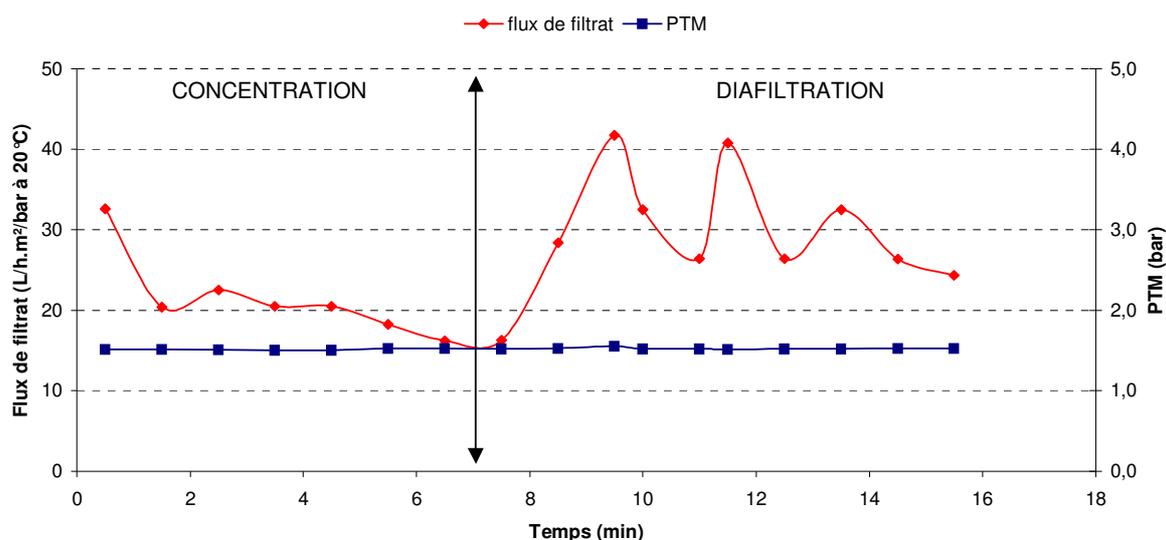


Figure 92 : Evolution du flux de perméat et de la PTM lors de la cascade concentration → diafiltration de l'hydrolysate de têtes de sardine. *Permeation flux and PTM evolution during the concentration → diafiltration process of sardine heads hydrolysate*

Lors du second procédé, le flux diminue rapidement (de 33 à 20 L/h.m²/bar) lors des deux premières minutes. Une fois la couche de gel formée, le flux diminue encore mais de façon plus lente. Cette diminution du flux est expliquée par le fait que nous sommes cette fois-ci en concentration et la charge du rétentat augmente avec le temps. La concentration dure 7 min environ. Dès que le procédé passe en diafiltration, la dilution de la charge du rétentat provoque l'augmentation du flux de perméat, le flux passe ainsi de 16 à 28 L/h.m²/bar

en 1 min puis la minute suivante, le flux atteint 42 L/h.m²/bar. Les fluctuations suivantes sont dues aux variations de volume dans le rétentat, malgré la quasi-continuité du procédé. Une fois de plus, durant tout le procédé, la PTM et le débit de rétentat sont restés constants (1,5 bar de PTM et un débit de rétentat de 7,2 L/h). La durée totale de ce second procédé est de 16 min.

La Figure 93 illustre l'évolution de la charge en peptides dans le perméat au cours des deux procédés. L'hydrolysate de têtes de sardine possède une charge protéique de $3,33 \pm 0,04$ g/L. Lors de la cascade diafiltration puis concentration, la charge du perméat contenue dans le premier diavolume est de $0,26 \pm 0,01$ g/L, puis cette charge diminue au fil des diavolumes pour atteindre, dans le perméat issu de la concentration, une charge en peptide de $0,01 \pm 0,00$ g/L. Lors de la cascade concentration puis diafiltration, la charge en peptides du perméat obtenue après concentration est de $0,45 \pm 0,04$ g/L. Une charge similaire est obtenue lors du passage du premier diavolume ($0,42 \pm 0,01$ g/L). Cette charge diminue ensuite au fil des diavolumes pour atteindre une charge finale de $0,01 \pm 0,00$ g/L. La charge protéique restante dans le rétentat est similaire quelle que soit la cascade choisie ($1,12 \pm 0,15$ g/L pour la première et $1,21 \pm 0,04$ g/L pour la seconde). La charge protéique a donc baissé de 65% dans le rétentat, en utilisant l'un ou l'autre des procédés. Ainsi, le taux de transmission des peptides dans le perméat s'élève à 91% pour la première cascade et 87% pour la seconde.

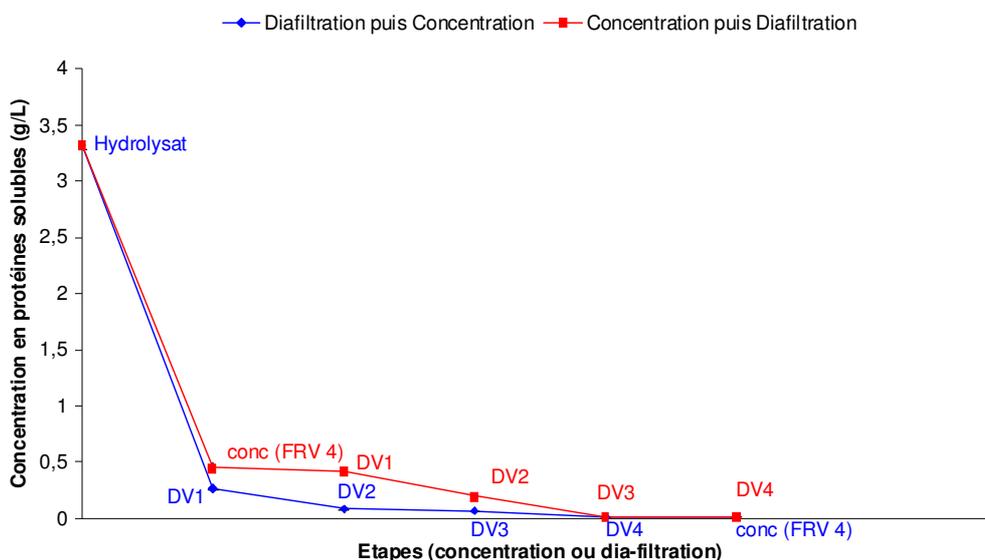


Figure 93 : Evolution de la charge en peptides dans les perméats obtenus au cours des différentes cascades de filtration lors de l'ultrafiltration de l'hydrolysate de têtes de sardine. *Permeate peptide concentration evolution during the 2 filtration processes of sardine heads hydrolysate*

Les résultats obtenus pour les lipides sont consignés dans le Tableau XLIV. La charge en lipides, initialement de $1,51 \pm 0,10$ g/L passe à environ 3,6 g/L quel que soit le traitement, soit un facteur de concentration de 2,4. Ce résultat est surprenant car le FRV est de 4 et la rétention des lipides quasi-totale.

Tableau XLIV : Charge en lipides dans les différentes fractions (rétentat et filtrat) obtenues après ultrafiltration de l'hydrolysate de têtes de sardine. *Lipid content in the fractions (permeate and retentate) obtained after the 2 ultrafiltration processes of sardine heads hydrolysate*

		Lipides (g/L)
Hydrolysate		$1,51 \pm 0,10$
Diafiltration → Concentration	Rétentat	$3,57 \pm 0,30$
	Filtrat	$0,06 \pm 0,00$
Concentration → Diafiltration	Rétentat	$3,61 \pm 0,13$
	Filtrat	$0,06 \pm 0,01$

Il est alors important d'écrire le bilan matière exprimé en lipides afin de comprendre pourquoi 4 fois plus de lipides sont retrouvés dans le rétentat. En effet, deux hypothèses peuvent être formulées : soit une partie des lipides est transmise au filtrat, soit une partie des lipides est adsorbée par la membrane ou retenue dans le système de filtration. Le bilan matière sur les lipides est exprimé par la relation suivante :

$$V_i.C_i = V_{ret}.C_{ret} + V_{fil}.C_{fil} + Pertes \quad \text{Équation} \quad 17$$

Avec :

V_i : volume initial (L)

C_i : concentration initiale en lipides (g/L)

V_{ret} : volume du rétentat (L)

C_{ret} : concentration en lipides dans le rétentat (g/L)

V_{fil} : volume du perméat (L)

C_{fil} : concentration en lipides dans le perméat (g/L)

Cette relation nous a permis de calculer les quantités de lipides présentes dans le rétentat et le perméat lors de chaque essai et les pertes ont également pu être estimées (Figure 94).

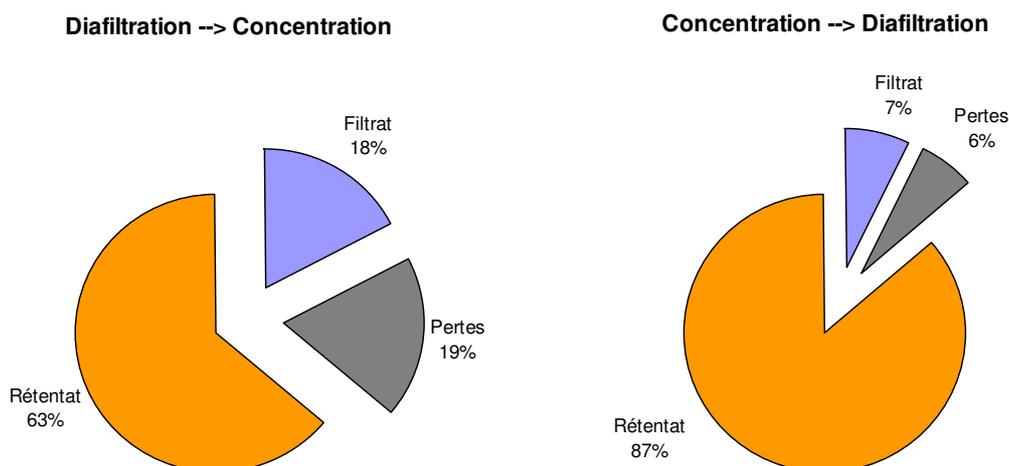


Figure 94 : Répartition des lipides dans les fractions obtenues lors de l'ultrafiltration de l'hydrolysate de têtes de sardine. *Lipid repartition and estimated losses in sardine heads ultrafiltration fractions*

Les profils de répartition des lipides sont très différents en fonction de la cascade de procédés choisie. Lors de la diafiltration puis la concentration, 63% des lipides sont retenus dans le rétentat et 18% sont passés au travers de la membrane. L'écriture du bilan matière nous a permis d'estimer les pertes à 19%. Ces pertes correspondent en grande partie aux lipides adsorbés par la membrane ou retenus dans le système de filtration (canaux de recirculation, volume mort, ...). Quoi qu'il en soit, cette cascade ne permet pas une bonne rétention des lipides avec un taux de transmission de 18%. La seconde cascade, où la concentration est réalisée avant la diafiltration, permet une meilleure rétention des lipides (87%) et surtout une baisse conséquente des pertes occasionnées (6%). Ainsi, le taux de transmission des lipides lors de cette cascade n'est que de 7%.

Les charges en phospholipides des rétentats sont reportées dans le Tableau XLV. Les faibles quantités de lipides extraits dans les perméats ne nous ont pas permis de pouvoir effectuer les analyses en découlant.

La charge en phospholipides, initialement de $0,27 \pm 0,00$ g/L passe à 0,77 g/L lors de la première cascade, soit une concentration de 2,89. Cette charge atteint $0,81 \pm 0,07$ g/L lorsque la concentration est réalisée avant la diafiltration (deuxième cascade de procédés), soit une concentration de 3,04. La concentration à FRV 4 n'est toujours pas atteinte, mais la concentration des phospholipides est tout de même plus importante que celle des lipides (2,4).

Tableau XLV : Charge en phospholipides contenue dans l'hydrolysate de têtes de sardine et dans les rétentats obtenus après ultrafiltration en fonction de la cascade de procédé. *Phospholipid content in the fractions (permeate and retentate) obtained after the 2 filtration processes of sardine heads hydrolysate*

	Phospholipides (g/L)
Hydrolysate	0,27 ± 0,00
Diafiltration → Concentration	0,77 ± 0,08
Concentration → Diafiltration	0,81 ± 0,07

Le taux de rétention peut être estimé suivant la relation suivante :

$$\text{Taux de rétention} = (V_{\text{fil}} \cdot C_{\text{fil}}) / (V_i \cdot C_i) \cdot 100 \quad \text{Équation 18}$$

Avec :

V_i : volume initial (L)

C_i : concentration initiale en lipides (g/L)

V_{fil} : volume du perméat (L)

C_{fil} : concentration en lipides dans le perméat (g/L)

Ainsi, lors de la cascade diafiltration → concentration, le taux de rétention des phospholipides atteint 78% alors qu'il est de 100% lors de la cascade concentration → diafiltration.

Enfin, la répartition des acides gras contenus dans les fractions lipidiques des deux rétentats est indiquée dans le Tableau XLVI. Les acides gras saturés représentent la majorité des acides gras totaux dans les deux cas (61,4 ± 2,8% lorsque la diafiltration est réalisée en premier et 56,4 ± 0,6% lorsqu'elle est réalisée après la concentration), essentiellement dû à la grande quantité d'acide palmitique (41,6 ± 2,6% et 37,6 ± 0,5% respectivement). Les acides gras mono-insaturés représentent environ 35% des acides gras totaux, quel que soit le traitement et possèdent comme représentant majoritaire l'acide oléique (17% environ dans les deux cas). Enfin, les acides gras poly-insaturés sont présents à hauteur de 3,8 ± 1,5% (diafiltration puis concentration) et 7,4 ± 0,4% (concentration puis diafiltration). Les AGPI sont quant à eux représentés essentiellement par l'EPA (1,7 ± 0,5 et 2,5 ± 0,1%) et le DHA (2,1 ± 1,0% et 4,1 ± 0,3%).

Tableau XLVI : Répartition des acides gras (%) dans les fractions lipidiques des rétentats obtenus après ultrafiltration de l'hydrolysate de têtes de sardine. Fatty acid repartition in lipidic fraction of sardine heads hydrolysate ultrafiltration retentate

	Diafiltration → concentration	Concentration → Diafiltration
C14:0	7,6 ± 0,3	7,2 ± 0,1
C16:0	41,6 ± 2,6	37,6 ± 0,5
C18:0	12,1 ± 0,2	11,6 ± 0,1
Σ AGS	61,4 ± 2,8	56,4 ± 0,6
C16:1 c ω7	6,8 ± 0,2	7,0 ± 0,0
C18:1 c ω9	17,2 ± 0,3	17,1 ± 0,1
C18:1 c ω7	4,9 ± 0,1	4,8 ± 0,0
C20:1 c ω9	2,8 ± 0,4	3,2 ± 0,0
C22:1 c ω9	3,1 ± 0,8	4,0 ± 0,1
Σ AGMI	34,8 ± 1,3	36,2 ± 0,2
C18:2 c ω6	- -	0,7 ± 0,0
C20:5 c ω3	1,7 ± 0,5	2,5 ± 0,1
C22:6 c ω3	2,1 ± 1,0	4,1 ± 0,3
Σ AGPI	3,8 ± 1,5	7,4 ± 0,4

4.1.2.3. Discussion

4.1.2.3.1. Nettoyage du système

La technique de nettoyage est l'un des facteurs limitant de la viabilité économique des procédés et souvent sous-estimé (Aptel *et al.* - 2002). C'est pourquoi de nombreux tests ont été réalisés sur le nettoyage de la membrane. L'objectif de cette étape est de mettre à l'épreuve la membrane sélectionnée avec le même hydrolysate et avec différents cycles de nettoyage / colmatage. Cette étude a été réalisée sur une campagne expérimentale de 2 mois. Les réactifs ont été sélectionnés suivant les conseils du fabricant et d'un exploitant de procédés à membrane, ainsi que par l'expérience du Laboratoire. La soude (NaOH) a rapidement été rejetée comme agent de nettoyage du fait de la forte charge en lipides des échantillons. En effet, la soude en contact prolongé avec les lipides est à l'origine de la formation de savons (réaction de saponification) augmentant le colmatage de la membrane.

Les conditions classiques de nettoyage des membranes entraînent un colmatage irréversible qui s'accroît avec le temps. Seules des conditions drastiques permettent de recouvrer une perméation acceptable. Cependant, ces techniques, tout comme l'essai des nouvelles procédures de nettoyage (eau oxygénée, eau de javel, à partir du 40^{ème} essai) ne permettent pas une restauration à 100% des performances initiales de la membrane. Ces problèmes de régénération constituent une des limites de performance des membranes

organiques, favorisant ainsi l'utilisation de membranes céramiques, qui permettent des nettoyages (chimiques et physiques) beaucoup plus agressifs. Les résultats obtenus quant à la régénéralité sont donc assez mitigés. Le recours aux conditions limites imposées par le matériau, n'a été efficace qu'une seule fois. Les caractéristiques de la membrane diminuent ensuite. Toutefois, la diminution des performances de la membrane est moins rapide que lors des premiers essais. Cependant, même si la filtration peut être envisagée dans de telles conditions, l'impact de cette régénéralité non idéale sur les caractéristiques de séparation de la membrane devra être examinée sur des cycles longue durée. **La diminution du flux de perméat au cours de cette campagne expérimentale est révélatrice de l'état d'encrassement des séparateurs côté rétentat.** En effet, au cours du temps, la perte de charge longitudinale augmente le long de la membrane côté rétentat. L'avantage du système de filtration utilisé (pilote Minim[®]) réside dans la conception spécifique de ses cassettes, permettant un changement d'échelle assez aisé car linéaire. En effet, Aptel *et al.* considèrent que la difficulté du changement d'échelle se situe dans la transposition de la circulation des fluides à travers le système d'UF (Aptel *et al.* - 2002). Néanmoins, dans le cas présent, il semble que le colmatage soit dû à une incompatibilité entre la solution et la géométrie des canaux de recirculation situés à l'intérieur de la cassette. La conformation géométrique des membranes à utiliser pour traiter des produits similaires aux nôtres pourrait être étudiée, notamment les membranes de géométrie tubulaire (à l'intérieur desquelles la circulation des fluides est moins contrainte). En restant sur des membranes planes, une étude pourrait porter cette fois sur le profil de pression rencontré à l'intérieur de la cassette. Enfin, d'autres systèmes de nettoyage pourraient être étudiés, comme l'utilisation d'enzymes. En effet, une étude a montré que, dans le cas de colmatage par les lipides de membranes en PES, l'utilisation de lipases permettait d'obtenir une régénéralité idéale (Kartika - 2005). L'utilisation de lipases et de protéases a également permis une bonne régénéralité du matériau polysulfone dans le cas de la filtration d'effluents d'abattoir (Allie *et al.* - 2003).

The cleaning procedure is one of the limiting factor for the economic viability of industrial UF process and is often under-estimated (Aptel et al. - 2002). This is the reason why numerous tests have been realized on the cleaning procedure of the membrane. The goal of this step is to test the selected membrane with the same hydrolysate and with different fouling / cleaning cycles. This study has been carried out during a 2 months experimental period. Cleaning solutions have been selected according to the membrane manufacturer recommendations, and according to the Laboratory experience. Sodium hydroxide (NaOH)

has rapidly been rejected as cleaning a solution due to the soap formation in contact with lipids, increasing the fouling.

Classical cleaning conditions induce an irreversible fouling which increase continually. The drastic conditions (high concentration, high temperature and high contact time) are the means to allow a slight recovery of the permeate flux. However, these drastic conditions, as the new cleaning conditions trials (with hydrogen peroxide or sodium hypochlorite, start at the experiment n°40) do not permit a complete recovery of the initial performance of the membrane. Those regeneration problems are one of the performance limit in the use of organic cartridges. Ceramic membranes could then be advantageously used because they can be cleaned in more aggressive conditions (chemical and physical). Regenerability results obtained are controversial because the use of the drastic conditions have been efficient only one time. The membrane permeation characteristics are then decreasing. Nevertheless, this decrease is less impressive than the first one. However, even if the ultrafiltration could be conducted in those conditions, the impact of this recovery on the filtration products should be explored during a long time experiment. **The decrease of the permeate flux during this 2 months experimental period has shown that the separators located in the retentate compartment are very clogged (pressure drop increase).** Indeed, during the experiment, there is an increase of the longitudinal pressure loss along the membrane. The main advantage of the filtration system used (Minim[®] apparatus) is due to the specific cartridge conception, allowing an easy un-scale (linear transposition). Indeed, Aptel *et al.* consider that the main up-scale difficulty is the transposition of the fluids circulation inside the ultrafiltration system (Aptel *et al.* - 2002). Nevertheless, in the present case, it seems that the fouling is due to an incompatibility between the solution and the retentate circulation pathways. The geometric conformation of other membranes in ultrafiltration of similar products should be studied, especially tubular membrane (in which fluids circulation is simplest). With flat sheet membranes, a study should be conducted on the pressure profile inside the cartridge. Finally, other cleaning procedures should be investigated, such as enzymatic treatments. Indeed, Kartika has shown that lipases used in lipid fouling can recover the initial performances of PES membrane (Kartika - 2005). In the case of protein / lipid mixtures (effluents from abattoir), Allie *et al.* have also shown that lipases and proteases allow a good regeneration of PES membranes (Allie *et al.* - 2003).

4.1.2.3.2. Filtration de l'hydrolysate de têtes de sardine

Le travail se focalise à présent sur la réalisation de l'ultrafiltration de l'hydrolysate de têtes de sardine obtenu suite à la phase d'optimisation des conditions d'hydrolyse (cf. 3.1.3). Le principal objectif de cette étape est de concentrer les lipides dans le rétentat en essayant d'éliminer le plus possible les peptides de cette fraction. Pour ce faire, après avoir déterminé les conditions de filtration, l'étude a porté sur le choix de la cascade de procédé (diafiltration puis concentration ou concentration puis diafiltration). Le temps opératoire, la quantité d'eau nécessaire ainsi que la qualité des produits obtenus ont été étudiés pour chaque cascade.

Lors de la détermination des conditions opératoires, les changements de flux de perméat obtenus en régime stabilisé ont montré qu'une pression transmembranaire importante n'était pas forcément nécessaire. Dans les conditions opératoires utilisées (7,2 L/h de débit de rétentat et pour une PTM de 1,5 bar), les performances obtenues (flux de perméat aux alentours de 30 L/h.m²) sont dans les ordres de grandeur des valeurs obtenues en application industrielle en UF de protéines. Ce sont donc ces conditions (débit de rétentat de 7,2 L/h et PTM de 1,5 bar) qui ont été utilisées pour réaliser la filtration de l'hydrolysate de têtes de sardine. Lors de cet exercice, le flux de perméat (en recirculation) décroît rapidement puis se stabilise sur une longue période. Ces résultats montrent que le colmatage est constant. Une étude portée sur la filtration d'huile de tournesol réalisée avec la même cassette (système PALL Oméga) sur une membrane en PES (au seuil de coupure toutefois plus petit) montrait une évolution similaire du flux de perméat (Kartika - 2005).

Deux essais d'ultrafiltration ont été réalisés, afin de tester l'influence de l'ordre de la séquence diafiltration / concentration. Tous les principaux résultats comparant les deux cascades d'UF sont compilés dans le Tableau XLVII.

A partir du même volume de solution de départ (100 mL) et pour obtenir un volume de rétentat de même ordre de grandeur (30 mL), les volumes utilisés ne sont pas du tout équivalents. En effet, alors que 100 mL d'eau sont nécessaires pour réaliser la diafiltration lors de la cascade concentration → diafiltration, 400 mL sont nécessaires pour l'étape de diafiltration de l'autre cascade de procédés. La cascade concentration → diafiltration est donc génératrice de quatre fois moins d'effluents. De plus, pour atteindre le même objectif, la première cascade dure 27 min (diafiltration → concentration) alors que 16 min suffisent pour la seconde (concentration → diafiltration). Le temps de réalisation d'un procédé est un des

critères les plus importants. En effet, plus le temps est court, moins le coût de production est élevé et moins les appareils sont utilisés, permettant une production journalière plus importante. **Le procédé concentration → diafiltration semble donc plus intéressant d'un point de vue économique (consommation d'eau, d'énergie, production d'effluents).** Concernant les flux de perméat, dans les deux cas, lorsque la diafiltration est réalisée, c'est-à-dire en milieu dilué, les performances sont meilleures qu'en concentration. Les flux obtenus, même lors de la seconde cascade (aux alentours de 20 L/h.m²/bar contre environ 30 L/h.m²/bar dans la première cascade) sont tout à fait dans l'ordre de grandeur de ceux qui sont généralement rencontrés lors en UF de protéines. Ces performances pourraient probablement être améliorées en augmentant la PTM et le débit tangentiel de rétentat, mais ces augmentations engendreraient également un coût énergétique plus important.

L'étude sur les peptides a montré que leur transmission était bonne puisque 91% (diafiltration puis concentration) et 87% (concentration puis diafiltration) des peptides sont transférés au perméat lors de l'UF. La faible différence qui existe entre les deux procédés pourrait venir du fait que, en concentrant en premier lieu, des complexes se forment entre les lipides et les protéines, rendant ensuite difficile, lors de la diafiltration, la libération des peptides. Cependant, cette variation du taux de transmission entre les deux procédés reste relativement faible. Récemment, une étude s'est focalisée sur l'effet colmatant des complexes protéines / lipides sur des membranes en PES. La réduction du flux enregistrée n'est pas significative, rejetant de ce fait que l'hypothèse d'un colmatage lié à ces complexes (Priyananda et Chen - 2006). Les 4 volumes de diafiltration utilisés semblent être suffisants pour éliminer le maximum de peptides, compte tenu des charges protéiques obtenues dans les derniers perméats (~ 0,01 g/L). Il peut de plus être supposé que trois volumes ajoutés auraient été suffisants. **Concernant les peptides, la cascade ne semble donc pas influencer sur la qualité des fractions obtenues.**

Par contre le choix de la cascade semble être important concernant la qualité lipidique des fractions. En effet, la première cascade est source de pertes importantes (19%) et d'une transmission des lipides dans le perméat (18%). La dilution initiale de l'échantillon peut expliquer la plus forte transmission de lipides vers l'ultrafiltrat. Quoi qu'il en soit, un taux de rétention de 63% de lipides, alors que cette rétention est l'objectif principal de l'étude, ne semble pas satisfaisant. Avec ce type de procédé, la perte de lipides pourrait être diminuée par l'utilisation de différents matériaux membranaires et la transmission pourrait être diminuée en utilisant une membrane possédant un seuil de coupure plus petit. Par contre, **les**

résultats obtenus avec la seconde cascade permettent d'atteindre ces objectifs. En effet, en concentrant d'abord l'échantillon, les lipides sont plus retenus dans le rétentat (87%) et peu de pertes sont occasionnées (6%). Une fois de plus, la cascade concentration → diafiltration est la plus indiquée. En 2005, Kartika, lors de sa thèse, a montré, sur le même pilote avec des membranes PES et des seuils de coupure inférieurs à 300 kDa (de 1 à 50 kDa), que les membranes présentaient un taux de rétention faible vis-à-vis des acides gras libres (moins de 10%), cette transmission étant expliquée par la petite taille de ces composés (< 300 Da) (Kartika - 2005). La transmission des lipides observée dans la première cascade provient ainsi peut être d'acides gras libres, générés par hydrolyse lors de la dilution importante réalisée lors de la diafiltration. Dans la seconde cascade, la dilution étant moins importante, une quantité plus faible d'acides gras libres auraient été générés. Cette différence pourrait expliquer les variations des taux d'acides gras dans la fraction lipidique du rétentat. Ainsi, les deux profils obtenus sont différents en fonction du traitement réalisé. **Lorsque la diafiltration est réalisée en premier, la faible part des AGPI fait place à une plus grande partie des AGS, contrairement au profil obtenu lorsque la concentration est effectuée en premier. Ainsi, l'hypothèse évoquant une libération plus facile des AGPI en milieu aqueux peut être proposée.** En effet, en comparant la composition en acide gras totaux de l'échantillon initial (Tableau XXXV) avec celles obtenues après la réalisation des deux séquences étudiées, nous pouvons constater que les proportions en AGPI sont beaucoup plus faibles après UF (moins de 10% des acides gras totaux, contre 30% dans l'échantillon avant filtration). Il serait également intéressant de réaliser l'étude des acides gras passés au travers de la membrane de façon à confirmer cette hypothèse. Cependant, pour obtenir une quantité suffisante de lipides pour réaliser ces analyses, des essais à plus grande échelle devront être réalisés.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude vont dans le sens de ceux proposés par Afonso *et al.*, où le degré de dilution d'un effluent pouvait faire diminuer la rétention des lipides et favoriser la transmission des protéines (Afonso *et al.* - 2004).

En ce qui concerne la classe des phospholipides, la concentration obtenue est plus importante que celle des lipides totaux. En effet, le facteur de concentration atteint environ 3 pour les deux cascades. **Les phospholipides sont ainsi retenus plus efficacement par la membrane.** Ces résultats confirment ceux obtenus par Kartika, qui montraient que le taux de rétention des phospholipides était très efficace avec ce type de membrane (Kartika - 2005). En effet, le PES est utilisé en industrie pour le dégommeage des huiles, *i.e.* les phospholipides sont

séparés de l'huile en étant retenus dans le rétentat (à 96%) (Ong *et al.* - 1999). Les taux de rétention obtenus pour les deux cascades confirment les résultats de ces auteurs. **Une fois de plus, la concentration suivie de la diafiltration permet une meilleure atteinte de nos objectif avec une rétention totale des phospholipides.** En phase aqueuse, c'est-à-dire dans un milieu fortement dilué (cas de la première cascade), le caractère surfactant des phospholipides se traduit par la formation de micelles. La tête polaire est alors en contact avec l'eau et les phospholipides peuvent être transportés au travers de la membrane par la forte quantité d'eau présente dans le milieu (la taille d'un phospholipide étant généralement de l'ordre de 700 Da). Les phospholipides possèdent également une affinité d'adsorption avec les membranes en PES (Hancer *et al.* - 2002), ce qui pourrait expliquer également le fait que le taux de concentration ne soit pas égal à 4.

En conclusion, la cascade concentration puis diafiltration semble être préférable à la cascade diafiltration puis concentration sur tous les critères recherchés. En effet, cette cascade permet une UF plus rapide, en générant moins d'effluents et avec un temps opératoire et donc une demande énergétique plus faible. La qualité des produits obtenus est également supérieure ou égale à celle obtenue lors de la première cascade. Les peptides sont transmis de façon similaire et la charge restante dans le rétentat est de même ordre de grandeur. Les taux de rétention des lipides et des phospholipides sont nettement meilleurs en commençant la séquence par une concentration. De plus, les acides gras contenus dans le rétentat sont plus riches en AGPI.

Tableau XLVII : Principaux résultats obtenus lors des deux différentes cascades réalisées lors de l'UF de l'hydrolysate de têtes de sardine

Séquence	Diafiltration → Concentration	Concentration → Diafiltration
Volume initial (L)	0,1	0,1
FRV	4	4
Volume eau ajouté pour la diafiltration (L)	0,4	0,1
Temps opératoire (min)	27	16
Flux de perméat (L/h.m ² /bar)	~ 30	~ 20
Taux de transmission de peptides (%)	91%	87%
Charge en peptides dans le rétentat (g/L)	1,12	1,20
Charge en peptides dans le perméat (g/L)	0,012	0,014
Taux de rétention des lipides (%)	63%	87%
Charge en lipides dans le rétentat (g/L)	3,57	3,61
Charge en lipides dans le perméat (g/L)	0,06	0,06
Taux de rétention des phospholipides (%)	78%	100%
Charge en phospholipides dans le rétentat (g/L)	0,77	0,81

This part of the work is now focusing on the UF of sardine heads hydrolysate obtained after the optimization of sardine heads hydrolysis with Protamex (see 3.1.3). The main goal of this study is to concentrate the lipids in the retentate and to try to transfer as much as possible the peptides to the permeate. Filtration conditions have been determined. Then, the choice of the order of the sequential procedure has been studied (diafiltration then concentration, or concentration before diafiltration). Operating time, water requirement for the process and quality of the products obtained with the 2 different processes have been compared.

During the operating conditions determination, the permeate flux variations have shown that a high transmembrane pressure (PTM) was not necessary. In the operating conditions used (retentate flux of 7.2 l/h and a transmembrane pressure of 1.5 bar), the performances obtained (permeate flux around 30 l/h.m²) fits totally with the values generally obtained in an industrial framework of protein UF. Hence, these conditions have been used for the filtration of the hydrolysate of sardine heads. During this experiment, the permeate flux (in recirculation) decreases rapidly and then is then stabilized for a long period. A study on sunflower oil realized with the same apparatus (PALL Omega) and the same membrane material (PES) but with lower MWCO, shown a similar evolution of the permeate flux (Kartika - 2005).

Two UF trials have been conducted in order to test the influence of the diafiltration / concentration order. All the principal results obtained for these 2 tests are indicated in Table III.

*The same initial volume (100 mL) has been used for the 2 tests. The final retentate volume is also the same (around 30 mL), but the water requirement was not the same. While 400 mL were needed for the diafiltration → concentration process, only 100 mL were necessary for the concentration → diafiltration one. **So, the second process generates 4 times less effluent volume and is, consequently, less polluting.** Furthermore, to reach the same objective, the first process is realized within 27 min while 16 min are sufficient for the realization of the second one. The duration of a process is one of the most important criteria. Indeed, the shorter the duration is, the less expensive the process will be and the most important the daily production will be. The concentration → diafiltration process seems to be the most interesting one in an industrial point of view (water consumption, energy consumption and effluent production). Concerning the permeate flux, in both cases, when the diafiltration is performed, i.e. in a diluted medium, the performances are higher than during*

concentration. Flux obtained, around 30 L/h.m²/bar in the first process and around 20 L/h.m²/bar in the second one, are ranged in the values area generally industrially observed of the protein ultrafiltration. These performances could be enhanced with an increase of the transmembrane pressure or the crossflow velocity, but such modifications would induce an increase of the energy consumption. The concentration → diafiltration sequences should be again the most efficient.

Concerning the peptides, the study has shown that the peptide transmission was efficient. During the diafiltration → concentration process, 91% of the peptides are recovered in the permeate, and 87% in the concentration → diafiltration process. The slight difference between the 2 processes should be due to the fact that, when the concentration is conducted as a first step, there is a complex formation between lipids and peptides, which is hard to break during the diafiltration step. Anyway, this variation is very slight, almost negligible. Recently, a study has focused on the fouling effect of the protein – lipid complex on PES membranes. The flux reduction registered is not significant, rejected the hypothesis of the fouling capacity of this kind of complex (Priyananda et Chen - 2006). According to the low peptides quantities founded in the last permeates (~ 0.01 g/L), the 4 volumes used for the diafiltration seems to be sufficient in order to eliminate most of the peptides in the retentate. Maybe 3 volumes should be sufficient. Concerning the peptides quality in the fractions collected, the choice of the process does not seem to have any influence.

The choice of the process is more important concerning the lipidic quality of the fractions. Indeed, there is a significant loss (19%) and a high lipid transmission (18%) in the first sequence. The initial dilution could explain this lipid transmission in the permeate. 63% of the lipids have been recovered in the retentate, which is not sufficient for the main objective of this study. With this kind of process, the lipid loss (essentially due to lipid adsorption on the membrane) could be reduced by the use of different membrane materials and the transmission could probably be reduced with lower MWCO. Anyway, results obtained with the second process are in accordance with the fixed objective. An important part of lipids (87%) is concentrated in the permeate and few losses are registered (6%). One more time, the concentration → diafiltration process seems the most indicated sequence. In 2005, Kartika, in his PhD work, has shown that, with the same apparatus and with PES membrane with MWCO below 300 kDa (1 to 50 kDa), the free fatty acids are fairly rejected (retention factor less than 10%), this transmission is explained by the very low molecular weight of such compounds (< 300 Da) (Kartika - 2005). The observed lipid transmission during the first process is probably

due to the free fatty acid transmission. The most important free fatty acid quantity obtained during the first process could be due to an hydrolysis occurred in the dilution step. These variation of fatty acid liberation could explain the variation observed in fatty acid composition in the permeate. Indeed, two different fatty acids profiles have been obtained. **When the diafiltration is conducted as the first step of the sequence, there is more saturated fatty acids and less poly-unsaturated ones than when the concentration is realized before. So, poly-unsaturated fatty acids should be liberated easier than other fatty acids classes.** Indeed, the comparison between the fatty acid composition of fractions before and after UF indicates that PUFA contents are lower after UF (PUFA represent less than 10% of total fatty acids, instead of 30% before filtration). It should be also interesting to study the fatty acid included in the transmitted lipids in order to confirm this hypothesis. But, to perform this study, it requires a very high quantity of matter. The process needs to be scaled-up.

These results confirm that obtain by Afonso *et al.*, concerning the fact that effluent has an influence on the retention rate of lipids and proteins (Afonso *et al.* - 2004).

Concerning the phospholipids, the concentration is more important than that obtained for the lipids. The concentration factor reaches around 3 for the 2 processes. **Among lipids, phospholipids are highly retained by the PES membrane.** The results confirm those obtained by Kartika, who showed that the phospholipid retention factor is very good with this kind of membrane (Kartika - 2005). PES material is used in industry for the oil degumming, *i.e.* the retention of phospholipids (about 96%) (Ong *et al.* - 1999). The retention factor obtained here is in accordance with this 2 studies. **One more time, the concentration step followed by a diafiltration allows to reach our objectives with a complete retention of the phospholipids.** In aqueous phase, in a high diluted media (like in the first process), the surfactant property of the phospholipids induces a micella formation. The polar heads are then in contact with water and the phospholipids could be more easily transported through the membrane, due to the low molecular weight of phospholipids (around 700 Da). Let us mention that phospholipids possess also an adsorption affinity with PES membranes (Hancer *et al.* - 2002), which could explain the fact that the concentration factor is below 4.

To conclude, the concentration → diafiltration sequence seems to be more efficient on the totality of selected criteria than the diafiltration → concentration one. This process allows

a more rapid filtration, needs less water and the quality of the products is better (lipids, phospholipids, fatty acids) or equal (peptides) to those obtained with the other process.

Table III : Main results obtained during the two different processes of sardine heads hydrolysate ultrafiltration

<i>Sequence</i>	<i>Diafiltration → Concentration</i>	<i>Concentration → Diafiltration</i>
<i>Initial Volume (L)</i>	<i>0,1</i>	<i>0,1</i>
<i>Factor of volume reduction (FRV)</i>	<i>4</i>	<i>4</i>
<i>Added water during diafiltration (L)</i>	<i>0,4</i>	<i>0,1</i>
<i>Operating time (min)</i>	<i>27</i>	<i>16</i>
<i>Permeate Flux (L/h.m²/bar)</i>	<i>~ 30</i>	<i>~ 20</i>
<i>Peptide transmission (%)</i>	<i>91%</i>	<i>87%</i>
<i>Peptide concentration in retentate (g/L)</i>	<i>1,12</i>	<i>1,20</i>
<i>Peptide concentration in permeate (g/L)</i>	<i>0,012</i>	<i>0,014</i>
<i>Lipid retention (%)</i>	<i>63%</i>	<i>87%</i>
<i>Lipid concentration in retentate (g/L)</i>	<i>3,57</i>	<i>3,61</i>
<i>Lipid concentration in permeate (g/L)</i>	<i>0,06</i>	<i>0,06</i>
<i>Phospholipid retention (%)</i>	<i>78%</i>	<i>100%</i>
<i>Phospholipid concentration in retentate (g/L)</i>	<i>0,77</i>	<i>0,81</i>

4.2. Recherche de voies de valorisation des eaux de lavage de la chaîne de fabrication de surimi

Les eaux de lavage issues du procédé de fabrication du surimi sont maintenant étudiées en vue de réduire leur charge polluante et de valoriser les fractions retenues. Le premier chapitre de ce travail (cf. 1.2.2) a montré la richesse de ces eaux en protéines. L'objectif de cette étape est donc de récupérer les fractions protéiques de la première eau de lavage en utilisant l'ultrafiltration.

4.2.1. Sélection des membranes

Une membrane efficace doit remplir simultanément 3 conditions: flux élevé et stable, bonne sélectivité vis-à-vis de l'espèce cible, bonne régénéralité.

La première étape de cette étude consiste à déterminer, parmi celles décrites dans la partie matériel et méthodes (Tableau XIX), la membrane la plus performante. Ce travail expérimental repose sur une batterie de tests d'adsorption (Jaouen - 1989) et d'ultrafiltration avec l'eau de lavage S2 (Figure 32).

4.2.1.1. Flux de solvant, réduction du rayon de pore

En présence d'un solvant pur, le flux de perméat (J_0) varie généralement de façon linéaire avec la pression transmembranaire.

En assimilant les pores de la membrane à des canaux cylindriques droits, la loi de Poiseuille permet d'exprimer le flux de solvant en fonction des caractéristiques du solvant, celles de la membrane (en particulier rayon de pore r) et des conditions d'utilisation de celle-ci.

Après un simple contact statique membrane / solution pendant un temps donné et à une température fixée, le flux de perméat passe de J_0 à J_a consécutivement à la réduction du rayon de pore due au phénomène d'adsorption. Les pores sont en effet tapissés d'une couche de solutés adsorbés d'épaisseur considérée constante Δr (Équation 19).

$$J_a = (N \cdot \pi) \left(\frac{(r - \Delta r)^4}{8n} \right) \left(\frac{PTM}{\Delta x} \right) \quad \text{Équation 19}$$

Avec :

J : débit de solvant par unité de surface ($\text{m}^3/\text{m}^2/\text{s}^1$)

r : rayon de pore (m)

N : nombre de pores par unité de surface (m^{-2})

PTM : Pression transmembranaire (Pa)

η : viscosité dynamique du solvant (Pa.s)

Δx : épaisseur effective de la membrane (m)

Δr : épaisseur de la couche adsorbée

Dans le cas de solutions de protéines ce phénomène d'adsorption est à l'origine d'une baisse parfois très importante du flux à l'eau et donc d'une augmentation significative de la résistance hydraulique du milieu poreux.

Le choix initial de la membrane est donc important car la modification des caractéristiques intrinsèques de celle-ci (diamètre moyen de pores, charge de surface) aura une influence sur la sélectivité de l'opération. En outre, l'étape ultérieure de régénération (en général par voie chimique) sera également facilitée (temps plus court, quantité minimale de réactifs, température peu élevée) lorsque les interactions solutés / membranes seront faibles.

Par simple mesure des flux J_o et J_a , Zeman propose de quantifier l'effet de l'adsorption en utilisant une formulation dérivée de la loi de Poiseuille (Zeman - 1983). La réduction de rayon de pore est exprimée de la façon suivante :

$$\frac{\Delta r}{r} = 1 - \left(\frac{J_a}{J_o}\right)^{0,25} \quad \text{Équation 20}$$

Les résultats obtenus pour un temps d'adsorption de 20 heures en conditions statiques (sans pression, donc sans perméation) à une température de 15°C sont exprimés dans le Tableau XLVIII.

Tableau XLVIII : Flux à l'eau des membranes avant et après 20h d'adsorption et réduction du rayon de pore correspondant. Water permeation flux before and after 20h adsorption test and pore size reduction

Membrane		Jo Flux à l'eau (L/h.m ²) à T°C=15°C, PTM = 1bar	Ja Flux à l'eau après adsorption (L/h.m ²) à T°C=15°C, PTM = 1bar	Réduction du rayon de pore $\Delta r/r$ (%) = $1-(J_a/J_o)^{0,25}$
Type	kDa			
PES 3028	3	27	4	39%
	10	22	7	25%
	40	179	42	30%
	100	124	20	36%
PAN 3038	40	142	24	36%
PAN 3042	50	222	36	37%
PAN 3050	50	350	34	44%
PVDF 3065	40	850	28	57%
RC 70 PP	10	50,6	50,0	0,4%

Le flux à l'eau avant adsorption, le plus élevé est obtenu par la membrane PVDF 40 kDa (850 L/h.m²). Les membranes PES 40, 100, PAN 40 et 50 ont des flux compris entre 124 et 350 L/h.m². Les flux les plus faibles sont obtenus avec les membranes PES 3 et 10 kDa (27 et 22 L/h.m²). Le flux de la membrane RC 10 kDa est de l'ordre de 50 L/h.m², il est donc moyen comparé aux autres. Cependant, ce flux est observé pour un seuil de coupure de 10 kDa. Pour ce même seuil de coupure, le flux à l'eau observé pour une membrane en PES est de 22 L/h.m².

Après 20 h de contact avec l'eau de lavage, seule la membrane RC 70 PP fait preuve d'une faible adsorption. En effet l'épaisseur relative de la couche adsorbée est de l'ordre de 0,4% alors que pour toutes les autres membranes, celle-ci est supérieure à 25%. Les flux sont nettement moins importants après ces 20h de contact. Le matériau PVDF semble être le matériau ayant le plus d'affinité avec les protéines. En effet, alors que celui-ci possédait le plus grand flux à l'eau sur membrane neuve (850 L/h.m²), il possède également le plus faible

flux J_a après contact avec l'eau de lavage (28 L/h.m²). Le matériau PES semble également posséder de fortes affinités avec les protéines. En effet, une baisse de flux de l'ordre de 70 à 85% est observée après 20h de contact, ce qui correspond à une réduction du rayon de pore de l'ordre de 25 à 39%. Les résultats obtenus avec le matériau PAN sont de même ordre de grandeur qu'avec le PES puisque le flux à l'eau a diminué de environ 85% après contact. La charge de la membrane (anionique pour la 3042 et cationique pour la 3050) ne semble pas avoir d'effet sur l'adsorption des protéines. En effet, la réduction du rayon de pore est du même ordre de grandeur (37 et 44%). Le flux à l'eau initial J_o est un peu plus élevé dans le cas d'une membrane cationique mais le flux J_a obtenu après contact est identique (36 et 34 L/h.m²).

4.2.1.2. Ultrafiltration des eaux de lavage

Afin d'observer l'influence du matériau, les essais d'ultrafiltration ont été effectués sur 4 membranes de matériaux différents et de seuil de coupure identique (40 kD) à l'exception de la membrane en cellulose régénérée (RC) dont un seul seuil de coupure (10 kD) est disponible.

Pour chaque membrane, le flux de perméat au cours de l'ultrafiltration est mesuré toutes les heures pendant 5 heures (Figure 95).

Les 4 courbes présentent la même allure : le flux diminue au cours du temps du fait de l'accumulation de substances colmatantes (protéines, lipides) au voisinage de la membrane.

Cependant il y a une très nette différence de flux entre ces membranes :

Les flux du perméat des membranes PAN et PVDF sont sensiblement les mêmes, ils passent de 20 L/h.m² à 10 L/h.m² au bout de 5 h.

Le flux d'ultrafiltration de la membrane PES est extrêmement faible, de l'ordre de 1 L/h.m².

Le flux de la membrane RC est le plus élevé tout au long de l'ultrafiltration, il passe de 30 L/h.m² à 20 L/h.m² soit un résultat presque 2 fois supérieur à celui des membranes PVDF et PAN.

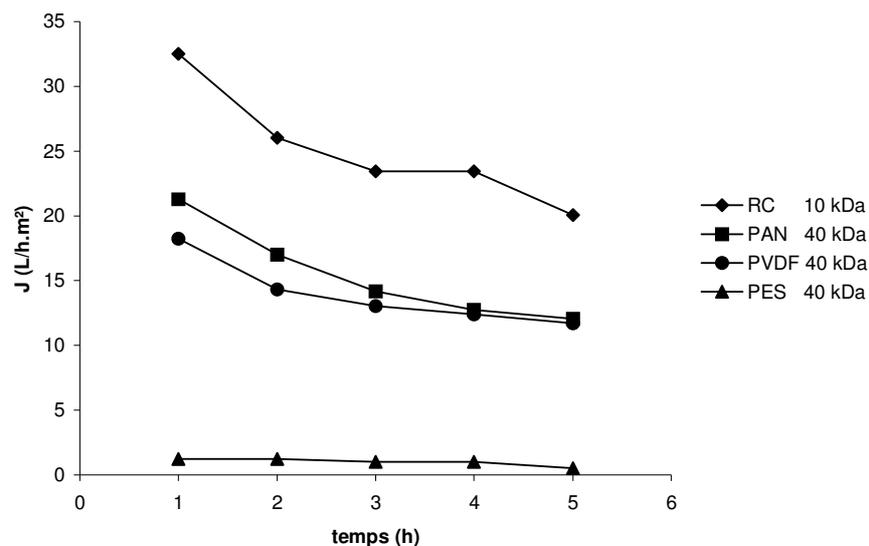


Figure 95 : Evolution du flux de perméation J au cours du temps pour chaque matériau testé lors de la filtration de l'eau de lavage S2. $T = 15^{\circ}\text{C}$, $\text{PTM} = 1$ bar. *Permeation flux evolution for each tested material during S2 filtration*

Les flux à l'eau obtenus avant (J_0) et après (J_a) ultrafiltration de l'eau de lavage S2 sont reportés dans le Tableau XLIX. Ces résultats permettent de se rendre compte de la différence des flux de perméat rencontrés avec de l'eau pure ou chargée. En effet, les flux initiaux J_0 obtenus à l'eau pure sont beaucoup plus importants que lors du passage de l'eau S2 : plus de 179 fois plus pour la membrane en PES, 74 fois plus pour PVDF, 12 fois plus pour le PAN et 2,5 fois plus pour RC. Ces résultats vont dans les sens de ceux obtenus lors des tests d'adsorption pour les membranes en PVDF, PAN et RC. La membrane en PES, qui avait un comportement d'adsorption similaire, voire supérieur, à celle en PAN, possède ici un flux de perméation quasi nul.

Tableau XLIX : Flux de perméat obtenus avant, pendant et après ultrafiltration de l'eau de lavage S2. $T = 15^{\circ}\text{C}$, $\text{PTM} = 1$ bar. *Permeation fluxes obtained before and after S2 filtration*

Membrane	Flux à l'eau (L/h.m^2) avant ultrafiltration	Flux après 5 h avec S2 (L/h.m^2)	Flux à l'eau (L/h.m^2) après nettoyage
PES 40 kDa	179	<1	1,2
PAN 40 kDa	142	12	30
PVDF 40 kDa	850	11,5	29
RC 10 kDa	50,6	20	49,3

4.2.1.3. Régénération des membranes

Afin de tester la facilité de régénération des membranes (qui est le troisième critère de performance), un nettoyage chimique est réalisé avant une nouvelle mesure du flux de perméation à l'eau. Les flux obtenus après ce nettoyage sont consignés dans le Tableau XLIX.

Le nettoyage chimique décrit dans la partie matériel et méthodes (cf. p113) est réalisé pour tous les essais, à l'exception de la membrane RC, où seul un rinçage à l'eau s'est avéré nécessaire. En effet, pour la membrane RC, le taux de régénération de la perméabilité de la membrane est de 97%. Le taux de régénération des autres membranes est nettement moins important, même avec l'utilisation d'un nettoyage chimique. La membrane en PAN possède un taux de régénération de 21% et les deux autres membranes sont presque entièrement colmatées puisque le taux de régénération de la membrane en PVDF est de 3% et celui de la membrane en PES de 0,7%.

4.2.1.4. Analyses biochimiques

Les analyses biochimiques ont été réalisées sur l'eau de lavage S2 puis sur tous les échantillons obtenus après ultrafiltration au bout de 5 heures (perméat et rétentat). Les concentrations et teneurs en lipides et protéines sont exprimées en g/L (Tableau L).

Tableau L : Composition biochimique (matière sèche, lipides, protéines) des fractions obtenues après ultrafiltration de l'eau de lavage S2. T = 15°C, PTM = 1 bar. Biochemical composition (dry matter, lipids, proteins) of fractions generated during S2 ultrafiltration

Echantillons	MS (%)	Lipides (g/L)	Peptides (g/L)
Eau S ₂	37,5	1,8 ± 0,5	26,5 ± 0,7
Rétentat PAN	59,0	2,3 ± 0,7	48,3 ± 0,8
Perméat PAN	21,1	0,1 ± 0,0	10,6 ± 0,2
Rétentat PVDF	59,0	2,7 ± 1,1	49,2 ± 1,2
Perméat PVDF	16,9	0,1 ± 0,0	9,3 ± 0,3
Rétentat CR	69,1	0,8 ± 0,2	60,4 ± 1,4
Perméat CR	14,8	0,1 ± 0,0	9,2 ± 0,2

Aucune analyse n'a pu être réalisée sur les échantillons provenant de l'ultrafiltration avec la membrane en PES, la quantité d'échantillon étant insuffisante compte tenu des flux de perméation extrêmement bas ($J < 1 \text{ L/h.m}^2$). Ce qui justifie l'abandon de cette membrane pour la suite de l'étude. Les résultats obtenus avec les trois autres matériaux indiquent que, d'une manière générale, les lipides sont concentrés dans le rétentat puisque pour chaque matériau, la charge protéique est plus importante dans le rétentat que dans l'eau initiale. Les lipides sont également concentrés dans le rétentat.

Le bilan de conservation de masse s'écrit :

$$V_i.C_i = V_p.C_p + V_r.C_r \quad \text{Équation 21}$$

Avec

V_i : volume initial de S2 en L

Ci : concentration en soluté dans l'eau de lavage S2 en g/L

Vp : volume de perméat récupéré en L

Cp : concentration en soluté du perméat en g/L

Vr : volume du rétentat à 5 heures en L

Cr : concentration en soluté du rétentat en g/L

Le taux de rétention (au bout des 5 h) des constituants (lipides, peptides) peut être calculé comme suit :

$$\text{Taux de rétention (\%)} = [(V_i.C_i) - (V_p.C_p)] / (V_i.C_i) \cdot 100 \quad \text{Équation 22}$$

Les taux de rétention obtenus sont consignés dans le Tableau LI.

Tableau LI : Taux de rétention des lipides et des protéines pour chaque matériau après une filtration de 5 h de l'eau de lavage S2. T=15°C, PTM = 1 bar. *Lipid and protein retention rates after 5 h S2 ultrafiltration according to the filtration material*

Matériau	Taux de rétention (%) des lipides	Taux de rétention (%) des peptides
PAN	96,4	78,9
PVDF	97,4	79,8
RC	98,0	79,9

Une rétention quasi totale des lipides quel que soit le matériau (96 à 98%) est observée.

Le taux de rétention des peptides est de l'ordre de 79%.

Ces 3 membranes ont donc une sélectivité voisine au niveau des lipides et des protéines.

4.2.1.5. Discussion

Les résultats obtenus après les tests d'adsorption nous indiquent que le matériau et le seuil de coupure ont une influence sur le colmatage des membranes. De manière générale, pour un même matériau (PES ou PAN ici testés), plus le seuil de coupure augmente, plus la réduction de rayon de pore est importante. Un seuil de coupure trop élevé n'est donc pas un choix pertinent. **Le test d'adsorption a également montré que les protéines possèdent différents degrés d'affinité avec le matériau.** Un temps de contact de 20 h entre l'eau de lavage S2 et la membrane indique une réduction de la perméation à l'eau significative pour les matériaux PES et PAN. Les membranes en PVDF exposées à l'eau de lavage voient leur flux de perméation devenir 30 fois inférieur à celui initialement obtenu. A l'inverse, les membranes en cellulose régénérée semble ne pas avoir beaucoup d'affinité avec les protéines contenues dans l'eau de lavage puisque le flux de perméation après contact est quasiment

identique à celui obtenu initialement. **La membrane RC semble donc être la plus intéressante concernant l'adsorption et la réduction du rayon de pore.**

L'étape consistant à ultrafiltrer l'eau S2 avec différents matériaux de même seuil de coupure (40 kDa sauf RC qui possède un seuil de coupure de 10 kDa) a permis la sélection du matériau le plus performant, et surtout d'éliminer les moins performants. Pour toutes les membranes, une stabilisation commence à se produire au bout de 5 h de filtration. **La membrane RC offre une fois de plus les meilleurs résultats, suivi des membranes PAN et PVDF.** La membrane en PES offre cette fois-ci des résultats très médiocres. **Il est, à ce stade, intéressant de constater que la hiérarchie des performances des différentes membranes en régime d'UF est identique à celle obtenue lors des tests d'adsorption en conditions statiques (Tableau XLVIII et Figure 95) :** la membrane qui présente le rapport $\Delta r/r$ le plus bas est la plus performante et inversement. On constate également que le choix du matériau est déterminant puisque les trois membranes de 40 kD ont des comportements parfois radicalement différents. Les résultats obtenus concernant le taux de régénération des membranes montrent également que la nature du matériau est au moins aussi important que le choix du seuil de coupure. En effet, en comparant les flux à l'eau avant l'ultrafiltration et après nettoyage, **seule la membrane RC retrouve son flux de référence. Un simple rinçage à l'eau lui a suffi pour recouvrer ses propriétés. Ce matériau sera ainsi plus facilement régénérable et sera de fait générateur d'une quantité moindre d'effluents de régénération (qui ne seront pas source de pollution chimique).**

Sur la base de cette étude expérimentale, il peut donc être conclu que la membrane répondant le mieux aux critères de performance concernant le flux et la nettoyabilité est la membrane RC en cellulose régénérée. La membrane en PVDF offre quant à elle des performances très limitées puisque ce matériau possède une forte affinité avec les protéines, que son flux à l'eau est faible et que sa régénéralité est quasi nulle. La membrane en PES a, quant à elle, montré de très faibles performances lors du passage de l'échantillon, malgré des caractéristiques d'adsorption et de régénération convenables. En effet, le flux de perméation est si faible qu'aucune analyse du perméat n'a pu être réalisée, éliminant ainsi cette membrane pour le reste de l'étude de concentration de protéines d'eau de lavage par UF.

Les analyses biochimiques réalisées sur les fractions perméat et rétentat obtenues avec les matériaux PAN, PVDF et RC ont montré que le taux de rétention des lipides était presque total pour les trois matériaux. Une légère transmission des protéines est

observée, mais cette transmission peut probablement être minimisée en utilisant des membranes de seuil de coupure plus bas (5 kDa pour la RC, 10 kDa pour PAN et PVDF).

Dans ce lot de membranes, une seule répond simultanément aux 3 critères de performance (flux de perméation élevée, bonne sélectivité, facilité de régénération). Il s'agit de la membrane RC 70 PP en cellulose régénérée de seuil de coupure 10 kDa. Cette membrane sera donc utilisée pour la suite de l'étude.

According to the results obtained during adsorption tests, the material and the MWCO had an influence on the membrane fouling. Generally, for one kind of material (here, PES and PAN), the higher the MWCO is, the more the pore size is reduced. The choice of a high MWCO is not a good option. Adsorption tests have also shown that proteins had different affinities with the membrane materials. A 20 h static contact between the surimi washing water S2 and the membrane leads to a significant reduction of the pore size for PES and PAN materials. PVDF membranes in contact with washing water induce a 30 times loss of the flux in comparison with the initial flux. At the opposite, RC membranes do not have a flux modification after 20 h contact with surimi washing water: the permeate flux obtained with water after static contact is quite similar to the one obtained initially with a new or clean membrane. The RC material seems to be the most interesting membrane material concerning the protein adsorption and the pore size reduction.

*The second step has consisted to permeate the washing water S2 with different materials with the same MWCO (40 kDa except for RC membrane for which only one MWCO was available: 10 kDa). This step has led to the more efficient material selection, and mostly to eliminate the less efficient. A stabilization of the permeate flux is observed after 5 h of filtration for all the membranes. **One more time, the RC material leads to the best results, followed by the PAN and PVDF materials.** Bad results have been obtained with PES membrane. **It is interesting to notice that the performance hierarchy between the membrane in UF is similar than that obtained during the adsorption static tests (Tableau XLVIII and Figure 95): the membrane with the lower $\Delta r/r$ ratio is the most efficient and inversely.** The choice of the material is preponderant because the three 40 kDa membranes possess radically different behaviour with the same solution. Results obtained concerning the regeneration rate show that the nature of the material is as important as the MWCO. **Indeed, the comparison of the permeate flux with water before and after cleaning indicates that only the RC***

membrane recovers its reference flux. A simple rinsing with water is sufficient to recover the initial properties of the membrane. This material will be easily regenerable and the water needed for his cleaning will be minimized (moreover, effluent generated do not contain any chemicals).

On the basis of this experimental study, we can conclude that the membrane which possesses the highest flux and cleaning performances is the RC membrane. PVDF material bears low performance due to the affinity of proteins for that material. Its flux is low and the cleaning process is not efficient. The PES membrane also bears low performance during the sample UF, despite acceptable adsorption characteristics and regenerability. This flux is as low than none analysis could be done. Hence, this membrane has been eliminated for the rest of the study.

Biochemical characterizations of the fractions generated during the filtration with the PAN, PVDF and RC membranes have shown that all of the membranes provide a high retention rate of the lipids. A slight protein transmission is observed, but this transmission could easily be reduced with lower MWCO (e.g. 5 kDa for RC material and 10 kDa for PAN and PVDF materials).

In this study, only one membrane is suitable concerning the 3 performance criteria: high permeate flux, good selectivity and easy cleaning. This membrane is the RC 70 PP membrane in regenerated cellulose with a 10 kDa MWCO. This membrane has then been selected for the following experimental study.

4.2.2. Mise en œuvre de la membrane RC 70 PP pour le traitement UF des effluents issus de la chaîne de transformation de la sardine

4.2.2.1. *Traitement de l'eau de lavage S2*

L'objectif ici est de confirmer dans des conditions réelles d'ultrafiltration (en mode concentration pendant une durée de 8 h) les ordres de grandeur de performance précédemment obtenus (flux, sélectivité). Le volume initial à filtrer est de 2 L.

Le débit à l'eau Jo avant ultrafiltration est de 51,6 L/h.m², le flux après 8 h d'ultrafiltration de S2 est de 16,7 L/h.m² et le débit à l'eau J après ultrafiltration et rinçage à eau perdue est de 40,2 L/h.m².

La Figure 96 représente le flux du perméat en fonction du temps et l'évolution du facteur de réduction volumique.

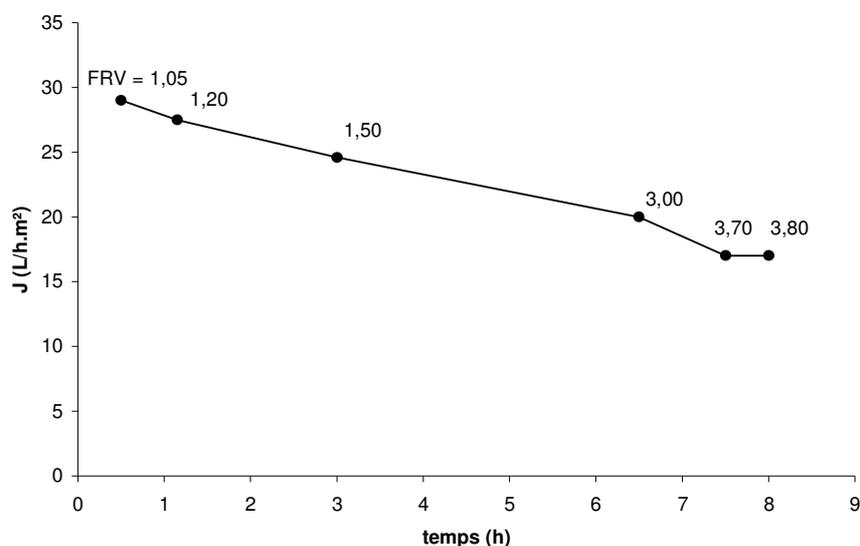


Figure 96 : Evolution du flux de perméation et du facteur de réduction volumique en mode concentration lors de la filtration de l'eau de lavage S2 avec la membrane RC 70 PP. T = 15°C, PTM = 1 bar. Permeate flux evolution and volume reduction factor in concentration mode during S2 ultrafiltration with RC 70 PP membrane

Le facteur de réduction volumique (FRV), également porté sur la courbe, est calculé comme suit :

$$FRV = V_i/V_f \quad \text{Équation 23}$$

Avec

V_i : volume initial de la solution

V_f : volume final du rétentat

Les flux obtenus diminuent de 30 à 17 L/h.m² entre le début de la phase de concentration et la fin de la réduction volumique (FRV = 3,8 et obtention de 0,53 L de R2). En 1989, Jaouen, avec ce même type de membrane, sur des protéines de tacauds obtenait des flux de 15 à 50 L/h.m² (suivant le FRV) mais avec une pression 3 fois plus élevée (Jaouen - 1989).

Les résultats concernant les analyses de perméat et de rétentat obtenus lors de cette étape sont reportés dans le Tableau LII.

La filtration sur membrane en cellulose régénérée a permis la concentration des lipides et des peptides dans le rétentat. En effet, l'eau de lavage S2, possède une charge de 0,8 g/L de lipides et 34,6 g/L de protéines. Après ultrafiltration, le rétentat est chargé à hauteur de 1,8 g/L de lipides et 62,5 g/L de protéines. Le perméat issu de ce procédé possède par conséquent une charge plus faible en lipides et protéines. Le taux de rétention montre une rétention quasi-totale des lipides (proche de 90%). Le taux de rétention des protéines est un peu plus faible (~70%). Comme évoqué lors de l'étape précédente, cette membrane permet une légère transmission des protéines.

Tableau LII : Caractérisation biochimique (matière sèche, lipides et protéines) et taux de rétention des fractions collectées après 8 h de filtration de l'eau de lavage S2 sur membrane RC 70PP en concentration (FRV = 3,8) à 15°C et pour une PTM de 1 bar. Biochemical characterization (dry matter, lipid, protein) of collected fraction during S2 filtration with RC 70 PP membrane

Echantillons	MS (%)	Lipides (g/L)	Protéines (g/L)
S2	49,3	0,8 ± 0,0	34,6 ± 1,7
R2	74,2	1,8 ± 0,1	62,5 ± 0,2
P2	24,6	0,1 ± 0,0	14,3 ± 0,5
Taux de rétention	-	89,8%	69,7%

4.2.2.2. Hydrolyse du culot C1 et traitement du surnageant résultant

Les compositions biochimiques des fractions résultant de l'hydrolyse sont consignées dans le Tableau LIII.

Tableau LIII : Caractérisation biochimique (matière sèche, lipides et peptides) du culot C1 et des fractions résultantes de son hydrolyse par la papaïne (2 h, 60°C, pH 6,5, E/S = 2%). Biochemical characterization (dry matter, lipid, peptide) of collected fraction during C1 hydrolyse with papain

Echantillons	MS%	Lipides%	Peptides%
C1	21,99	1,43 ± 0,1	19,21 ± 0,4
S3	9,84	0,07 ± 0,0	7,22 ± 0,2
C3	21,03	3,60 ± 0,2	15,39 ± 0,1

Après 2 h d'hydrolyse, 68% de la matière sèche et des peptides du départ se retrouvent solubilisés (dans le surnageant S3) démontrant l'efficacité de la papaïne sur le culot. A l'inverse, seuls 7% des lipides initialement présents dans C₂ se retrouvent dans le surnageant S3, la majeure partie restant dans le culot C3.

Le surnageant S3 est ensuite soumis à un traitement d'UF sur la membrane sélectionnée précédemment. Environ 960 mL de ce surnageant ont été concentrés sur la membrane RC 70 PP pendant 2 h à 15°C. Au cours de cet essai, les flux de perméation ont varié de 31,9 L/h.m² à 21,9 L/h.m². A l'issue des 2 h, 520 ml de perméat (P3) et 440 ml de rétentat (R3) sont obtenus soit FRV = 2,2. Les compositions biochimiques élémentaires sont indiquées dans le

Tableau LIV. Le calcul des taux de rétention révèle qu'environ 83% des lipides et près de 67% des peptides sont retenus par la membrane.

Tableau LIV : Caractérisation biochimique (matière sèche, lipides et peptides) et taux de rétention des fractions collectées après 2 h de filtration du surnageant S3 sur membrane RC 70PP en concentration (FRV = 2,2) à 15°C et pour une PTM de 1 bar. Biochemical characterization (dry matter, lipid, peptide) of collected fraction during S3 filtration with RC 70 PP membrane

Echantillons	MS (%)	Lipides (%)	Peptides (%)
S3	9,84	0,07 ± 0,0	7,22 ± 0,2
R3	7,65	0,06 ± 0,0	6,29 ± 0,0
P3	7,82	0,02 ± 0,0	4,43 ± 0,2
Taux de rétention	-	83%	67%

4.2.2.3. Discussion

La filtration sur membrane en cellulose régénérée de l'eau de lavage S2 en mode concentration permet de dégager les mêmes conclusions que lors de la sélection du matériau. Lors de la concentration, le flux de perméation diminue au cours du temps du fait de l'accumulation de matière au voisinage de la membrane. Cependant la couche colmatante n'adhère quasiment pas (faibles interactions solutés / membranes) et un simple rinçage à l'eau suffit pour nettoyer celle-ci. Les flux obtenus lors de cette étude sont tout à fait acceptables et de même ordre de grandeur que ceux obtenus précédemment lors d'UF d'effluents issus de la transformation du tacaud (Jaouen - 1989). En effet, des flux de ce type se situent dans les standards de performance généralement observés au niveau industriel en ultrafiltration de protéines. **Comme souhaité, les lipides et la majorité des protéines sont concentrés dans le rétentat, permettant de réduire considérablement la charge polluante du perméat.** En effet, la DCO (demande chimique en oxygène), un des principaux indicateurs de pollution des effluents industriels, a été réduite de 75% lors de ce traitement. Il est également intéressant de souligner qu'une marge de progression existe puisqu'à ce stade les paramètres pression, vitesse tangentielle et température ne sont pas optimisés.

Le couplage hydrolyse / centrifugation permet de modifier profondément les compositions biochimiques des échantillons et autorise d'une part l'obtention d'une phase liquide peu grasse mais riche en peptides et d'autre part l'obtention d'un culot enrichi en matière grasse et non dénué de peptides. Des analyses complémentaires notamment d'appétence et de digestibilité devraient pouvoir indiquer si ce culot peut constituer ou non une matrice de choix pour l'alimentation animale. Les taux de rétention sont globalement identiques à ceux obtenus lors de la filtration de l'eau de lavage (S2) sur le même type de membrane. La coupure des protéines natives en peptides, sous l'action de la papaïne, ne

semble pas trop influencer sur cette rétention azotée par la cellulose régénérée. **Le culot, initialement insoluble a été, par le biais de ce procédé, solubilisé en majorité et, une fois de plus, les lipides et peptides contenus dans la fraction liquide ont pu être concentrés.**

L'ultrafiltration, en particulier avec une membrane de seuil de coupure 10 kDa et un matériau en cellulose régénérée semble donc une technologie adaptée à la récupération des peptides et des lipides issus des eaux de lavage des procédés surimi de petits pélagiques gras tels que la sardine (*Sardina pilchardus*). En effet, les flux se situent aux alentours de 20 L/h.m² avec un taux de rétention supérieur à 70% pour l'azote protéique et supérieur à 90% pour les lipides. Par ailleurs, en terme de flux et de sélectivité, les performances de la membrane sélectionnée sont du même ordre de grandeur pour le traitement du surnageant S2 (eaux de lavage) et de l'hydrolysats S3.

Cette étude préliminaire confirme le potentiel de ce type de technologies propres. Ainsi à partir d'effluents liquides très chargés, il a été possible par une centrifugation et une hydrolyse enzymatique contrôlée, couplées à des technologies membranaires, de récupérer des substances valorisables (lipides, protéines), d'identifier des nouvelles voies de valorisation (composés aromatiques) tout en réduisant très significativement la pollution engendrée par ces rejets (diminution d'un facteur 4 de la DCO).

Ces performances peuvent probablement être améliorées en jouant sur les paramètres opératoires (pression, vitesse, température) ou sur le seuil de coupure des membranes ou le type de module. Une optimisation de ce procédé pour des applications (alimentation humaine et animale) économiquement viables passera nécessairement par un facteur de réduction volumique plus élevé que celui de cette étude. Ces travaux pourront se poursuivre en se focalisant sur les 3 points suivants : changement d'échelle, minimisation des besoins énergétiques et nettoyage / régénération du système.

The filtration of the surimi waste water S2 obtained with the RC membrane has allowed to led to the same conclusions than those concerning the material selection. During the concentration, the permeate flux is decreasing due to the accumulation of matter at the membrane surface (polarization gel). However, the fouling layer is not strongly formed (low interactions) and a simple water rinsing is sufficient to break and to eliminate this layer. Flux obtained during this step are acceptable and close those encountered during washing water ultrafiltration of pouting transformation (Jaouen - 1989). Those flux are ranged in the one

generally observed at an industrial scale for protein ultrafiltration. **So, the objectives have been partly reached because lipids and the main part of proteins have been recovered in the retentate. By this way, the polluting charge of effluent (permeate) generated is low. The chemical oxygen demand, one of the most important pollution indicator, has been 75% reduced during this treatment. It is also interesting to notice that a progression is possible because we do not have yet optimized the pressure, tangential velocity and temperature parameters.**

The realization of an hydrolysis followed by a centrifugation has allowed to modify the biochemical composition of the C1 sludge and a liquid (with proteins a few lipids) and a insoluble (containing fat and few proteins) fractions have been produced. Additional analyses concerning the taste and the digestibility should indicate if this insoluble part could be used in feeding. Retention rates obtained during the filtration of the soluble part are quite similar to those obtained during surimi waste water S2 ultrafiltration on the same membrane. The hydrolysis of proteins with papain has produced peptides, but the peptides generated are still retained by the membrane, despite their low molecular weight. **The sludge, initially insoluble, has been mainly solubilized during hydrolysis, and, one more time, lipids and peptides have been concentrated.**

Ultrafiltration, especially with a 10 kDa RC membrane seems to be an appropriate technology for the recovery of proteins and lipids coming from sardine surimi waste water. Flux obtained are around 20 L/h.m^2 with a retention rate higher than 70% for proteins and higher than 90% for lipids. The selected membrane possess the same performances (selectivity, flux) in the filtration of the waste water S2 or of the hydrolysate S3.

This preliminary step confirms that this kind of mild procedure is potentially interesting in the surimi effluent treatment. From highly charged effluents, it has been possible with centrifugation, controlled hydrolysis and membrane technology, to recover up-gradable substances (lipids, proteins), to identify new ways of up-grading (aromatic compounds) and to lower significantly the pollution of the effluents generated (DCO 4 time reduced).

Those performances could be probably increased with the optimization of the operating conditions (pressure, crossflow velocity, temperature, volume reduction factor), the membrane MWCO, or module conformation. A further work could be focused on the

following aspects: up-scaling, cleaning / regenerability and minimization of the energy consumption.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de recherche était l'étude de procédés originaux de récupération des fractions lipidiques et peptidiques de biomasses marines habituellement non exploitées par techniques douces visant à une consommation énergétique et un investissement modérés.

Le premier chapitre de ce travail a permis de dresser un bilan massique de la production de surimi base à partir de sardine (*Sardina pilchardus*), en estimant également les quantités de co-produits générés. Ainsi, les têtes et les viscères de sardine ont été sélectionnés pour être étudiés, représentant 80% des co-produits solides issus de la chaîne de transformation. La caractérisation biochimique de ces deux matrices a révélé des teneurs importantes en protéines (de 50 à 70% de la matière sèche) et en lipides (aux alentours de 20% de la matière sèche), justifiant d'une part l'emploi des protéases pour déstructurer les tissus et l'orientation de la valorisation vers les fractions lipidiques d'autre part. De plus, la qualité des fractions lipidiques de ces deux co-produits, notamment la présence de phospholipides (de 10 à 16% des lipides totaux) et d'acides gras insaturés (60% des acides gras totaux sont des acides gras insaturés, et 25 à 36% sont des acides gras de la famille des $\omega 3$), justifie la poursuite d'une recherche des voies d'extraction de ces composés par techniques douces. Les co-produits liquides ont également été étudiés, et la première eau de lavage, issue de la phase d'essorage a été sélectionnée pour être traitée par ultrafiltration, de par sa teneur importante en protéines (80% de la matière sèche). Cependant, dans un souci de recyclage total des co-produits issus de cette chaîne de transformation, une étude additionnelle portant sur la valorisation des autres co-produits (peaux et arêtes, déchets résiduels et seconde eau de lavage) pourra être réalisée.

L'étude de l'activité protéolytique des enzymes a permis de déterminer les conditions de travail les plus favorables à l'hydrolyse d'un substrat modèle (l'hémoglobine) à savoir une température de 50°C et un pH de 8. Les quantités d'enzymes requises par rapport au poids frais sont de 0,1% pour Protamex et Alcalase et 1,5% pour Flavourzyme. Dans ces conditions, pour l'hydrolyse de l'hémoglobine, Alcalase est l'enzyme la plus efficace suivie de Protamex puis Flavourzyme. Ces mêmes conditions ont été utilisées pour mesurer l'activité des enzymes endogènes des têtes et des viscères de sardine. A pH 8 et 50°C, les têtes de sardine ne possèdent qu'une faible activité enzymatique. Les viscères possèdent quant à eux une activité enzymatique 20 fois supérieure, essentiellement due à la fonction digestive de ces organes.

Les hydrolyses menées sur les co-produits solides de sardine ont montré que le traitement enzymatique de chaque matrice engendrait des résultats différents. Il est alors indispensable de traiter les matrices de façon séparée.

En ce qui concerne les têtes de sardine, les hydrolyses menées sur de longues durées ont montré que la réaction était continue pendant au moins 22 h, laissant supposer une hydrolyse des tissus durs contenus dans les têtes (os, cartilage, arêtes). Une étude ultérieure pourrait se focaliser sur l'hydrolyse de ces tissus durs et de leur influence sur les autres composés. Ces hydrolyses ont permis de solubiliser la matière (environ 50%) et 60% des lipides totaux sont récupérés dans les fractions liquides. Plus de la moitié des lipides des têtes de sardine devraient pouvoir être obtenus sans avoir recours aux solvants. Ces fractions sont de plus riches en phospholipides (40% des phospholipides totaux) et en acides gras poly-insaturés (AGPI). Les résultats sont différents pour les viscères. Malgré de faibles degrés d'hydrolyses (DH), la solubilisation des viscères est importante (plus de 80%) et l'hydrolyse semble être rapidement arrêtée. La protéolyse des viscères de sardine a de plus permis une augmentation des rendements d'extraction des lipides par rapport à une extraction classique (près de 40% en plus). Cette augmentation de la quantité de lipides extraits vient sans doute du fait que l'hydrolyse enzymatique permet une meilleure accessibilité aux lipides par rapport à une extraction par solvants. De plus, 90% des lipides extraits après hydrolyse sont localisés dans les fractions liquides, permettant leur éventuelle récupération sans avoir recours aux solvants. Ces lipides sont également qualitativement intéressants puisqu'ils possèdent une part importante de phospholipides et qu'ils sont composés principalement d'acides gras insaturés.

Le choix de l'enzyme est crucial pour la conduite de ces hydrolyses. En effet, alors que Flavourzyme conduit à d'intéressants rendements, son coût ne justifie pas son emploi. Alcalase, qui permettait une bonne extraction de lipides, apparaît comme peu efficace, voire néfaste pour l'extraction des AGPI. En effet, pour les têtes comme pour les viscères, les fractions générées par Alcalase sont nettement moins riches en AGPI que les fractions générées par les deux autres enzymes. Compte tenu de l'originalité de ce résultat, une étude approfondie de l'action d'Alcalase s'avère indispensable. Protamex apparaît ici comme l'enzyme la plus favorable à l'hydrolyse enzymatique des co-produits solides de sardine pour l'obtention de fractions liquides riches en lipides, phospholipides et AGPI.

La conduite d'hydrolyses multi-enzymatiques ne paraît un choix judicieux. En effet, les résultats obtenus, pour les têtes comme les viscères, ont rarement été plus intéressants que lors

de la conduite d'hydrolyses mono-enzymatiques, voire parfois moins. De plus, un tel procédé engendre un surcoût inutile. Cependant, avec pour seul objectif l'obtention d'un haut DH, la combinaison d'enzyme peut s'avérer intéressante car les cinétiques d'hydrolyses sont meilleures. Par contre, un travail plus approfondi pourrait être mené en étudiant la conjugaison des enzymes avec des proportions différentes en maintenant le rapport enzyme / substrat constant, ou en menant les hydrolyses de façon successive.

La détermination des conditions opératoires idéales pour chaque co-produit souligne le fait que la libération des lipides et des phospholipides est indépendante de l'évolution de l'hydrolyse, donc du DH. Ainsi, un haut DH n'est pas forcément nécessaire pour obtenir une importante quantité de lipides dans les fractions liquides. Pour les têtes de sardine, la détermination des conditions d'hydrolyse par Protamex a été possible. Grâce à la conduite d'un plan d'expérience, une hydrolyse menée pendant 29 min, à 31°C et avec 0,26% d'enzyme a été définie comme étant la plus efficace pour obtenir de grandes quantités de lipides et de phospholipides sans avoir recours aux solvants. Ce procédé est d'autant plus intéressant que les coûts énergétiques sont restreints et la préservation de la qualité des lipides maximale, grâce à la température modérée et à la réaction de courte durée. Par ailleurs, le culot issu de cette hydrolyse pourrait quant à lui faire l'objet d'une seconde hydrolyse de façon à libérer les phospholipides résiduels, présents en quantité non négligeable. Pour les viscères par contre, le domaine d'étude choisi pour la réalisation du plan d'expériences n'a pas permis l'obtention d'une réponse pertinente. Il serait alors intéressant de mener une autre campagne expérimentale en modifiant le domaine d'étude, essentiellement en resserrant les bornes de chaque paramètre et conduisant des hydrolyses de plus courte durée.

La fraction soluble issue de l'hydrolyse des têtes de sardine par Protamex dans les conditions spécifiquement déterminées a ensuite été traitée par ultrafiltration (UF). Le matériau polyéther sulfone (PES) a permis, avec un seuil de coupure de 300 kDa, une séparation des lipides (retenus par la membrane) et des peptides (recueillis dans le perméat). La séquence de concentration par UF puis diafiltration s'est avérée être la meilleure testée (par rapport la cascade diafiltration puis concentration) puisqu'elle est plus rapide (16 min contre 27 min), nécessite moins d'eau (4 fois moins) et permet une bonne rétention des lipides (87%) et une bonne transmission des peptides (90%). De plus, la proportion des AGPI dans les lipides retenus est plus importante que lors de la cascade diafiltration puis concentration. Enfin, ce procédé à membrane permet une rétention totale des phospholipides. Cependant, le pilote utilisé, du fait de la complexité du cheminement des fluides dans la cassette, ne s'avère

pas être un choix adapté car la solution traitée ici induit un colmatage des canaux de recirculation. Une étude sur l'ultrafiltration de cette fraction avec d'autres configurations de modules (tubulaire par exemple), pourrait permettre de diminuer les phénomènes de colmatage et d'encrassement du compartiment rétentat. D'autres matériaux et seuils de coupures pourraient également être testés.

L'eau de lavage issue de la chaîne de fabrication du surimi a également fait l'objet d'une étude sur l'ultrafiltration, dans le but de concentrer les protéines dans le perméat afin de réduire la charge polluante des eaux de rejet. Ainsi, la membrane en cellulose régénérée (RC 70 PP) au seuil de coupure de 10 kDa est la plus efficace, en comparaison des membranes en polyacrylonitrile (PAN), PES et polyvinylidène fluorure (PVDF). En effet, la cellulose régénérée est le matériau ayant la plus faible affinité avec les protéines et la meilleure régénéralité (par un simple nettoyage à l'eau). Le flux de perméation est par ailleurs dans les ordres de grandeur de ceux habituellement rencontrés pour des applications proches ou similaires. L'utilisation de ce matériau a permis à la fois la concentration des protéines et la réduction de la demande chimique en oxygène (DCO) initiale de 75%. Cependant, une légère transmission des protéines a été notée. Une diminution du seuil de coupure du matériau suffirait vraisemblablement à réduire, voire stopper, cette transmission. Enfin, l'hydrolyse du culot de centrifugation de l'eau de lavage a engendré en partie sa solubilisation et la concentration, après ultrafiltration de la fraction soluble, des lipides et peptides dans le rétentat.

Malgré le soin apporté à toutes les expérimentations, aucune étude sur l'oxydation des lipides n'a été réalisée. Lors de la conduite de futurs travaux, il serait intéressant de prendre en compte ce phénomène et de l'évaluer, de façon à adapter le procédé pour limiter les risques (ajout d'antioxydant, travail en atmosphère inerte, à l'abri de la lumière, limitation de la température...).

Enfin, il serait justifié que toutes ces fractions, obtenues grâce à la mise en œuvre de techniques douces, fassent l'objet d'une recherche d'applications spécifiques, comme la recherche d'activités biologiques.

L'objectif principal de cette étude relative à la valorisation des co-produits issus d'une chaîne de transformation du poisson a été partiellement atteint. En effet, ce travail a montré qu'il était possible d'obtenir des fractions lipidiques de qualité sans avoir recours aux

solvants, en conservant les fractions peptidiques et en respectant un cahier des charges industriel. Ainsi, le potentiel de la combinaison des traitements enzymatiques et membranaires dans ce domaine a été démontré et ouvre ainsi des perspectives encourageantes à l'utilisation de ces techniques douces, s'inscrivant dans une politique actuelle de développement durable et de gestion des bioressources.

The main goal of this research work was the study of original processes devoted to the recovery of lipidic and peptidic fractions from unexploited marine resources using mild procedures, low energy consumption and investment.

The first chapter of this work has allowed to establish the mass balance of the surimi base production from sardine (Sardina pilchardus), with a quantification of generated by-products. Hence, heads and viscera, representing 80% of the solid by-products, have been selected for the study. The two matrixes are rich in proteins (from 50 to 70% of the dry matter) and lipids (around 20% of the dry matter), justifying the use of proteases for the tissue breakdown and the up-grading of lipid fractions. Moreover, the quality of sardine by-product lipids, especially with the phospholipid contents (from 10 to 16% of the total lipids) and unsaturated fatty acids (60% of total fatty acids), strengthens our choice to extract these lipids by means of soft procedures. Liquid by-products have also been studied and the first washing water has been selected to be treated by ultrafiltration, due to its high protein content (80% of the dry weight). Nevertheless, to complete the surimi manufacturing by-product recycling, an additional study should have in charge to explore up-grading ways for the remainder by-products, such as skin and bones, residual wastes and the second washing water.

Optimum working conditions of commercial enzymes have been determined on a model substrate. Therefore, it is more efficient to conduct hydrolyses at pH 8 and at 50°C. Ideal enzyme concentrations are 0.1% for Protamex and Alcalase and 1.5% for Flavourzyme. In those conditions, for haemoglobin hydrolysis, Alcalase is the most efficient, followed by Protamex then Flavourzyme. The same conditions have been used to measure the endogenous by-product activity. At pH 8 and 50°C, sardine heads do not possess a high proteolytic activity. At the opposite, viscera possesses an activity 20 times more important than heads, essentially due to their digestive functions.

Hydrolyses realized on solid sardine by-products have revealed that enzymatic treatment leads to different results according to the nature of the matrix. So, it is essential to perform separate studies.

Concerning heads, long time hydrolyses have shown that the reaction was continue during 22 h, suggesting an hydrolysis of bones and cartilages. A further study will be carried out on the hydrolysis of those hard tissues and their influence on other compounds. Hydrolyses have led to a high matter solubilization (around 50%) and 60% of total lipids could be recovered without solvent requirement. Moreover, these lipids contain 40% of the total phospholipids and possess high PUFA content. Results are not similar concerning viscera. Despite low DH values, the viscera solubilization is important (more than 80%) and hydrolysis is quickly stopped. In addition, viscera proteolysis has enhanced the total lipid extraction compared to a solvent one (around 40% more). This increase in lipid extraction is surely due to the fact that enzymatic treatment leads to a higher lipid accessibility than solvent extraction. Moreover, on one hand, 90% of lipids are localized in the liquid fractions and could be softly recovered, and, on the other hand, these lipids are qualitatively interesting due to their phospholipid and unsaturated fatty acid contents.

The enzyme choice is essential for hydrolysis. While Flavourzyme gives interesting yields, its efficiency is not enough owing to its price, compared to other enzymes. Alcalase, which allows high lipid extraction, appears to have a negative effect on polyunsaturated fatty acids (PUFA) extraction. Indeed, for heads as for viscera, generated fractions by Alcalase possess low PUFA contents compared to other enzymes. Owing to the PUFA results obtained with Alcalase, a deeper study appears to be indispensable. Protamex is the most efficient enzyme for solid sardine by-products in order to obtain high lipid, phospholipid and PUFA contents.

This work has pointed out that multi-enzymes treatment is not justified. Indeed, results obtained for both by-products, have rarely been more important than those obtained with single enzyme. Moreover, such a process involves a higher cost. A complementary work should be suggested, implying the study of enzyme combination with different proportions but with the same enzyme / substrate ratio, or in performing successive hydrolyses.

The optimal conditions determining for each by-product has revealed that the lipid and phospholipid recoveries are not linked to the hydrolysis evolution (DH). Hence, a high DH is

not inevitably entailed for a high lipid content in liquid fractions. Concerning sardine heads, operating conditions with Protamex have been improved and, thanks to an experimental design procedure, led to an 29 min hydrolysis realized at 31°C with 0.26% of enzyme. In addition to the fact that high lipid and phospholipid contents have been obtained in liquid fractions, selected conditions are soft for the lipid quality preservation (mild temperature, short duration time) and industrially suitable. The high phospholipid content remaining in the sludge generated during this hydrolysis could justify a further work, with an additional hydrolysis for example. At the opposite, the area study chosen for the experimental design for viscera hydrolysis do not get a pertinent response. It should be interesting to conduct another experimental design, essentially with a reduction range of each parameter and with a shorter hydrolysis time.

Soluble fractions generated during sardine hydrolysis with Protamex have then been treated by ultrafiltration. The PES material, with a 300 kDa MWCO, has allowed to separate lipids (concentrated in the retentate) from peptides (transmitted into the permeate). The concentration following by diafiltration sequence seems to be the most efficient due to its rapidity (16 min instead of 27 min with the other sequence), its lower water requirement (4 times less) and its high lipid retention (87%) and peptide transmission (90%). Moreover, PUFA content in lipid fraction is higher and phospholipids are totally located in the retentate. However, the choice of the ultrafiltration apparatus is not satisfying due to the complexity of the fluid movements, producing an important fouling in the retentate pathways. In the future, for such solutions ultrafiltration, it should be pertinent to study other types of filtration modules, as tubular configuration. Other materials and MWCO could also be considered.

The study concerning the filtration of the washing water in order to concentrate the proteins in the retentate has permitted the selection of the regenerated cellulose material, with a 10 kDa MWCO. This material is more efficient than PAN, PES and PVDF in terms of proteins adsorption and regenerability (cleaning is realized with a simple water rinsing). Its permeate flux ranges in those generally observed for protein ultrafiltration. So, the use of this material leads to the protein concentration in the retentate and simultaneously to the reduction of 75% of the chemical oxygen demand. Nevertheless, a slight protein transmission is encountered. A lower MWCO should certainly stop this transmission. Finally, the hydrolysis of the sludge resulting from the washing water centrifugation has partly solubilized

the matter, and lipids and proteins included in the soluble fraction have been concentrated in the retentate after the ultrafiltration step.

Despite the care taken for each experiment, none oxidation study has been carried out. At this step, lipid oxidation has to be one important concern in order to adapt the process (addition of anti-oxidative compound, work in inert conditions, in darkness, with temperature limitation...)

Finally, it should be justified to investigate for specific applications for the fractions obtained during this work (screening of biological activity, appetite tests...).

The main objective of this study focused on the by-products coming from fish transformation line have been partly reached. Hence, this work has demonstrated that it is possible to obtain high quality lipidic fractions without solvent requirement, with peptide preservation and with conditions close to industrial instructions. Indeed, the combination of enzymatic treatment and membrane process has shown a great potential, promoting the use of mild procedures, in accordance with present preoccupation concerning resources, management and sustainable development.

BIBLIOGRAPHIE**A**

- Abdul-Hamid A., Bakar J., Bee, et G.H. (2002) - Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chem.*, 78: pp 69-74.
- Ackman R.G., McLeod C. A., et Banerjee A. K. (1990) - An overview of analyses by chromarod-latroscan TCL-FID. *J. of Planar Chromatography*, 3: pp 350-490.
- Adler-Nissen J. (1979) - Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27: pp 1256-63.
- Adler-Nissen J. (1986) - Enzymic hydrolysis of food proteins. *New York: Elsevier, Applied Science Publishers.*, pp 110-69.
- Afonso M.D., Ferre J., et Bórquez R. (2004) - An economic assessment of proteins recovery from fish meal by ultrafiltration. *Trends Food Sci. Tech.*, 15: pp 506-12.
- AFSSA (2003) - Acides gras de la famille omega 3 et système cardiovasculaire: intérêt nutritionnel et allégations. *Communiqué de l'AFSSA*, 70 pp.
- Allie Z., Jacobs E. P., Maartens A., et Swart P. (2003) - Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by abattoir effluent. *J. Membrane Sci.*, 218: pp 107-16.
- Althabe F. (1992) - Les collagènes. *OTS Bull.*, 59: pp 2-10.
- Andrieux G. (2004) - La filière française des co-produits de la pêche et de l'aquaculture: état des lieux et analyse. *Etudes de l'Ofimer*, 63 pp.
- Aptel P., Moulin P., et Quéménéur F. (2002) - Micro et ultrafiltration: conduite des essais pilotes, traitement des eaux et des effluents. *Club Français des Membranes, Lavoisier, Paris*, 2: pp 1-101.
- Arnoult D., Petit F., Lelièvre J. D., Akarid K., Ameisen J. C., et Estaquier J. (2001) - Le récepteur de la phosphatidyl-sérine, un intermédiaire entre apoptose et réponse immunitaire. *Médecine/Sciences*, 17: pp 385-7.
- Arthur G. et Bittman R. (1998) - The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1390: pp 85-102.
- Aspmo S.I., Horn S. J., et Eijsink V. G. H. (2005a) - Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem.*, 40: pp 1957-66.
- Aspmo S.I., Horn S. J., et Eijsink V. G. H. (2005b) - Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera as a component of microbial growth media. *Process Biochem.*, 40: pp 3714-22.

B

- Badii F. et Howell N. K. (2006) - Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloid.*, 20: pp 630-40.
- Bajpai P. et Bajpai P. K. (1993) - Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J. Biotechnology*, 30: pp 161-83.
- Bald C., Aurrekoetxea G., Perera N., Gartzia I., Aguirre P., Boujard T., et Kaushik S. (2002) - Essai d'utilisation de déchets de thons pour la fabrication d'aliments pour poissons. *Dossiers environnement de l'INRA*, 26: pp 26-31.
- Barnerjee I., Saha S., et Dutta J. (1992) - Comparison of the effect of dietary fish oils with different n-3 polyunsaturated fatty acid compositions on plasma and liver lipids in rats. *Lipids*, 27: pp 425-8.
- Bassaganya-Riera J. et Hontecillas R. (2006) - CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD. *Clin. Nutr.*, 25: pp 454-65.
- Beltrán A. et Moral A. (1991) - Changes in fatty acid composition of fresh and frozen sardine (*Sardina pilchardus*) during smoking. *Food Chem.*, 42: pp 99-109.
- Benoist D. et Tourbier Y. (1994) - Plans d'expériences: construction et analyse. *Tec et Doc, Lavoisier, Paris* : 700 pp.
- Bergé J.P. (1996) - Optimisation de la production en masse de *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. sur une eau souterraine salée en vue de sa valorisation: caractérisation des lipides et recherche de substances à activité biologique. *Thèse de doctorat*, 240 pp.
- Bergé J.P. et Barnathan G. (2005) - Fatty acids from lipids in marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. Dans *Marine Biotechnology I*. Le Gal Y. et Ulber R. (eds). *Adv. in Biochem. Engin./Biotechnol.*, Springer, Berlin, 96: pp 49-125.
- Berkovic D., Grunvald U., Menzel W., Unger C., Hiddeman W., et Fleer E. A. M. (1995) - Effects of hexadecylphosphocholine on membrane phospholipid metabolism in human tumour cells. *Eur. J. Cancer*, 31A: pp 2080-5.
- Bhaskar K., Pavankumar Shetty A., Shareef M. M., Ramamohan Y., et Taranath Shetty K. (2002) - Dinitrophenol derivatization of proteolytic products and its application in the assay of protease(s) activity. *J. Neurosc. Meth.*, 120: pp 155-61.
- Bhattacharya A., Ghosal S., et Bhattacharya S. K. (2006) - Effect of fish oil on offensive and defensive factors in gastric ulceration in rats. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 74: pp 109-16.
- Boggs K., Rock C. O., et Jackowski S. (1998) - The antiproliferative effect of hexadecylphosphocholine toward HL60 cells is prevented by exogenous lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1389: pp 1-12.

- Bordenave S., Fruitier I., Ballandier I., Sannier F., Gildberg A., Batista I., et Piot J. M. (2002) - HPLC preparation of fish waste hydrolysate fractions. Effect on Guinea pig ileum and ACE activity. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 32: pp 65-77.
- Bordier C. (1995) - Caractérisation et purification de lipides d'intérêt industriel extraits de l'huile de foie de requin benthique: Le squalé chagrin de l'atlantique (*Centrophorus squamosus*). *Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI*, 300 pp.
- Bougatef A., Souisi N., Fakhfakh E.-T. Y., et Nasri M. (2006) - Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chem.*, in press.
- Bouhallab S. (1998) - Bioréacteurs enzymatiques à membranes. Dans Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire. Boyaval, P. (eds). *Tec et Doc, Lavoisier, Paris*: pp 553-72.
- Bouhallab S., Mollé D., et Leonil J. (1992) - Trypic hydrolysis of caseinomacropéptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotechnol. Lett.*, 14: pp 805-10.
- Bouhallab S., Mollé D., et Leonil J. (1993) - Continuous hydrolysis of b-casein in a membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotechnol. Lett.*, 15: pp 697-702.
- Bourre J.M. (2005) - Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J. Nutr. Health Aging*, 9: pp 31-8.
- Bradford M. (1976) - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: pp 248-54.
- Bressolier P., Petit J. M., et Julien R. (1988) - Enzyme hydrolysis of plasma proteins in a CSTR ultrafiltration reactor: performances and modeling. *Biotechnol. Bioeng.*, 31: pp 650-8.
- Brohult A., Brohult J., Brohult S., et Joelsson I. (1986) - Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 65: pp 779-85.
- Brouwer I.A., Geelen A., et Katan M. B. (2006) - n-3 Fatty acids, cardiac arrhythmia and fatal coronary heart disease. *Progr. Lipid. Res.*, in press:
- Burford R.G. et Gowdey C. W. (1968) - Anti-inflammatory activity of alkoxyglycerols in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 173: pp 56-70.

C

- Cabaner C., Gajate C., Macho A., Muñoz E., Modolell M., et Mollinedo F. (1999) - Induction of apoptosis in human mitogen-activated peripheral blood T-lymphocytes by the ether phospholipid ET-18-OCH₃: involvement of the Fas receptor/ligand system. *Br. J. Pharmacol.*, 127: pp 813-25.

- Cabero M.L., Riera F. A., et Alvarez R. (1999) - Rinsing of ultrafiltration ceramic membranes fouled with whey proteins: effects on cleaning procedures. *J. Membr. Sci.*, 154: pp 239-50.
- Cahu C. et Zambonino Infante J. L. (2001) - Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*, 200: pp 161-80.
- Cahu C., Zambonino Infante J. L., et Takeuchi T. (2003) - Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227: pp 245-58.
- Camacho PaezPáez B., Robles Medina A., Camacho Rubio F., Gonzáles Moreno P., et Molina Grima E. (2002) - Production of structured triglycerides rich in N-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: equilibrium and kinetics. *Chem. Eng. Sci.*, 57: pp 1237-49.
- Can A., Denek N., et Yazgan K. (2005) - Effect of replacing urea with fish meal in finishing diet on performance of Awassi lamb under heat stress. *Small Ruminant Res.*, 59: pp 1-5.
- Caponio F., Lestingi A., Bilanca M. T., et Laudadio V. (2004) - Chemical characteristics and lipid fraction quality of sardines (*Sardina pilchardus* W.): influence of sex and length. *J. Appl. Ichtyol.*, 20: pp 530-5.
- Castillo-Yañez F.J., Pacheca-Aguilar R., Garcia-Carreño F. L., et de los Angeles Navarrete-Del Toro M. (2004) - Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem.*, 85: pp 343-50.
- Cattaneo D., Dell'Orto V., Varisco G., Agazzi A., et Savoini G. (2006) - Enrichment in n-3 fatty acids of goat's colostrum and milk by maternal fish oil supplementation. *Small Ruminant Res.*, 64: pp 22-9.
- Cheftel C., Ahren M., Wang D. I. C., et Tannenbaum S. R. (1971) - Enzymatic solubilization of FPC: batch studies applicable to continuous enzyme recycling process. *J. Agric. Food Chem.*, 19: pp 155-61.
- Chen C.C., Chaung H. C., Chung M. Y., et Huang L. T. (2006) - Menhaden fish oil improves spatial memory in rat pups following recurrent pentylentetrazole-induced seizures. *Epilepsy Behav.*, 8: pp 516-21.
- Cheng L., Hostetler K. Y., Chaidhawangul S., Gardner M. F., Beadle J. R., Keefe K. S., Bergeron-Lynn G., Severson G. M., Soules K. A., Mueller A. J., et Freeman W. R. (2000) - Intravitreal toxicology and duration of efficacy of a novel antiviral lipid prodrug of ganciclovir in liposome formulation. *Invest. Ophthalmol. Vis. sc.*, 41: pp 1523-31.
- Christie W.W. (1989) - Acid-catalysed esterification and transesterification. *Dans Gas chromatography and lipids, the Oily press, Glasgow*: pp 67-9.
- Christie W.W. (1993) - Preparation of lipid extract from tissues. *Dans Advances in lipid methology, the Oily press, Glasgow*, 2: pp 195-213.
- Crooke W.M. et Simpson W. E. (1971) - Determination of ammonium in Kjeldhal digests of crops by an automated procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 27: pp 1256-62.

Cros S. (2004) - Concentration et dessalement de jus de cuisson de produits de la mer par des procédés à membranes en vue de la récupération d'arômes. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Sud et de l'Université de Nantes*, 243 pp.

Cuvellier G.F. (1999) - Enzymologie et biocatalyse. *Dans Biotechnologie. Tec et Doc, Lavoisier, Paris* : pp 319-42.

Córdova-Murueta J.H. et García-Carreño F.L. (2002) - Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*, 210: pp 371-84.

D

Daukšas E., Falch E., Šližyte R., et Rustad T. (2005) - Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.*, 40: pp 2659-70.

De Koning A.J. et H Mol T. (1991) - Intérêt nutritionnel de la sardine fraîche pêchée en mer Méditerranée. *Cahiers de la Nutrition et de la Diététique*, 6: 12 pp.

De Leonardis A. et Macciola V. (2004) - A study on the lipid fraction of Adriatic sardine filets (*Sardina pilchardus*). *Nahrung*, 48: pp 209-12.

De Vecchi S. et Coppes Z. (1996) - Marine fish digestive proteases - Relevance to food industry and the South-West Atlantic region - A review. *J. Food Biochem.*, 20: pp 193-214.

Deeslie W.D. et Cheyran M. (1991) - Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Food Sci.*, 57: pp 411-3.

Dhulster P., Bazus A., et Gerard M. (1994) - Valorisation de déchets d'abattoirs: couplage réacteur enzymatique / ultrafiltration. *Recueil des conférences Interfiltra/Intermembrane, 15-17 Novembre*: pp 68-73.

Diniz F.M. et Martin A. M. (1996) - Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 31: pp 419-26.

Diniz F.M. et Martin A. M. (1997) - Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm.-U.-Technol.*, 30: pp 266-72.

Dong Y.L., Sheng G. Y., Fu J. M., et Wen K. W. (2005) - Chemical characterization and anti-anaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongata*. *J. Sci. Food Agric.*, 85: pp 2033-39.

Duarte J., Vinderola G., Ritz B., Perdigón G., et Matar C. (2006) - Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology*, 211: pp 341-50.

Dubois N. (2005) - Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG). *Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Sorbonne.*, 97 pp.

- Dumay J. (2003) - Contribution à l'analyse de lipides issus de biomasses marines en vue de la recherche de molécules à activité biologique. *Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Sorbonne.*, 102 pp.
- Dumay J., Barthomeuf C., et Bergé J. P. (2004) - How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. *J. Aquatic Fish Product Technol.*, 13: pp 69-84.
- Dumay J., Donnay-Moreno C., Barnathan G., Jaouen P., et Bergé J. P. (2006) - Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochem.*, in press.

E

- El-Beltagy A.E., El-Adawy T. A., Rahma E. H., et El-Bedawey A. A. (2005) - Purification and characterisation of an alkaline protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *J. Food Biochem.*, 29: pp 445-58.
- Espe M., Lemme A., Petri A., et El-Mowafi A. (2006) - Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture*, 255: pp 255-62.
- Esquível M.M., Bandarra N. M., Fontan I., Bernardo-Gil M. G., Batista I., Nunes M. L., et Empis J. A. (1997) - Supercritical carbon dioxide extraction of sardine *Sardina pilchardus* oil. *Lebensm.-U.-Technol.*, 30: pp 715-20.
- Eymard S. (2003) - Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*): choix de procédés. *Thèse de doctorat de l'Université de Nantes*, 143 pp.

F

- Fagbenro O.A. et Jauncey K. (1998) - Physical and nutritional properties of moist fermented fish silage pellets as a protein supplement for tilapia (*Oreochromis niloticus*). *An. Feed Sci. Technol.*, 71: pp 11-8.
- FAO fisheries department (1986) - The production of fish meal and oil. *Technical paper*, 142.
- FAO fisheries department (2004) - Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. *SOFIA*, 164 pp.
- FAO fisheries department (2005) - Review of the state of world fishery resources. *Technical paper*, 457.
- FAO/SMIAR (2001) - Poissons et produits halieutiques. *Perspectives de l'alimentation*, 2: 11 pp.

- Fischer D.J., Liliom K., Guo Z., Nusser N., Virag T., Murakami-Murofushi K., Kobayashi S., Erickson J. R., Sun G., Miller D. D., et Tigyi G. (1998) - Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.*, 54: pp 979-88.
- Fitzgerald A.J., Rai P. S., Marchbank T., Taylor G. W., Ghosh S., Ritz B. W., et Playford R. J. (2005) - Reparative properties of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Gut*, 54: pp 775-81.
- Folch J., Lees M., et Sloan Stanley G. H. (1957) - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: pp 497-509.
- Forest A. (2001) - Ressources halieutiques hors quotas du Nord Est Atlantique: bilan des connaissances et analyse de scénarios d'évolution de la gestion. *Ifremer Eds, tome 2*: 215 pp.

G

- Gajate C., Fonteriz R. I., Cabanier C., Alvarez-Noves G., Alvarez-Rodriguez Y., Modolell M., et Mollinedo F. (2000) - Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int. J. Cancer*, 85: pp 674-82.
- Geurden I., Gondouin E., Rimbach M., Koppe W., Kaushik S., et Boujard T. (2006) - The evaluation of energy intake adjustments and preferences in juvenile rainbow trout fed increasing amounts of lipid. *Physiol. Behav.*, 88: pp 325-32.
- Gildberg A. (1992) - Recovery of proteinases and protein hydrolysates from fish viscera. *Bioresource Technol.*, 39: pp 271-6.
- Gildberg A. (1993) - Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.*, 28: pp 1-15.
- Gildberg A., Arnesen J. A., et Carlehög M. (2002) - Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation. *Process Biochem.*, 38: pp 475-80.
- Gildberg A., Břrgwald J., Johansen A., et Stenberg E. (1996) - Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114 B: pp 97-101.
- Gildberg A. et Raa J. (1983) - Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 75 A: pp 337-42.
- Gildberg A. et Stenberg E. (2001) - A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochem.*, 36: pp 809-12.
- Goupy J. (1988) - La méthode des plans d'expériences. Optimisation du choix des essais et de l'interprétation des résultats. *Dunod, Paris*: 303 pp.

- Goytortúa-Bores E., Civera-Cerecedo R., Rocha-Mez S., et Green-Yee A. (2006) - Partial replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture*, 256: pp 414-22.
- Guizani N., Rolle R. S., Marshall M. R., et Wei C. I. (1991) - Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric ceca of mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 89: pp 517-21.
- Gunstone F.D. (1999) - Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *J. Sci. Food Agric.*, 79: pp 1535-49 .
- Gunstone F.D. (2002) - Market report. *Lipid Technology*, 14: 48 pp.
- Guérard F., Batista I., Pires C., Thorkelson G., et Le Gal Y. (2004) - Repport on sources and selection criteria for raw material. *Rapport établi pour le programme SEAFOODplus*, 57 pp.
- Guérard F., Dufossé L., De La Broise D., et Binet A. (2001) - Enzymatic hydrolysis of protein from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 11: pp 1051-9.
- Guérard F., Guimas L., et Binet A. (2002) - Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20: pp 489-98.

H

- Hancer M., Patist A., Kean H. S., et Muralidhara H. S. (2002) - Micellization and adsorption of phospholipids and soybean oil onto hydrophilic surfaces in nonaqueous media. *Colloid. Surface A*, 204: pp 31-41.
- Heu M.S., Kim H. R., et Pyen J. H. (1995) - Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 112: pp 557-67.
- Hevrøy E.M., Sandes K., et Hemre G. I. (2004) - Growth, feed utilisation, appetite and health in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a new type of high lipid fish meal, Sea Grain[®], processed from various pelagic marine fish species. *Aquaculture*, 235: pp 371-92 .
- Hostetler K.Y., Korba B. E., Sridhar C. N., et Gardner M. F. (1994a) - Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice. *Antiviral Res.*, 24: pp 59-67.
- Hostetler K.Y., Richman D. D., Sridhar C. N., Felgner P. L., Felgner J., Ricci J., Gardner M. F., Sellesteth D. W., et Ellis M. N. (1994b) - Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: assessment of uptake in mouse lymphoid tissue and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in Rauscher leukemia virus-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38: pp 2792-7.
- Hoyle N.T. et Merrit J. H. (1994) - Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.*, 59: pp 76-9.

I

Iacobucci G.A., Myers M. J., Emi S., et Myers D. V. (1974) - Large scale continuous production of soybean protein hydrolysate in a constant flux membrane reactor. *Proc. IV Int. Congress. Food Sci. Technol.*, 5: pp 83-95.

J

Jacobson T.A. (2006) - Secondary prevention of coronary heart disease with omega-3 fatty acids. *Am. J. Cardiol.*, 98: pp 61-70.

Jaouen P. (1989) - Etude des techniques de séparation par membrane dans le domaine des pêches et des cultures marines: récupération de protéines solubles de poisson par ultrafiltration et concentration de microalgues marines par microfiltration tangentielle. *Thèse de doctorat de l'Université de Nantes*, 269 pp.

Je J.Y., Park P. J., et Kim S. K. (2005) - Antioxydant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theraga chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.*, 38: pp 45-50.

Jun S.Y., Park P. J., Jung W. K., et Kim S. K. (2004) - Purification and characterization of an antioxydative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur. Food Res. Technol.*, 219: pp 20-6.

K

Kajimoto O., Nagakawa S., Kajimoto Y., Takashiba M., et Shimano K. (2005a) - Evaluation of the safety in excess administration of tea beverage containing peptide derived from sardine muscle hydrolyzate on humans. *Jap. Pharmacol. Therap.*, 33: pp 1113-25.

Kajimoto O., Nagakawa S., Kajimoto Y., Takashiba M., et Shimano K. (2005b) - Hypotensive effects and safety of tea beverage containing peptide derived from sardine muscle hydrolyzate on high normal blood pressure and mild hypertensive subjects. *Jap. Pharmacol. Therap.*, 33: pp 1127-40.

Kartika I.A. (2005) - Nouveau procédé de fractionnement des graines de tournesol: expression et extraction en extrudeur bi-vis, purification par ultrafiltration de l'huile de tournesol. *Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse*, 339 pp.

Kelleher K. (2005) - Discards in the world's marine fisheries: an update. *FAO fisheries technical paper*, 470.

Kelly S.G. (1999) - Squalene and its potential clinical uses. *Alternative Medicine Review*, 4: pp 29-36.

Kim S.K. et Mendis E. (2006) - Bioactive compounds from marine processing by-products - A review. *Food Res. Int.*, 39: pp 383-93.

- Kim Y.J., Kim H. J., No J. K., Chung H. Y., et Fernandes G. (2006) - Anti-inflammatory action of dietary fish oil and calorie restriction. *Life Sci.*, 78: pp 2523-32.
- Kinsella J.E. (1988) - Food lipids and fatty acids: Importance in food quality, nutrition and health. *Food Technol. - Chicago, october 1988*: pp 124-45.
- Kirimlioglu V., Kirimlioglu H., Yilmaz S., Ozgor D., Coban S., Karadag N., et Yologlu S. (2006) - Effect of fish oil, olive oil, and vitamin E on liver pathology, cell proliferation, and antioxydant defense system in rats subjected to partial hepatectomy. *Transplant P.*, 38: pp 564-7 .
- Kishimura H., Hayashi K., Miyashita Y., et Nonami Y. (2005) - Characteristics of two trypsin isozymes from the viscera of Japanese anchovy (*Engraulis japonica*). *J. Food Biochem.*, 29: pp 459-69.
- Kishimura H., Hayashi K., Miyashita Y., et Nonami Y. (2006) - Characteristics of trypsins from the viscera of true sardine (*Sardinops melanostictus*) and the pyloric ceca of arabesque greenling (*Pleuroprammus azonus*). *Food Chem.*, 97: pp 65-70.
- Kolodziejska I., Kaczorowski K., Piotrowska B., et Sadowska M. (2004) - Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminase. *Food Chem.*, 86: pp 203-9.
- Kris-Etherton P., Psota T. L., et Gebauer S. K. (2006) - Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am. J. Cardiol.*, 98: pp 3-18.
- Kristinsson H.G. et Rasco B. A. (2000a) - Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle protein hydrolyzed with various alkaline proteases. *J. Agric. Food Chem.*, 48: pp 657-66.
- Kristinsson H.G. et Rasco B. A. (2000b) - Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.*, 40: pp 43-81.
- Kristinsson H.G. et Rasco B. A. (2000c) - Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochem.*, 36: pp 131-9.
- Kucera L.S., Morris-Natschke S. L., Chen S. Y., Gumus F., Ishaq K., et Herrmann D. B. J. (1998) - *In vitro* evaluation and characterization of newly designed alkylamidophospholipid analogues as anti-human immunodeficiency virus type 1 agents. *Antiviral Chem. Chemother.*, 9: pp 157-65.

L

- Lalasis G., Boström S., et Sjöberg L. B. (1978) - Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: chemical composition and nutritive values. *J. Agric. Food Cehm.*, 28: pp 751-6.
- Larsson S.C., Kumlin M., Ingelman-Sundberg M., et Wolk A. (2004) - Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am. Soc. Clin. Nutr.*, 79: pp 935-45.

- Leveau J.Y. et Bouix M. (1999) - Bio-ingénierie. Dans *Biotechnologie. Tech et Doc*, Lavoisier, Paris : pp 229-313.
- Li M.H., Peterson B. C., Janes C. L., et Robinson E. H. (2006) - Comparison of diets containing various fish meal levels on growth performance, body composition, and insulin-like growth factor-I of juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus* of different strains. *Aquaculture*, 253: pp 628-35.
- Li P., Wang X., Hardy R. W., et Gatlin III D. M. (2004) - Nutritional value of fisheries by-catch and by-product meals in the diet of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 236: pp 485-96 .
- Liaset B., Julsham K., et Espe M. (2003) - Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex. *Process Biochem.*, 38: pp 1747-59.
- Liaset B., Lied E., et Espe M. (2000) - Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *J. Sci. Food Agric.*, 80: pp 881-9.
- Liaset B., Nortvedt R., Lied E., et Espe M. (2002) - Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex protease. *Process biochem.*, 37: pp 1263-9.
- Linder M., Fanni J., et Parmentier M. (2001) - Enzyme-catalysed enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids of salmon oil : optimisation of reaction conditions. *OCL*, 8: pp 73-7.
- Linder M., Fanni J., et Parmentier M. (2005) - Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases. *Mar. Biotechnol.*, 15: pp 70-6.
- Linder M., Matouba E., Fanni J., et Parmentier M. (2002) - Enrichment of salmon oil with n-3 PUFA by lipolysis, filtration and enzymatic re-esterification. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104: pp 455-62.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A. L., et Randall R. J. (1951) - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: pp 265-75.

M

- Mackie I.M. (1978) - Proteolytic enzymes in recovery of proteins from fish waste. *Process Biochem.*, 12: pp 12-4.
- Mackie I.M. (1982) - General review of fish protein hydrolysates. *Animal Feed Sci. and Technol.*, 7: pp 113-24.
- Mahadik S.P., Evans D., et Lal H. (2001) - Oxidative stress and role of antioxidant and omega-3 essential fatty acids supplementation on schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 23: pp 463-93.

- Mannheim A. et Cheyran M. (1990) - Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.*, 55: pp 381-5.
- Marinard Biotech. (2003) - Production de chitosan à partir de co-produits de crevette. *Proc. Les coproduits marins des usines de transformation : une valeur à exploiter*. Rencontres technologiques du Centre Québécois de valorisation des biotechnologies, Québec.
- Maroon J.C. et Bost J. W. (2006) - ω -3 Fatty acids (fish oil) as an anti-inflammatoty: an alternative to non steroidal anti-inflammatory drugs for discogenic pain. *Surg. Neurol.*, 65: pp 326-31.
- Martin A.M. et Chintalapati S. P. (1989) - Fish offal-peat compost extracts as fermentation substrate. *Biological wastes*, 27: pp 281-8.
- Martone C.B., Pérez Borla O., et Sánchez J. J. (2005) - Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and aracha growth media. *Bioresource Technol.*, 96: pp 383-87.
- Massé J. et Evano H. (2001) - Sardine atlantique (*Sardina pilchardus*). *Les nouvelles de l'Ifremer*, 25: pp 1-1.
- Maubois J.L., Roger L., Brulé G., et Piot M. (1979) - Hydrolysat enzymatique total de protéines de lactosérum, obtention et applications. *Fr. Patent n° 79 16483*.
- Merritt J.H. (1982) - Assessment of the production costs of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1: pp 147-51.
- Michail M., Vasiliadou M., et Zotos A. (2006) - Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdnerii*) heads. *Food Chem.*, 97: pp 50-5.
- Morimura S., Nagata H., Uemura Y., Fahmi A., Shigematsu T., et Kida K. (2002) - Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. *Process Biochem.*, 37: pp 1403-12.
- Mortensen S.H., Børshain K. Y., Rainuzzo J. R., et Knutsen G. (1988) - Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 122: pp 173-85.
- Murakami K. et Noda M. (1981) - Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. *Biochim. Biophys. Acta*, 658: pp 17-26.
- Murakami M., Makabe K., Okada S., Yamaguchi K., et Konosu S. (1988) - Screening of biologically active compounds in microalgae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: pp 1035-9.
- Murakami-Murofushi K., Kobayashi S., Onimura K., Matsumoto M., Shioda M., Yoshida S., Shoji M., et Murofushi H. (1995) - Selective inhibition of DNA polymerase-alpha family with chemically synthesized derivatives of PHYLPA, a unique *Physarum* lysophosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1258: pp 57-60.

- Murakami-Murofushi K., Shioda M., Kaji K., Yoshida S., et Murofushi H. (1992) - Inhibition of eukaryotic DNA polymerase α with a novel lysophosphatidic acid (PHYLPA) isolated from myxoamoebae of *Physarum polycephalum*. *J Biol Chem*, 267: pp 21512-7.
- Murray A.L., Pascho R. J., Alcorn S. W., Fairgrieve W. T., Shearer K. D., et Roley D. (2003) - Effects of various feed supplements containing fish protein hydrolysates or fish by-products on the innate immune functions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 220: pp 643-53.
- Muyonga J.H., Cole C. G. B., et Duodu K. G. (2004) - Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloid.*, 18: pp 581-92.
- Médale F., Lefèvre F., et Corraze G. (2003) - Qualité nutritionnelle des poissons. Constituants de la chair et facteurs de variations. *Cahiers de la Nutrition et de la diététique*, 38: pp 37-44.
- Nakajima M., Shoji T., et Nabetani H. (1992) - Protease hydrolysis of water soluble fish protein using a free enzyme membrane reactor. *Process biochem.*, 27: pp 166-60.

N

- Nankervis L. et Southgate P. C. (2006) - An integrated assessment of gross marine protein sources used in formulated microbound diets for barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture*, 257: pp 453-64.
- Nielsen P.M., Petersen D., et Dambmann C. (2001) - Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.*, 66: pp 642-6.
- Nilsang S., Lertsiri S., Suphantharika M., et Assavanig A. (2005) - Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J. Food Eng.*, 70: pp 571-8.
- Noda M. et Murakami K. (1981) - Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid proteinases from the stomach. *Biochim. Biophys. Acta*, 658: pp 27-34.
- Noguchi M., Arai S., Yamashita M., Kato H., et Fujimaki M. (1975) - Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, 23: pp 49-53.
- Novozymes (2001a) - Alcalase food grade. *Product sheet*.
- Novozymes (2001b) - Flavourzyme 500 MG. *Product Sheet*.
- Novozymes (2001c) - Protamex. *Product Sheet*.

O

- Ockerman, H.W., et Hansen, C.L. (2000) – Animal by-product processing and utilization. *CRC press, Boca Raton*: 523 pp.
- OFIMER (2006) - Les chiffres clés de la filière pêche et aquaculture en France. *Office national interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture*, 36 pp.
- OFIMER et Ministère de l'agriculture et de la pêche (2004) - Bilan annuel 2004 de production des pêches et de l'aquaculture. *Office national interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture, Rapport d'activité*: 86 pp.
- Ogawa M., Portier R. J., Moody M. W., Bell J., Schexnayder M. A., et Losso J. N. (2004) - Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargum probatocephalus*). *Food Chem.*, 88: pp 495-501.
- Olivia-Teles A., Cerqueira A. L., et Gonçalves P. (1999) - The utilisation of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, 179: pp 195-201.
- Ong K.K., Fakhrul-Razi A., Baharin B. S., et Hassan M. A. (1999) - Degumming of crude palmoil by membrane filtration. *Artif. Cell Blood Sub.*, 27: pp 381-5.
- Ørskov E.R., Soliman H. S., et Clark C. F. S. (1982) - Use of fish protein hydrolysate in milk replacers. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 7: pp 135-40.
- Ouellet D.R., Seoane J. R., Veira D. M., et Proulx J. G. (1997) - Effects of supplementation with fish meal or fish protein hydrolysate on growth, nutrient digestibility and rumen fermentation of growing cattle fed grass silage. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 68: pp 307-26.

P

- Panasiuk R., Amarowicz R., Kostyra H., et Sijtsma L. (1998) - Determination of α -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of the three analytical methods. *Food chem.*, 62: pp 363-7.
- Parrish C.C. (1987) - Separation of aquatic lipid classes by chromarod thin-layer chromatography with measurement by latroscan flame ionisation detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 4: pp 722-31.
- Peng L., Xu X., Mu H., Høy C. E., et Adler-Nissen J. (2002) - Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. *Enzyme and microbial Technol.*, 31: pp 523-32.
- Piclet G. (1987) - Le poisson aliment. Composition - intérêt nutritionnel. *Cahiers de la Nutrition et de la Diététique*, 4: pp 317-36.

- Picot L., Bordenave S., Didelot S., Fruitier-Arnaudin I., Sannier F., Thorkelsson G., Bergé J. P., Guérard F., Chabeaud A., et Piot J. M. (2006) - Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochem.*, 41: pp 1217-22.
- Pizato N., Bonatto S., Piconcelli M., de Souza L. M., Sasaki G. L., Naliwaiko K., Nunes E. A., Curi R., Calder P. C., et Fernandes L. C. (2006) - Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor bearing rats. *Nutrition*, 22: pp 425-32.
- Ponnampalam E.N., Egan A. R., Sinclair A. J., et Leury B. J. (2005) - Feed intake, growth, plasma glucose and urea nitrogen concentration, and carcass traits of lambs fed isoenergetic amounts of canola meal, soybean meal, and fish meal with forage based diet. *Small Ruminant Res.*, 58: pp 245-52.
- Priyananda P. et Chen V. (2006) - Flux decline during ultrafiltration of protein-fatty acid mixtures. *J. Membrane Sci.*, 273: pp 58-67.
- Puglia C., Tropea S., Rizza L., Santagati N. A., et Bonina F. (2005) - In vitro percutaneous absorption studies and in vivo evaluation of anti-inflammatory activity of essential fatty acids (EFA) from fish oil extracts. *Int. J. Pharmaceutics*, 299: pp 41-8.

Q

- Quaglia G.B. et Orban E. (1987a) - Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. *J. Sci. Food. Agric.*, 38: pp 263-9.
- Quaglia G.B. et Orban E. (1987b) - Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric.*, 38: pp 271-6.
- Quaglia G.B. et Orban E. (1990) - Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysate. *J. Food Sci.*, 55: pp 1571-3.

R

- Rajapakse N., Jung W. K., Mendis E., Moon S. H., et Kim S. K. (2005) - A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, 76: pp 2607-19.
- Rao R., Manohar B., Sambaiah K., et Lokesh B. R. (2002) - Enzymatic acidolysis in hexane to produce n-3 or n-6 FA-enriched structured lipids from coconut oil: Optimization of reaction by response surface methodology. *J. AOCS*, 79: pp 885-90.
- Ravallec-Plé R. (2000) - Valorisation d'hydrolysats d'origine marine: optimisation de la concentration en peptides apparentés aux facteurs de croissance et aux agents sécrétagogues. *Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale*, 171 pp.

- Ravallec-Plé R., Charlot C., Pires C., Braga V., Batista I., Van Wormhoudt A., Le Gal Y., et Fouchereau-Péron M. (2001) - The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Sci. Food Agric.*, 81: pp 1120-5.
- Ravallec-Plé R. et Van Wormhoudt A. (2003) - Secretagogue activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 134: pp 669-79.
- Refstie S., Olli J. J., et Standal H. (2004) - Feed intake, growth, and protein utilisation by post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to graded levels of fish protein hydrolysate in the diet. *Aquaculture*, 239: pp 331-49.
- Reiffel J. et McDonald A. (2006) - Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids. *Am. J. Cardiol.*, 98: pp 50-60.
- Ritchie A.H. et Mackie I. M. (1982) - Preparation of fish protein hydrolysates. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 7: pp 125-33.
- Roose P. et Smedes F. (1996) - Evaluation of the results of the QUASIMEME lipid intercomparison: the Bligh & Dyer total lipid extraction method. *Mar. Pollut. Bull.*, 32: pp 674-80.
- Rosa Pillevesse C. (2006) - Adding value to fish processing with enzymatic hydrolysis. Healthy and valuable ingredients. *Proc. Enzymes For Food congress, Rennes*:
- Rossi N. (2005) - Récolte de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* par techniques à membranes, interaction procédé/biomasse. *Thèse de doctorat de l'Université de Nantes*, 192 pp.
- Rouessac F. et Rouessac A. (1997) - Chromatographie en phase gazeuse. Dans *Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Masson, Paris : pp 21-42.
- Rousseau M., Batista I., Le Gal Y., et Fouchereau-Péron M. (2001) - Purification of a functional competitive antagonist for calcitonin gene related peptide action from sardine hydrolysate. *EJB*, 4: pp 25-32.
- Roy P. et Durand P. (1997) - Les enzymes dans la fabrication d'aliments à base de produits de la mer. Dans *Enzymes en agroalimentaire*. Larreta-Garde (eds). Tec et Doc, Lavoisier, Paris : pp 95-120.

S

- Sadowska M., Kolodziejska I., et Niecikowska C. (2003) - Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.*, 81: pp 257-62.
- Sathivel S., Babbit J., Smiley S., Crapo C., Reppond K. D., et Prinyawiwatkul W. (2003) - Biochemical and functional properties of Herring (*Clupea harengus*) by-product hydrolysates. *J. Food Sci.*, 68: pp 2196-200.

- Schneider M. (2001) - Phospholipids for functional food. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103: pp 98-101.
- Shahidi F., Han X., et Synowiecki J. (1995) - Production and characteristics of protein hydrolystae from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.*, 53: pp 285-93.
- Shahidi F. et Janak Kamil Y. Y. A. (2001) - Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry . *Trends Food Sci. Tech.*, 12: pp 435-64.
- Shahidi F. et Wanasundara U. N. (1998) - Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends Food Sci. Technol.*, 9: pp 230-40.
- Shepherd C.J., Pike I. H., et Barlow S. M. (2005) - Sustainable feed resources of marine origin. *Eur. Aquaculture Soc. Special Publication*, 35: pp 59-66.
- Sidhu K.S. (2003) - Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 38: pp 336-44.
- Silva A. (2003) - Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the Northeastern and the Western Mediterranean. *ICES J. Marine Sci.*, 60: pp 1352-60.
- Simpson B.K., Nayeri G., Yaylayan V., et Ashie I. N. A. (1998) - Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chem.*, 61: pp 131-8.
- Sovik S.L. et Rustad T. (2006) - Effect of season and fishing ground on the activity of cathepsin B and collagenase in by-products from cod species. *LWT*, 39: pp 43-53.
- Šližyte R., Daukšas E., Falch E., Storrø I., et Rustad T. (2005) - Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.*, pp 1415-24.
- Šližyte R., Daukšas E., Falch E., Storrø I., et Rustad T. (2005a) - Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem.*, 40: pp 2021-33.
- Šližyte R., Rustad T., et Storrø I. (2005b) - Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochem.*, 40: pp 3680-92.
- Stewart J.C.M. (1980) - Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 104: pp 10-4.
- Stoknes I., Rustad T., et Mohr V. (1993) - Comparative studies of the proteolytic activity of tissue extracts from cod (*Gadus morhua*) and herring (*Clupea harengus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106 B: pp 613-9.
- Sudaryono A., Tsvetnenko E., et Evans L. H. (1996) - Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 143: pp 331-40 .

Sumaya-Martínez T., Castillo-Morales A., Favela-Torres E. H.-O. S., et Prado-Barragán L. A. (2005) - Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*): I. A study of hydrolysis parameters using response surface methodology. *J. Sci. Food Agric.*, 85: pp 98-104.

T

Tamehiro N., Okamoto-Hosoya Y., Okamoto S., Ubukata M., Hamada M., Naganawa H., et Ochi K. (2002) - Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: pp 315-20.

Tanakol R., Yazici Z., Sener E., et Sencer E. (1999) - Fatty acid composition of 19 species of fish from the Black Sea and the Marmara Sea. *Lipids*, 34: pp 291-7.

Taylor W.H. (1957) - Formol titration: an evaluation of its various modifications. *The Analyst*, 82: pp 488-98.

Thaler A., Hottkowitz T., et Eibl H. (2000) - Separation and quantification of alkylphosphocholines by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem. Phys. Lipids.*, 107: pp 131-9.

Tocher D.R., Dick J. R., MacGlaughlin P., et Bell J. G. (2006) - Effect of diets enriched in $\Delta 6$ desaturated fatty acids (18:3n-6 and 18:4n-3), on growth, fatty acid composition and highly unsaturated fatty acid synthesis in two populations of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 144: pp 245-53.

Toppe J., Aksnes A., Hope B., et Albrektsen S. (2006) - Inclusion of fish bone and crab by-products in diets for atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 253: pp 636-45.

Toyoshima K., Noguchi R., Hosokawa M., Fukunaga K., Nishiyama T., Takahashi R., et Miyashita K. (2004) - Separation of sardine oil without heating from surimi waste and its effects on lipids metabolism in rats. *J. Agric. Food. Chem.*, 52: pp 2372-5.

U

Unger C. et Eibl H. (1991) - Hexadecylphosphocholine: preclinical and first clinical results of a new antitumor drug. *Lipids.*, 26: pp 1412-6.

V

Visser S., Noorman H. J., Slangen C. J., et Rollema H. S. (1989) - Action of plasmin on bovin b-casein in a membrane reactor. *J. Dairy Res.*, 56: pp 323-33.

W

- Wang Y.Z., Chang Y. B., Xing C., et Fu D. (1998) - The interference effects of hexadecylphosphocholine on proliferation and membrane phospholipid metabolism in human myeloid leukemia cell lines. *Tissue Reaction*, 3: pp 101-7.
- Weisinger H.S., Armitage J. A., Sinclair A. J., Vingrys A. J., Burns P. L., et Weisinger R. S. (2001) - Perinatal omega-3 fatty acid deficiency affects blood pressure later in life. *Nature Medicine*, 7: pp 258-9.
- WHO/FAO (1977) - Dietary fats and oils in human nutrition. *Report of an expert consultation*.
- Wieder T., Orfan C. E., et Geilen C. C. (1998) - Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J. Biol. Chem.*, 273: pp 11025-31.
- Wu H.C., Chen H. M., et Shiau C. Y. (2003) - Free amino acids and peptides as related to antioxydant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.*, 36: pp 949-57.

X

- Xie H., Voronkov M., Liotta D. C., Lorba B. A., Schinazi R. F., Richman D. D., et Hostetler K. Y. (1995) - Phosphatidyl-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine: synthesis and antiviral activity in hepatitis B- and HIV-1-infected cells. *Antiviral Res.*, 28: pp 113-20.
- Xu X. (2000) - Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, pp 287-303.
- Xu X., Balchen S., jonsson G., et Adler-Nissen J. (2000) - Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a flat membrane reactor. *JAOCS*, 77: pp 1035-41.

Y

- Yongmanitchai W. et Ward O. P. (1989) - Omega-3 fatty acids: Alternative sources of production. *Process. Biochem.*, pp 117-25.
- You-Jin J., Hee-Guk B., et Se-Kwon K. (1999) - Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolystae using ultrafiltration membranes. *Process Biochem.*, 35: pp 471-8.

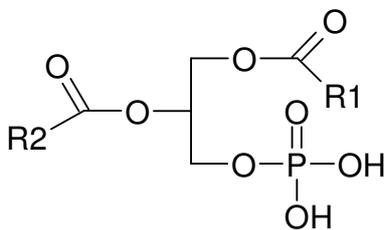
Z

- Zampolli A., Bysted A., Leth T., Mortensen A., De Caterina R., et Falk E. (2006) - Contrasting effect of fish oil supplementation on the development of atherosclerosis in murine models. *Atherosclerosis*, 184: pp 78-85.

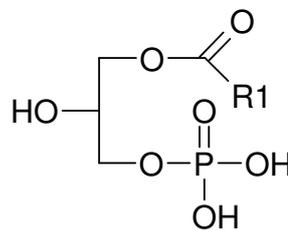
Zeman L.J. (1983) - Adsorption effects in rejection of macromolecules by ultrafiltration membranes. *J. Memb. Sci.*, 15: pp 213-30.

ANNEXE A

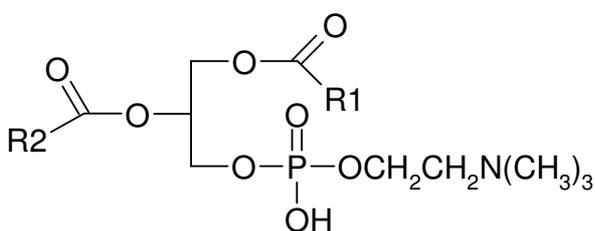
STRUCTURE DES PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES



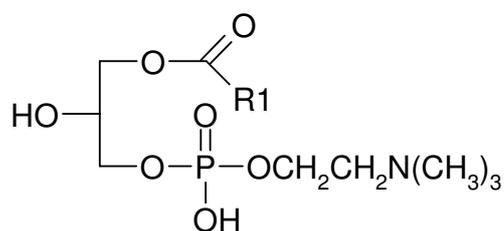
Acide Phosphatidique (PA)



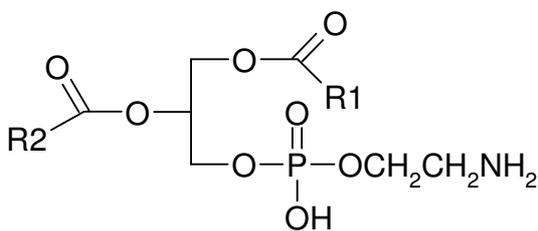
Acide LysoPhosphatitue (LPA)



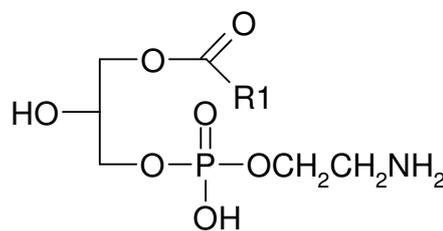
PhosphatidylCholine (PC)



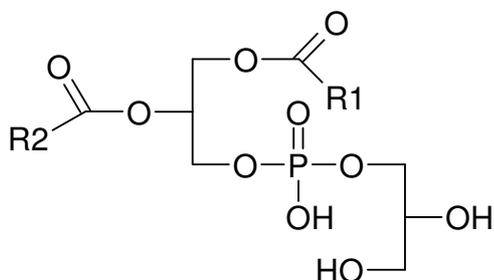
LysoPhosphatidylCholine (LPC)



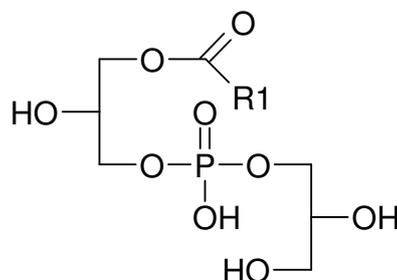
PhosphatidylEthanolamine (PE)



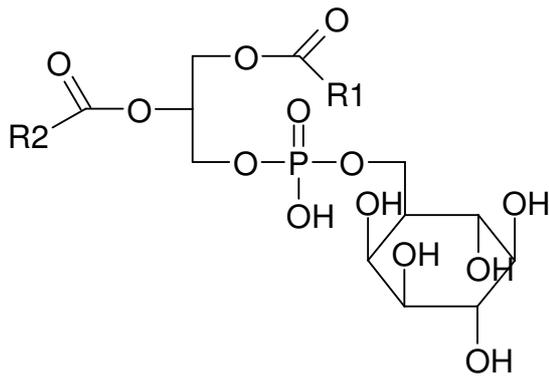
LysoPhosphatidylEthanolamine (LPE)



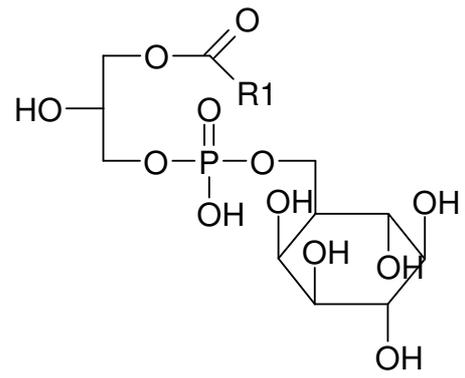
PhosphatidylGlycérol (PG)



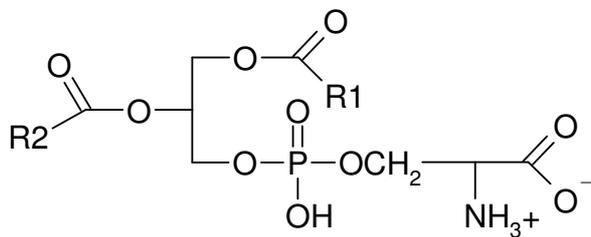
LysophosphatidylGlycérol (LPG)



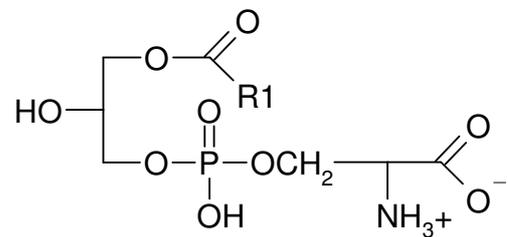
Phosphatidylinositol (PI)



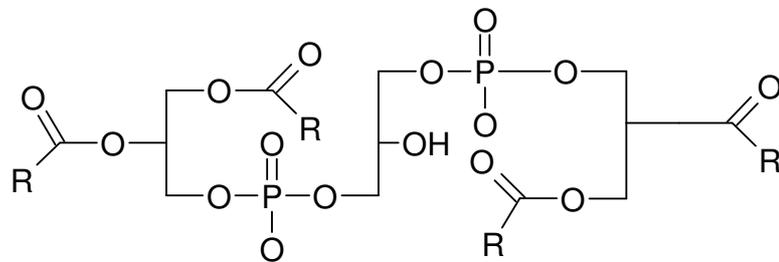
LysoPhosphatidylinositol (LPI)



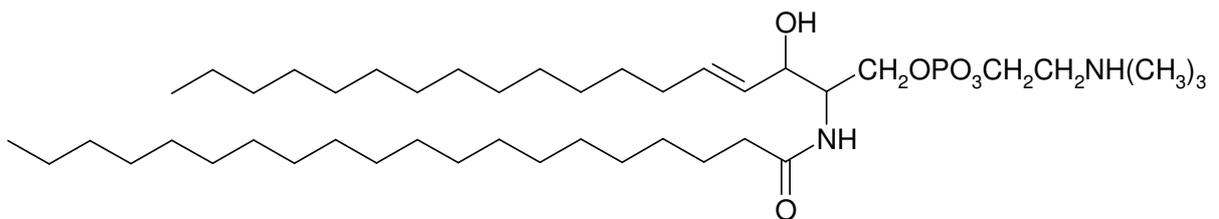
PhosphatidylSérine (PS)



LyspPhosphatidylSérine (LPS)



Cardiolipine (CA)



Sphingomyéline (SM)

ANNEXE B

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES FRACTIONS
OBTENUES APRES HYDROLYSE DES TETES DE SARDINE

Tableau LV : Composition en acides gras des têtes de sardine hydrolysées avec Protamex (0,1%) pendant 24h à pH 8 et à 50°C

	Phase insoluble	Phase huileuse	Phase soluble
C10:0	1,8%± 1,6%	1,4%± 0,2%	5,7%± 0,9%
C14:0	11,6%± 0,6%	13,4%± 1,2%	16,3%± 1,5%
C16:0	37,5%± 0,9%	22,8%± 0,8%	43,2%± 4,0%
C18:0	8,3%± 0,0%	4,0%± 0,0%	10,2%± 1,2%
C20:0	0,9%± 0,0%	0,6%± 0,0%	1,1%± 0,2%
Σ AGS	60,1%± 2,1%	42,2%± 1,3%	76,5%± 6,4%
C16:1 c ω7	7,8%± 0,1%	8,0%± 0,3%	4,2%± 3,7%
C18:1 c ω9	11,4%± 0,1%	8,7%± 0,3%	7,7%± 0,8%
C18:1 c ω7	3,4%± 0,0%	2,6%± 0,1%	2,0%± 0,3%
C20:1 c ω9	4,6%± 1,4%	5,3%± 0,1%	0,0%± 0,0%
C24:1 c ω9	1,4%± 0,1%	0,5%± 0,4%	0,7%± 0,6%
Σ AGMI	28,5%± 1,5%	25,1%± 0,5%	14,6%± 5,4%
C16:2 c ω4	0,0%± 0,0%	0,9%± 0,1%	0,0%± 0,0%
C18:2 c ω6	1,8%± 0,8%	1,2%± 0,1%	0,3%± 0,5%
C18:3 c ω3	0,0%± 0,0%	1,0%± 0,1%	0,0%± 0,0%
C18:4 c ω3	0,2%± 0,4%	4,5%± 0,4%	2,9%± 0,3%
C20:4 c ω3	4,9%± 0,2%	7,1%± 0,2%	3,5%± 0,4%
C20:5 c ω3	1,4%± 0,2%	8,5%± 0,9%	0,9%± 0,1%
C22:5 c ω3	0,0%± 0,0%	2,4%± 3,5%	0,0%± 0,0%
C22:6 c ω3	3,0%± 0,5%	7,1%± 0,7%	1,3%± 0,1%
Σ AGPI	11,3%± 1,4%	32,7%± 1,5%	8,9%± 1,2%

Tableau LVI : Composition en acides gras des têtes de sardine hydrolysées avec Alcalase (0,1%) pendant 24h à pH 8 et à 50°C

	Phase insoluble	Phase huileuse	Phase soluble
C10:0	3,6%± 1,0%	3,1%± 1,2%	3,7%± 0,3%
C14:0	12,5%± 1,3%	13,8%± 2,3%	15,2%± 1,3%
C16:0	40,0%± 0,8%	31,9%± 5,5%	34,0%± 2,2%
C18:0	8,7%± 0,0%	5,2%± 0,8%	7,2%± 0,5%
C20:0	0,9%± 0,0%	0,8%± 0,3%	0,5%± 0,4%
Σ AGS	65,7%± 2,5%	54,7%± 8,2%	60,6%± 3,3%
C16:1 c ω7	7,9%± 0,3%	9,0%± 0,4%	8,9%± 0,5%
C18:1 c ω9	11,5%± 1,0%	11,0%± 4,3%	11,3%± 0,5%
C18:1 c ω7	3,2%± 0,3%	3,0%± 0,4%	3,2%± 0,1%
C20:1 c ω9	3,4%± 0,5%	4,7%± 0,9%	5,2%± 0,2%
C24:1 c ω9	1,2%± 0,2%	0,3%± 0,3%	1,2%± 0,1%
Σ AGMI	27,2%± 2,3%	27,9%± 5,2%	29,8%± 1,1%
C16:2 c ω4	0,0%± 0,0%	0,6%± 0,6%	0,0%± 0,0%
C18:2 c ω6	1,5%± 1,3%	1,6%± 1,3%	0,4%± 0,3%
C18:3 c ω3	0,0%± 0,0%	0,6%± 0,6%	0,0%± 0,0%
C20:3 c ω9	0,0%± 0,0%	0,2%± 0,3%	0,0%± 0,0%
C18:4 c ω3	0,0%± 0,0%	2,8%± 1,9%	1,0%± 0,8%
C20:4 c ω3	4,2%± 0,8%	4,4%± 1,6%	3,7%± 3,2%
C20:5 c ω3	0,4%± 0,3%	4,2%± 3,9%	1,9%± 0,1%
C22:6 c ω3	1,0%± 0,3%	2,9%± 3,0%	2,6%± 0,1%
Σ AGPI	7,1%± 0,3%	17,3%± 10,8%	9,6%± 4,3%

Tableau LVII : Composition en acides gras des têtes de sardine hydrolysées avec Flavourzyme (1,5%) pendant 24h à pH 8 et à 50°C

	Phase insoluble	Phase huileuse	Phase soluble
C10:0	3,8%± 0,5%	2,1%± 0,2%	3,8%± 0,4%
C14:0	10,6%± 0,4%	12,0%± 0,3%	7,7%± 0,2%
C16:0	35,7%± 0,2%	23,9%± 0,3%	31,3%± 2,2%
C18:0	8,3%± 0,2%	4,1%± 0,1%	8,9%± 0,1%
C20:0	0,8%± 0,0%	0,6%± 0,0%	0,7%± 0,0%
Σ AGS	59,3%± 0,5%	42,6%± 0,2%	52,5%± 2,6%
C16:1 c ω7	7,3%± 0,2%	8,3%± 0,1%	6,9%± 0,3%
C18:1 c ω9	11,7%± 0,2%	8,4%± 0,0%	13,1%± 0,3%
C18:1 c ω7	3,3%± 0,0%	2,7%± 0,0%	3,1%± 0,1%
C20:1 c ω9	4,4%± 0,1%	5,3%± 0,1%	3,3%± 1,2%
C24:1 c ω9	1,7%± 0,1%	0,6%± 0,0%	2,2%± 0,4%
Σ AGMI	28,4%± 0,3%	25,3%± 0,2%	28,6%± 1,3%
C16:2 c ω4	0,0%± 0,0%	0,9%± 0,0%	0,0%± 0,0%
C18:2 c ω6	1,1%± 0,6%	1,3%± 0,0%	1,0%± 0,4%
C18:3 c ω3	0,0%± 0,0%	1,1%± 0,0%	0,0%± 0,0%
C18:4 c ω3	0,9%± 0,1%	4,8%± 0,1%	1,8%± 0,2%
C20:4 c ω3	4,6%± 0,1%	6,9%± 0,0%	3,8%± 0,6%
C20:5 c ω3	1,8%± 0,1%	9,1%± 0,1%	4,4%± 0,7%
C22:5 c ω3	0,0%± 0,0%	0,7%± 0,0%	0,0%± 0,0%
C22:6 c ω3	3,9%± 0,6%	7,2%± 0,2%	7,9%± 1,9%
Σ AGPI	12,4%± 0,2%	32,0%± 0,4%	18,9%± 3,6%

ANNEXE C

**COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES FRACTIONS
OBTENUES APRES HYDROLYSE DES VISCERES DE
SARDINE**

Tableau LVIII : Composition en acides gras des viscères de sardine hydrolysées avec Protamex (0,1%) pendant 24h à pH 8 et à 50°C

	Phase insoluble	Phase huileuse	Phase soluble
C10:0	2,4%± 0,1%	2,3%± 0,6%	2,7%± 0,4%
C14:0	9,9%± 0,1%	9,4%± 0,6%	8,4%± 0,1%
C16:0	55,4%± 0,6%	27,1%± 0,4%	25,3%± 0,5%
C18:0	9,6%± 0,2%	4,7%± 0,1%	5,1%± 0,1%
C20:0	0,9%± 0,0%	0,9%± 0,0%	1,0%± 0,0%
Σ AGS	78,3%± 0,9%	44,4%± 0,3%	42,5%± 0,5%
C16:1 c ω7	5,3%± 0,2%	7,6%± 0,1%	8,8%± 0,1%
C18:1 c ω9	8,9%± 0,2%	14,6%± 0,1%	16,6%± 0,2%
C18:1 c ω	2,1%± 0,0%	3,0%± 0,0%	3,5%± 0,0%
C20:1 c ω9	2,0%± 0,1%	4,6%± 0,1%	3,5%± 0,6%
C24:1 c ω9	0,0%± 0,0%	0,5%± 0,0%	0,7%± 0,0%
Σ AGMI	18,3%± 0,5%	30,3%± 0,2%	33,2%± 0,7%
C18:2 c ω6	0,3%± 0,3%	1,0%± 0,0%	1,2%± 0,0%
C18:3 c ω3	0,0%± 0,0%	0,8%± 0,0%	0,9%± 0,0%
C20:3 c ω9	0,0%± 0,0%	1,2%± 0,0%	1,3%± 0,0%
C18:4 c ω3	0,7%± 0,1%	3,3%± 0,1%	3,1%± 0,4%
C20:4 c ω3	1,2%± 0,0%	4,5%± 0,1%	3,3%± 0,2%
C20:5 c ω3	0,9%± 0,1%	6,6%± 0,2%	7,3%± 0,4%
C22:6 c ω3	0,4%± 0,0%	7,9%± 0,1%	7,1%± 0,5%
Σ AGPI	3,5%± 0,4%	25,3%± 0,2%	24,2%± 0,7%

Tableau LIX : Composition en acides gras des viscères de sardine hydrolysées avec Alcalase (0,1%) pendant 24h à pH 8 et à 50°C

	Phase insoluble	Phase huileuse	Phase soluble
C10:0	1,7%± 0,3%	2,9%± 0,3%	2,9%± 0,1%
C14:0	10,4%± 0,3%	12,5%± 0,1%	9,5%± 0,1%
C16:0	57,4%± 0,7%	36,7%± 0,3%	27,5%± 0,2%
C18:0	10,0%± 0,2%	6,2%± 0,0%	5,5%± 0,0%
C20:0	0,8%± 0,0%	1,2%± 0,0%	1,2%± 0,0%
Σ AGS	80,4%± 0,6%	59,5%± 0,4%	46,5%± 0,2%
C16:1 c ω7	4,7%± 0,2%	8,7%± 0,0%	10,6%± 0,0%
C18:1 c ω9	8,1%± 0,3%	16,0%± 0,0%	19,2%± 0,1%
C18:1 c ω	2,0%± 0,1%	3,5%± 0,0%	4,0%± 0,0%
C20:1 c ω9	1,9%± 0,1%	5,3%± 0,0%	4,5%± 0,0%
C24:1 c ω9	0,0%± 0,0%	0,4%± 0,0%	0,7%± 0,0%
Σ AGMI	16,6%± 0,5%	33,8%± 0,1%	38,9%± 0,1%
C18:2 c ω6	0,4%± 0,0%	0,5%± 0,0%	1,1%± 0,0%
C18:3 c ω3	0,0%± 0,0%	0,0%± 0,0%	0,7%± 0,0%
C20:3 c ω9	0,0%± 0,0%	0,5%± 0,0%	1,2%± 0,0%
C18:4 c ω 3	0,5%± 0,1%	0,8%± 0,0%	2,3%± 0,0%
C20:4 c ω3	1,1%± 0,1%	4,0%± 0,1%	2,8%± 0,1%
C20:5 c ω3	0,7%± 0,0%	0,5%± 0,1%	3,7%± 0,0%
C22:6 c ω 3	0,4%± 0,0%	0,4%± 0,1%	2,8%± 0,1%
Σ AGPI	3,0%± 0,2%	6,7%± 0,4%	14,6%± 0,1%

Tableau LX : Composition en acides gras des viscères de sardine hydrolysées avec Flavourzyme (1,5%) pendant 24h à pH 8 et à 50°C

	Phase insoluble	Phase huileuse	Phase soluble
C10:0	2,3%± 0,1%	2,0%± 0,3%	2,1%± 0,1%
C14:0	9,2%± 0,0%	9,7%± 0,4%	6,3%± 1,0%
C16:0	54,1%± 0,6%	29,1%± 0,1%	20,3%± 3,1%
C18:0	7,8%± 0,1%	4,9%± 0,0%	4,7%± 0,7%
C20:0	0,6%± 0,0%	1,0%± 0,0%	0,9%± 0,2%
Σ AGS	74,0%± 0,7%	46,7%± 0,1%	34,3%± 5,1%
C16:1 c w7	5,6%± 0,0%	7,1%± 0,1%	7,5%± 1,2%
C18:1 c w9	9,6%± 0,2%	14,5%± 0,1%	13,8%± 2,3%
C18:1 c w7	2,3%± 0,1%	3,0%± 0,0%	3,0%± 0,5%
C20:1 c w9	2,2%± 0,1%	4,9%± 0,0%	11,2%± 13,3%
C24:1 c w9	0,0%± 0,0%	0,5%± 0,0%	0,6%± 0,1%
Σ AGMI	19,7%± 0,3%	29,9%± 0,1%	36,0%± 9,4%
C18:2 c w6	0,6%± 0,0%	1,0%± 0,0%	1,1%± 0,2%
C18:3 c 3	0,0%± 0,0%	0,7%± 0,0%	0,9%± 0,1%
C20:3 c w9	0,0%± 0,0%	1,2%± 0,0%	1,1%± 0,3%
C18:4 w 3	1,1%± 0,1%	2,9%± 0,0%	4,0%± 0,6%
C20:4w3	1,2%± 0,0%	4,5%± 0,2%	2,4%± 0,4%
C20:5 c w3	2,0%± 0,2%	5,9%± 0,1%	9,6%± 1,5%
C22:6w3	1,3%± 0,1%	7,1%± 0,1%	10,6%± 1,6%
Σ AGPI	6,3%± 0,4%	23,4%± 0,3%	29,7%± 4,4%

ANNEXE D

Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases

Process Biochemistry



Short communication

Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases

J. Dumay^{a,*}, C. Donnay-Moreno^a, G. Barnathan^b, P. Jaouen^c, J.P. Bergé^a

^a IFREMER, BP 21105, F 44311 Nantes, France

^b Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, SMAB, EA2160 Faculté de pharmacie, France

^c GEPEA, UMR-CNRS 6144, Saint-Nazaire, France

Received 8 July 2005; received in revised form 10 April 2006; accepted 11 April 2006

Abstract

Enzymatic hydrolysis of sardine viscera by three broad spectrum proteases was investigated using the pHstat method (24 h, pH 8, 50 °C). After hydrolysis, three fractions (sludge, aqueous phase and oily phase) were collected. For each fraction, lipids and phospholipids were quantified and molecular weights of aqueous phase peptides were determined. Under these conditions, the degree of hydrolysis (DH) varied from 1.9% (Flavourzyme), 3.1% (Protamex) and to 3.3% (Alcalase). Dry matter distribution indicated that all hydrolysis performed increased solubilisation of proteins: protein recovery for each hydrolysis ranged from 57.4% to 61.2%. Furthermore, the total lipid content in the liquid parts (oily and aqueous phases) increased (at least 85% of lipids quantified in the raw material are in these phases) which may improve lipid recovery for commercial applications. In addition, these lipids were richer in phospholipids than those extracted by classical chemical extraction, especially after Alcalase hydrolysis.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Phospholipid; Hydrolysis; Lipid; By-product; Sardine; Fish protein hydrolysate (FPH)

1. Introduction

According to the recent Food and Agriculture Organization (FAO) report on bycatch and discards, the weighted discard is estimated at 8%, and the yearly average discards are estimated to be 7.3 million tonnes [1]. While bycatch has declined over the last few years, largely due to more selective fisheries and regulations, there is still great opportunity to reduce bycatch losses. The growing market for bycatch products for human or animal food is due to improved processing technologies and expanding market opportunities for lower-value catch. Worldwide, total landings of small pelagics (sardine, mackerel and horse mackerel) are about 4 million tonnes leading to about 50,000 tonnes of discards.

In addition to their nutritional value [2], phospholipids have also exhibited antibacterial [3], antiviral [4–6] and antitumoral [7–9] activities. Currently, phospholipids can be obtained from natural sources (oil seeds and egg) [10] or produced by synthesis (Larodan Fine Chemicals, Malmo, Sweden; Avanti

Polar Lipid, Alabaster, Alabama for example). Although natural phospholipids have been shown to be more bioactive than synthetic ones, the extraction procedures (involving organic solvents and chromatography) are quite expensive and not environmentally sound. Though production of synthetic phospholipids is theoretically cheaper and less polluting, they are not currently produced at an industrial scale. Thus, the improvement of lipid extraction techniques from fishing discards offers a large opportunity to reduce waste and increase profit from a highly valuable by-product.

Enzymatic tissue disruption may be a valid alternative technique for releasing natural lipids from fish. Previous studies have shown that, when compared to classical organic extraction, lipid extraction is enhanced by a pre-hydrolysis step using wide-spectrum proteases [11] and a part of the oil could be obtained after hydrolysis and centrifugation [12]. Furthermore, peptides generated during hydrolysis could also be up-graded.

Industry is becoming more and more interested in fish protein hydrolysates (FPH) for a variety of applications and properties [13–25].

The objectives of this work were to evaluate solvent-free lipid and phospholipid extractions using three commercial

* Corresponding author. Fax: +33 2 40 37 40 71.
 E-mail address: jdumay@ifremer.fr (J. Dumay).

enzymes (Protamex, Alcalase and Flavourzyme) and to pinpoint possible uses for these lipids and associated FPH, in order to provide basic knowledge for further studies.

2. Material and methods

All analyses were performed in triplicates.

2.1. Materials

Sardines (*Sardina pilchardus*) were provided by Pêcheries Océanes (Nantes, France) and were caught in the North East Atlantic in April and June 2004. Fish were stored in ice and filleted less than 12 h after catch. Viscera were collected and stored under vacuum at -80°C . Due to high variation in chemical composition of fish according to season, sex and length [26,27], samples coming from April and June were mixed together and homogenized with a blender (Waring Commercial, USA) for 1 min. Samples were then stored at -80°C .

Enzymes used for hydrolysis were provided by Novozymes AS (Denmark). Alcalase 2.4 L FG (EC number: 3.4.21.62) is a bacterial serine endopeptidase prepared from a strain of *Bacillus licheniformis*. Protamex (EC numbers: 3.4.21.62 and 3.4.24.28) is a *Bacillus* protease complex. Flavourzyme 500 MG (EC number: 3.4.11.1) is a fungal protease/peptidase complex produced by submerged fermentation of a selected strain of *Aspergillus oryzae*. It contains both endoprotease and exoprotease activities.

2.2. Hydrolysis

Mixed by-products were homogenized with water (ratio 1/1, w/v). For optimal enzyme activity, the mixture was adjusted to pH 8 (with NaOH 1 M) and maintained at 50°C in a water bath. Enzyme (0.1%, w/w for Alcalase and Protamex and 1.5%, w/w for Flavourzyme) was added to the mixture and the system was continuously stirred at 300 rpm for 24 h. pH and temperature were monitored according to the pHstat method (TIM 854, Radiometer analytical, SAS, France) with addition of a solution of NaOH 1 M. Thus, the degree of hydrolysis (DH) could be obtained following the formula:

$$\text{DH} = \frac{V \cdot M \cdot 100}{\alpha \cdot m_p \cdot h_{\text{tot}}}$$

where V is the volume (mL) of sodium hydroxide consumed during hydrolysis; M the molarity of sodium hydroxide, α : dissociation factor for $\alpha\text{-NH}_2$ groups = 0.88 at 50°C [28], m_p the mass (g) of protein in the raw material introduced in the system (protein content was determined according to Crooke et al. [29]) and h_{tot} is the total number of peptide bonds in the protein = 8.6 eq g kg^{-1} protein in fish samples [30].

The extent of enzymatic hydrolysis was determined by the cleavage of peptide bonds during proteolysis. The DH is defined as the ratio between the

total number of peptide bonds cleaved and the total number of peptide bonds in the protein substrate, expressed as a percentage [31].

After hydrolysis, the temperature was increased to 80°C for 10 min to inactivate the enzyme, as specified by the manufacturer [32]. The hydrolysate was then centrifuged at $17,600 \times g$ for 30 min. Three fractions were then collected: sludge, oily phase and aqueous (soluble) phase. Each fraction was then freeze-dried and stored at -20°C until analysis.

2.3. Lipid extraction

Lipid extraction was carried out according to the Folch procedure [33]. Lipids were weighed and results expressed as g of lipid/g of dry matter. The lipid extracts were kept in 10 mL chloroform and stored at -80°C until analysis.

2.4. Phospholipid content of total lipid extract

Phospholipid content was evaluated by a colorimetric method [34] based on the formation of a complex between phospholipids and ammonium ferriethiocyanate. A standard curve was plotted with standard phosphatidylcholine in chloroform ($5\text{--}50 \mu\text{g/mL}$) and results were expressed as g phosphatidylcholine equivalents/g of dry matter.

2.5. Analyses

Molecular weight distribution in the protein hydrolysates was estimated by gel filtration chromatography on a FPLC Superdex 75 HR 10/30 column (Pharmacia Biotech): exclusion size range of 3000–70,000 Da, eluting solvent: 5% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid/NaOH 50 mM buffer, flow rate: 0.5 mL/min, absorbance: 214 nm. Standards injected were ribonuclease (13,700 Da), chymotrypsinogen A (25,000 Da), ovalbumin (43,000 Da) and albumin (67,000 Da).

Crude protein content ($N \times 6.25$) was estimated in the raw material and the aqueous phase from hydrolysis and determined colorimetrically after Kjeldahl digestion using a method described by Crooke et al. [29].

Dry matter content was estimated gravimetrically after freeze-drying, and ash content by heating samples at 600°C overnight.

2.6. Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) and Fischer tests were carried out by Statgraphics Plus (Manugistics Inc., USA).

3. Results and discussion

The proximate chemical composition of sardine's viscera was: $77.65 \pm 0.0\%$ moisture; $1.9 \pm 0.0\%$ ash; $4.9 \pm 0.1\%$ lipids and $15.8 \pm 1.1\%$ proteins.

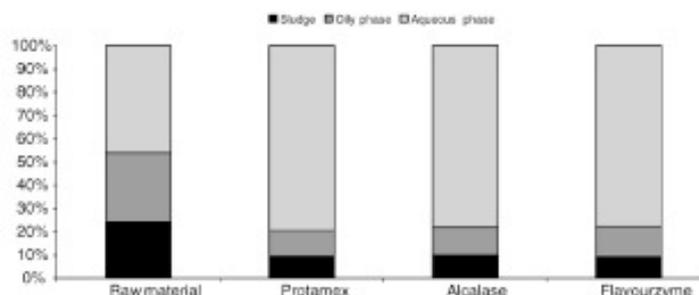


Fig. 1. Dry matter distribution in the different fractions after centrifugation for non-hydrolyzed (raw material) and hydrolyzed viscera (Protamex, Alcalase and Flavourzyme). Hydrolysis have been carried out during 24 h, at pH 8 and 50°C with 1 vol. of water added to raw material. Enzyme concentration were 0.1% for Protamex and Alcalase and 1.5% for Flavourzyme.

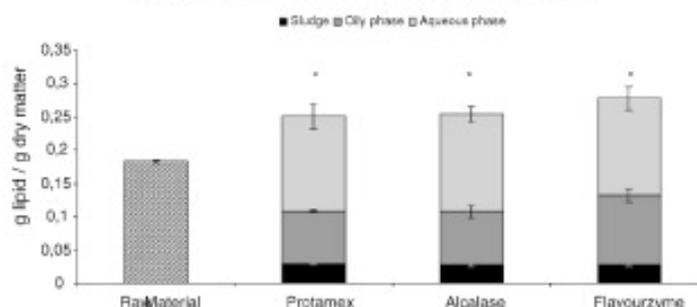


Fig. 2. Lipid distribution among raw material (without hydrolysis) and fractions generated after hydrolysis and centrifugation (* statistically different at the level of 5%). Hydrolysis has been carried out during 24 h, at pH 8 and 50 °C with 1 vol. of water added to raw material. Enzyme concentration were 0.1% for Protamex and Alcalase and 1.5% for Flavourzyme. Results are expressed as g of lipid/g of dry matter.

3.1. Hydrolysis

DH results for Protamex, Alcalase and Flavourzyme were 3.1, 3.3 and 1.9%, respectively. It appears that the DH was correlated to the proteolytic activity of each enzyme (592, 1956 and 276 μg BSA cut per hour at pH8 and at 50 °C, respectively). Hence, Alcalase, which has the highest activity, also had the highest DH, followed by Protamex and Flavourzyme. DH results obtained were in the same range (not more than 5% variation) as those previously obtained on sardine with Alcalase 0.1% even under different hydrolysis conditions [15,21]. Nevertheless, higher DH have been obtained on other fish species [20,23,25], notably after hydrolysis optimization using statistical models (such as experimental design) [25,35] This was not the case here where hydrolysis was carried out under optimum conditions for enzymes determined in model system (hemoglobin hydrolysis), and it is well known that these conditions change with the substrate.

Without hydrolysis (*i.e.* in the crude viscera), after the centrifugation step, 46% of the dry matter was located in the soluble phase, while 30% was recovered in the oily phase and 24% in the insoluble part (Fig. 1). After conducting hydrolysis on viscera samples, the dry matter distribution was quite similar regardless of the enzyme used (about 9% in insoluble part, 11% in oily phase and 80% in soluble fraction). So, dry matter

content of the soluble part rose during hydrolysis, while the dry matter content of the oily phase decreased. However, the total lipid content was higher with hydrolysis, which means that the oily phase was richer in lipids after conducting an hydrolysis. Thus, the disruption of tissues increased lipid liberation compare to a classical extraction. These results also indicate that a large part of material was solubilised during hydrolysis, mainly proteins but also lipids. Thus, in addition to solubilising proteins, hydrolysis could improve the quality of the oil phase. A recent study on hydrolysis of cod viscera [36] also showed high solubilisation of the dry matter under similar conditions (24 h hydrolysis at 55 °C with Alcalase and Protamex, only pH and pH control were different). Thus, the solubilisation of matter appears independent of high DH values. As lipid content in the aqueous phase of the raw material was 4%, the proportion of lipids after hydrolysis was around 20%. This shows that lipid contents of aqueous and oily fractions were increased after hydrolysis regardless of the enzyme used. On the contrary, the constant lipid content of sludges (around 30%) with or without hydrolysis indicated that this fraction could be considered as the non-hydrolyzed fraction. Protein recoveries and protein contents in soluble fraction after hydrolysis are given in Table 1. After 24 h of hydrolysis, protein recoveries in soluble parts were in the range of 57.4–61.2%. Despite the low DH obtained (1.9–3.3%), such results are similar to those obtained in other

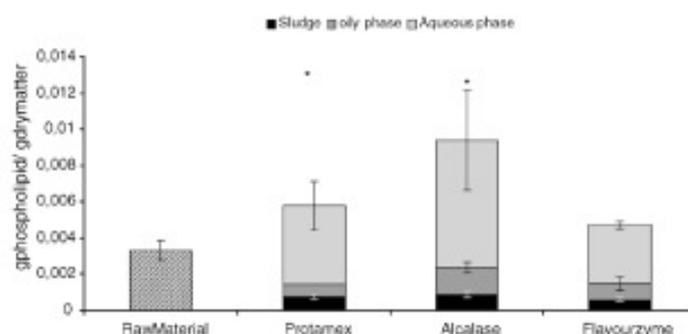


Fig. 3. Phospholipids distribution among raw material (without hydrolysis) and fractions generated after hydrolysis and centrifugation (* statistically different at the level of 5%). Hydrolysis has been carried out during 24 h, at pH 8 and 50 °C with 1 volume of water added to raw material. Enzyme concentrations were 0.1% for Protamex and Alcalase and 1.5% for Flavourzyme. Results are expressed as g of phospholipid/g of dry matter.

Table 1
Protein recovery and protein content in aqueous phases

	Protein recovery (%)	Protein content
Protamex	61.2	0.54
Alcalase	60.2	0.54
Flavourzyme	57.4	0.52

Protein recoveries indicate the proportion of total proteins recovered in the soluble phase after hydrolysis. Protein contents are expressed as g of protein per g of dry soluble fraction.

Results are based upon total nitrogen content $\times 6.25$.

studies on by-product hydrolysis [20,37]. However, aqueous phases obtained were rich in proteins (about 50%).

3.2. Lipid content

After hydrolysis, lipid content was higher than those obtained without enzymatic treatment (Fig. 2). The lipids ratio (lipids in sludge + lipids in oily fraction + lipid in aqueous fraction/lipids of non-hydrolyzed material) was quite similar for Protamex and Alcalase (1.37 and 1.39, respectively), while Flavourzyme gave higher values (1.52). However, no statistical difference was found among the three enzymes and two clusters could be identified, one with the classical extraction and the second one with the three enzymatic treatments. These expected results reveal that even with precautions taken such as pre-incubation phase of fresh tissues with a polar solvent and a vigorous mixing before adding less polar solvent, the lipid extraction was not complete with classical organic extraction. The additional lipids obtained by using proteolytic enzymes were probably among the most difficult to extract by classical methods. While a second extraction could enhance the yield of extraction, this is more solvent- and time-intensive [38].

According to statistical analysis, lipid distribution was similar regardless of the proteases used. Thus, soluble fractions contained the greatest part of lipids (50–60%) followed by the oily phases (32–39%), while sludges possessed only 8–12% of the total lipids quantified. Lipids contained in liquid fractions (oily and soluble ones) could be purified by solvent-free steps (such as filtration or refining). Thus, around 90% of total lipids could be recovered using sustainable processes, *i.e.* without the use of solvents. Furthermore, aqueous phases could be upgraded, as feed (due to their high nutritional value), food ingredient, nitrogen source in microbial growth media or for their bioactive properties [13–25]. In most of the cases, those applications have been established with high protein and low lipid contents products. Thus, fat removal has to be performed by additional processes such as filtration on specific membranes.

3.3. Phospholipid content

Regarding phospholipid distribution (Fig. 3), it appears that enzymatic hydrolysis with Flavourzyme did not lead to a higher extraction of phospholipids when compared to classical procedure. However, hydrolysis of the raw material by Protamex or Alcalase seems to improve phospholipid extraction (increasing factor of 1.75 and 2.82 for Protamex and Alcalase, respectively).

The main portion of the phospholipids was located in the soluble fraction (68% for Flavourzyme and 74% for Alcalase and Protamex), while oily fraction and sludge contain less than 20% each. Thus, as mentioned earlier, phospholipids could also be further isolated without using solvents (for example with membranes). Such phospholipid-enriched fraction could be

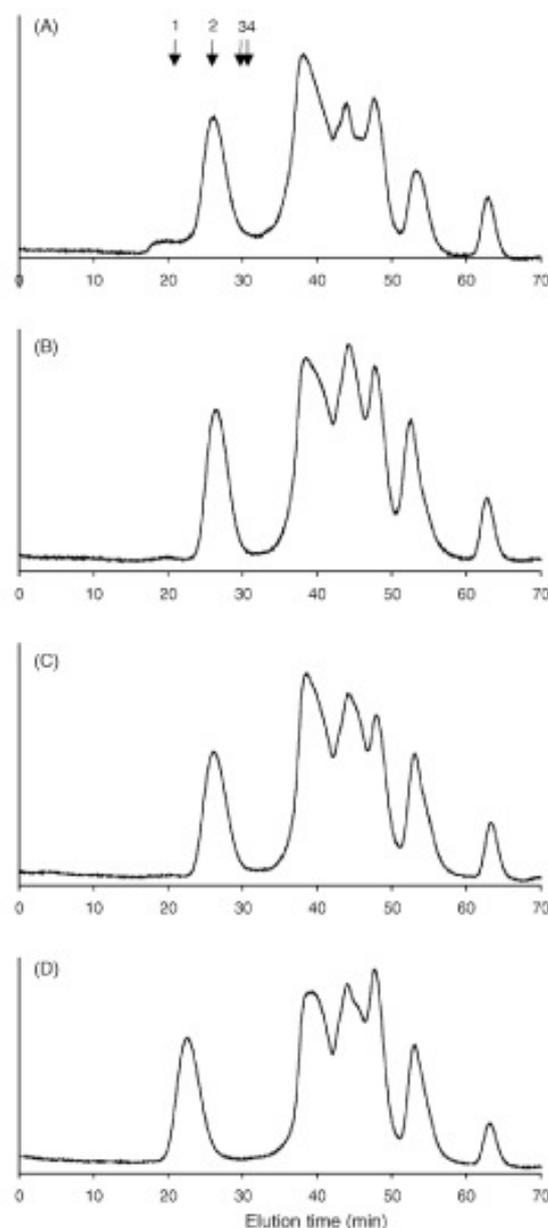


Fig. 4. Gel filtration chromatograms showing the distribution of FPH fraction molecular weight. (A) Raw material (sardine's viscera), (B) hydrolyzed with Protamex, (C) hydrolyzed with Alcalase, (D) hydrolyzed with Flavourzyme. 1, Albumin (67,000 Da); 2, Ovalbumin (43,000 Da); 3, Chymotrypsinogen A (25,000 Da); 4, Ribonuclease (13,700 Da).

screened for biological activities [3–9]. At least, such products could be used in food or feed as these lipids are known to offer health benefits [2]. For example, in aquaculture, larval feed is supplemented with phospholipids which appear essential for good development [39].

3.4. Peptides molecular weight distribution

The relative low DH (less than 4%) obtained even after 24 h hydrolysis did not result in a high modification of the molecular weight distribution in our FPH in comparison to the one of the raw material (Fig. 4). However, it should be noted that only soluble peptides and proteins were analyzed here.

It is well known that shortening protein reduce their functional properties (emulsification, solubility, low bitterness) [15,16,19]. On the other hand, cutting protein in peptides could reveal biological activities [14,21,40], and in some cases, the shorter they are the more active they will be [24]. So, a choice has to be made between biological and functional properties in order to identify the most valuable possible products.

4. Conclusion

This work demonstrates the usefulness of enzymatic hydrolysis for up-grading fishing industry by-products such as sardine viscera. Thus, in addition to the well-known valuable FPH products, lipidic compounds can also be recovered by a sustainable process such as enzymatic hydrolysis and membrane technology. To the best of our knowledge, this study was the first to demonstrate how industrially available wide-spectrum proteases enhance the extractability of lipidic compounds from tissues. In addition, these lipids are recovered in liquid phases included the most polar ones *i.e.* phospholipids. This phenomenon is observed regardless of the enzyme used (Protamex, Alcalase and Flavourzyme). Finally, these results, notably the increase of total lipids after pre-hydrolysis step, indicate that the classic organic solvent extraction methods used by most analysts underestimates the amount of lipids in tissues. A secondary extraction or a enzymatic are ways of better estimating the real lipid content in tissues.

Acknowledgements

This work was performed using the SiobioCle LIMS (Chatou, France). Authors also want to thanks to the Euro Seafood Trading Company (France) for providing PhD grant for this research. This work was performed within the Integrated Research Project SEAFOODplus, contract No. FOOD-CT-2004-506359. The partial financing of the work by the European Union is gratefully acknowledged.

References

- [1] Kelleher K. Discards in the world's marine fisheries: an update. FAO Fisheries technical paper 470; 2005.
- [2] Schneider M. Phospholipids for functional food. *Eur J Lipid Sci Technol* 2001;103:98–101.
- [3] Tamehiro N, Okamoto-Hosoya Y, Okamoto S, Ubukata M, Hamada M, Naganawa H, et al. Bacilysoin, a novel sphingolipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob Agents Ch* 2002;46:315–20.
- [4] Cheng L, Hostetler KY, Chaidhawangul S, Gardner MF, Beadle J, Keefe R, et al. Intravitreal toxicology and duration of efficacy of a novel antiviral lipid prodrug of ganciclovir in liposome formulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1523–31.
- [5] Hostetler KY, Richman DD, Sridhar CN, Feigner PL, Feigner J, Ricci J, et al. Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-dC: assessment of uptake in mouse lymphoid tissue and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in Rauscher leukemia virus-infected mice. *Antimicrob Agents Ch* 1994;38:2792–7.
- [6] Hostetler KY, Korba BE, Sridhar CN, Gardner MF. Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice. *Antivir Res* 1994;24:59–67.
- [7] Murakami-Murofushi K, Kobayashi S, Onimura K, Matsumoto M, Shioda M, Yoshida S, et al. Selective inhibition of DNA polymerase- α family with chemically synthesized derivatives of PHYLPA, a unique Physarum lysophosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta* 1995;1258:57–60.
- [8] Fischer DJ, Lilioni K, Guo Z, Nusser N, Virag T, Murakami-Murofushi K, et al. Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 1998;54:979–88.
- [9] Murakami M, Makabe K, Okada S, Yamaguchi K, Konosu S. Screening of biologically active compounds in microalgae. *Nippon Suisan Gakk* 1988;54:1035–9.
- [10] Peng L, Xu X, Mu H, Hoy CE, Adler-Nissen J. Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology. *Enzyme Microb Technol* 2002;31:523–32.
- [11] Dumay J, Barthomeuf C, Bergé JP. How enzymes may be helpful for upgrading fish by-products: enhancement of fat extraction. *J Aquat Fish Product Technol* 2004;13:69–84.
- [12] Šizyte R, Daukšas E, Falch E, Storro I, Rustad T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem* 2005;1415–24.
- [13] Guérard F, Guimas L, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B-Enzym* 2002;19:20:489–98.
- [14] Guérard F, Dufossé L, De La Broise D, Binet A. Enzymatic hydrolysis of protein from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *J Mol Catal B-Enzym* 2001;11:1051–9.
- [15] Quaglia GB, Orban E. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysate. *J Food Sci* 1990;55:1571–3.
- [16] Gilberg A. Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem* 1993;28:1–15.
- [17] Mackie IM. General review of fish protein hydrolysates. *Anim Feed Sci Technol* 1982;7:113–24.
- [18] Mackie IM. Proteolytic enzymes in recovery of proteins from fish waste. *Process Biochem* 1978;12:12–4.
- [19] Quaglia GB, Orban E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *J Sci Food Agric* 1987;38:271–6.
- [20] Liasset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *J Sci Food Agric* 2000;80:881–9.
- [21] Ravallec-Plé R, Chariot C, Pires C, Braga V, Batista I, Van Wormhoudt A, et al. The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardina pilchardus*). *J Sci Food Agric* 2001;81:1120–5.
- [22] Kristinsson H, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci* 2000;40:43–81.
- [23] Liasset B, Julsham K, Espe M. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex. *Process Biochem* 2003;38:1747–59.
- [24] Je JY, Park PJ, Kim SK. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res Int* 2005;38:45–50.

- [25] Nilsang S, Lertsiri S, Suphantharika M, Assavanig A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J Food Eng* 2005;70:571–8.
- [26] Silva A. Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the northeastern and the western Mediterranean. *ICES J Mar Sci* 2003;60:1352–60.
- [27] Caponio F, Lestingi A, Bilanca MT, Laudadio V. Chemical characteristics and lipid fraction quality of sardines (*Sardina pilchardus* W): influence of sex and length. *J Appl Ichthyol* 2004;20:530–5.
- [28] Adler-Nissen J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. New York: Elsevier, Applied Science Publishers; 1986. pp. 110–169.
- [29] Crooke WM, Simpson WE. Determination of ammonium in Kjeldahl digests of crops by an automated procedure. *J Agric Food Chem* 1971;27:1256–62.
- [30] Novozymes. Determination of the degree of hydrolysis (DH) based on OPA reaction. Novozymes, 2001.
- [31] Ravallec-Plé§ R, Gilmartin L, Van Wormhoudt A, Le Gal Y. Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle. *J Sci Food Agric* 2000;80:1–5.
- [32] Novozymes. Alcalase food grade. Product sheet, 2001.
- [33] Folch J, Lees M, Sloan Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226:497–509.
- [34] Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate. *Anal Biochem* 1980;104:10–4.
- [35] Simpson BK, Nayeri G, Yaylayan V, Ashie INA. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chem* 1998;61:131–8.
- [36] Aspino SI, Horn SJ, Eijssink VGH. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem* 2005;40:1957–66.
- [37] Gildberg A, Stenberg E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochem* 2001;36:809–12.
- [38] Roose P, Smedes F. Evaluation of the results of the QUASIMEME lipid intercomparison: the Bligh & Dyer total lipid extraction method. *Mar Pollut Bull* 1996;32:674–80.
- [39] Cahu C, Zambonino Infante JL, Takeuchi T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 2003;227: 245–58.
- [40] Rousseau M, Batista I, Le Gal Y, Fouchereau-Percon M. Purification of a functional competitive antagonist for calcitonin gene related peptide action from sardine hydrolysate. *EJB* 2001;4:25–32.